

DIN ISO 21338



ICS 07.100.20

Einsprüche bis 2016-07-20

Entwurf

**Wasserbeschaffenheit –
Kinetische Bestimmung der hemmenden Wirkung von Sediment und
anderen Feststoffen sowie gefärbten Proben auf die Lichtemission von
Vibrio fischeri (Kinetischer Leuchtbakterientest) (ISO 21338:2010);
Text Deutsch und Englisch**

Water quality –

Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (kinetic luminescent bacteria test) (ISO 21338:2010);
Text in German and English

Qualité de l'eau –

Détermination cinétique des effets inhibiteurs des échantillons de sédiment, autres solides et des échantillons colorés sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (essai cinétique de bactéries luminescentes) (ISO 21338:2010);
Texte en allemand et anglais

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-05-20 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 53 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Inhalt

	Seite
Nationales Vorwort.....	3
Nationaler Anhang NA (informativ) Literaturhinweise	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich.....	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Grundlage des Verfahrens.....	9
5 Störungen	10
6 Reagenzien und Materialien.....	10
7 Geräte.....	11
8 Probenahme und Probenvorbehandlung.....	12
8.1 Probenahme	12
8.2 Probenvorbehandlung.....	12
9 Durchführung.....	13
9.1 Vorbereitende Arbeiten	13
9.1.1 Herstellung der Testlösungen.....	13
9.1.2 Herstellung der Testsuspensionen	13
9.2 Testdurchführung	14
10 Auswertung.....	14
10.1 Hemmwirkung auf die Leuchtbakterien.....	14
10.2 Ermittlung von EC-Werten	15
11 Angabe der Ergebnisse	16
12 Gültigkeitskriterien.....	18
13 Untersuchungsbericht.....	19
Anhang A (informativ) Verfahrenskennndaten.....	20
A.1 Proben	20
A.2 Analysenverfahren.....	20
A.3 Ergebnisse	21
Anhang B (informativ) Typische kinetische Kurven für verschiedene Proben.....	24
Anhang C (informativ) Verdünnungsreihe.....	25
Literaturhinweise.....	27

Nationales Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Für Deutschland war der Arbeitskreis NA 119-01-03-05-01 AK „Biotests“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) an der Bearbeitung beteiligt.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der ISO 21338:2010 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen ISO-Text.

Bezeichnung des Verfahrens:

zur kinetischen Bestimmung der hemmenden Wirkung von Sediment und anderen Feststoffen sowie gefärbten Proben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Kinetischer Leuchtbakterientest) (L 54):

Verfahren DIN ISO 21338 — L — 54

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 565	siehe DIN ISO 565
ISO 5667-16	siehe DIN EN ISO 5667-16
ISO 5814	siehe DIN EN ISO 5814
ISO 8655-2	siehe DIN EN ISO 8655-2
ISO 11348-1	siehe DIN EN ISO 11348-1
ISO 11348-2	siehe DIN EN ISO 11348-2
ISO 11348-3	siehe DIN EN ISO 11348-3

Hinweis: Der Ansatz im Test, bei dem kein Effekt bei dem betrachteten Organismus erkennbar ist, wird im deutschen Sprachgebrauch als G-Wert bezeichnet. In der Original-ISO-Norm wird von LID-Wert gesprochen, d. h. lowest ineffective dilution.

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft – eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

zur kinetischen Bestimmung der hemmenden Wirkung von Sediment und anderen Feststoffen sowie gefärbten Proben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Kinetischer Leucht bakterientest) (L 54).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „*Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon 030 2601–2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 5667-16, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren*

DIN EN ISO 5814, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung des gelösten Sauerstoffs — Elektrochemisches Verfahren*

DIN EN ISO 8655-2, *Volumenmessgeräte mit Hubkolben — Teil 2: Kolbenhubpipetten*

DIN EN ISO 11348-1, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von Vibrio fischeri (Leuchtbakterientest) — Teil 1: Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien*

DIN EN ISO 11348-2, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von Vibrio fischeri (Leuchtbakterientest) — Teil 2: Verfahren mit flüssig getrockneten Bakterien*

DIN EN ISO 11348-3, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von Vibrio fischeri (Leuchtbakterientest) — Teil 3: Verfahren mit gefriergetrockneten Bakterien*

DIN ISO 565, *Analysensiebe — Metalldrahtgewebe, Lochplatten und elektrogeformte Siebfolien — Nennöffnungsweiten*

Wasserbeschaffenheit — Kinetische Bestimmung der hemmenden Wirkung von Sediment und anderen Feststoffen sowie gefärbten Proben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Kinetischer Leuchtbakterientest)

Einleitung

Bei dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren handelt es sich um eine kinetische Modifikation des in ISO 11348 festgelegten Leuchtbakterientest. Das kinetische Verfahren beseitigt die Schwierigkeiten, die durch intensive Färbung und Trübung von Proben entstehen. Trübe Proben brauchen nicht sedimentiert oder zentrifugiert zu werden, oder eine Farbkorrektur vorgenommen zu werden, wie in ISO 11348 beschrieben.

Dieses kinetische Verfahren verwendet Luminometer, die geeignet sind, Leuchtbakterien den Proben zuzugeben und die Leuchtintensität über einen definierten Zeitraum zu messen. Bei diesem Verfahren wird die Bakteriensuspension der Probe zugegeben und mit ihr in der Messkammer des Luminometers vermischt. Verschiedene geeignete Geräte sind im Handel erhältlich, jedoch können nur wenige die Kühlung der Messkammer auf $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ sicherstellen, wie in ISO 11348 festgelegt. Werden die Bakteriensuspension und die Untersuchungsproben vor der Messung und während der gesamten Inkubation bei $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ in einem Thermoblock gelagert, dann beträgt die tatsächliche Temperatur während der Kontaktzeit $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Die in dieser Internationalen Norm festgelegten Messungen können sowohl an frisch hergestellten Bakterien als auch an gefriergetrockneten oder flüssig getrockneten Bakterienpräparaten durchgeführt werden. Die verschiedenen Bakterienpräparate können unterschiedliche Ergebnisse liefern, insbesondere bei Vorhandensein von Schwermetallen (siehe ISO 11348). Die für die Ergebnisse verantwortlichen Labore haben die Möglichkeit, die am besten geeignete Bakterienvorbereitung auf Grund von Expertenwissen und Informationen über die zu untersuchenden Proben auszuwählen.

WARNUNG — Anwender dieser Internationalen Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Internationale Norm gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Internationalen Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Die Norm beschreibt einen kinetischen Kontakttest zur Bestimmung der Hemmung von Sedimentsuspensionen oder Suspensionen anderer Feststoffproben, sowie von schwierigen getrübbten oder gefärbten wässrigen Proben auf die Lichtemission des marinen Bakteriums *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177).

Das Verfahren ist anwendbar auf:

- a) Sedimentproben und wässrige Suspensionen von Sedimenten (Süßwasser-, Brackwasser- und Meerwassersedimente);
- b) Abwässer (insbesondere getrübbte und gefärbte Abwässer);
- c) wässrige Extrakte (z. B. Sickerwässer, Eluate, Extrakte) von Boden, festem Abfall oder anderen Feststoffen (insbesondere wenn sie getrübt oder gefärbt sind).

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 5667-16:1998, *Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples*

ISO 5814, *Water quality — Determination of dissolved oxygen — Electrochemical probe method*

ISO 11348-1, *Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) — Part 1: Method using freshly prepared bacteria*

ISO 11348-2, *Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) — Part 2: Method using liquid-dried bacteria*

ISO 11348-3:2007, *Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) — Part 3: Method using freeze-dried bacteria*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Kontaktzeit

Dauer des Kontakts zwischen einem Gegenstand oder Stoff und einem anderen

ANMERKUNG Bei diesem Testverfahren ist die Kontaktzeit die Zeit, die der Kontrolle oder der Probe zum Kontakt mit den Testbakterien zur Verfügung steht.

3.2

Kontrollansatz

Probe, die im Labor eingesetzt wird, um das Gerät oder die Testdurchführung zu prüfen oder zu überwachen oder um Änderungen in der betrachteten Probe zu beobachten

3.3

Korrekturfaktor

dimensionsloser Faktor, mit dem Messwerte um bekannte Einflüsse auf die Messwerte korrigiert werden

ANMERKUNG In diesem Testverfahren dient der Korrekturfaktor, $f_{kt'}$, zur Korrektur der Anfangsleuchtintensität der Probe.

3.4

Spitzenwert

höchstes Signal, das in Reaktion auf einen Reiz gemessen wird

ANMERKUNG Im Testverfahren ist der Spitzenwert das höchste Signal, das sofort nachdem alle Bakterien Kontakt zur Probe haben, gemessen wird.

3.5

Referenzansatz

wenn die Wirkung oder das Verhalten eines Stoffes aus vorangegangenen Tests bekannt ist (Referenzsubstanz) und dieser Stoff im Rahmen einer Testserie als Testansatz mitgeprüft wird, wird dieser Ansatz Referenzansatz genannt

ANMERKUNG In Anlehnung an ISO 5667-16:1998.

3.6

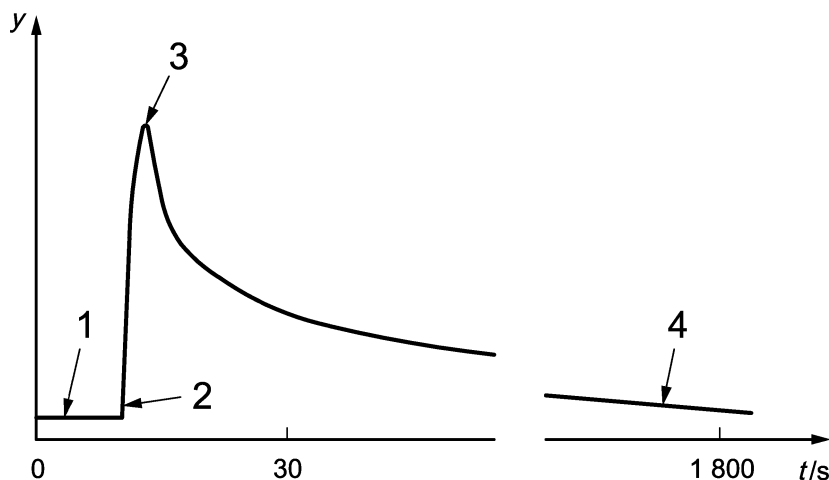
Testansatz

Testansatz wird aus der Probe durch verschiedene proben- bzw. testspezifische Vorbereitungsschritte, z. B. Lösen, Homogenisieren, Absetzen lassen, Filtrieren, Neutralisieren oder Belüften hergestellt.

[ISO 5667-16:1998]

4 Grundlage des Verfahrens

Die Hemmung der Lichtemission von *Vibrio fischeri*-Kulturen wird in einem kinetischen Test ermittelt, wobei die Lichtemission vom Testbeginn an gemessen wird. Dies wird dadurch erreicht, dass die Leuchtbakteriensuspension zu der Probe, die sich bereits in einem Teströhrchen oder einem anderen geeigneten Gefäß (z. B. Mikrotiterplatte) in der Messposition im Luminometer befindet, hinzugegeben wird. Die Lichtemission wird nicht nur beim maximalen Wert (Spitzenwert) der Intensität, der üblicherweise innerhalb von 5 s nach Mischung erreicht wird, gemessen, sondern vom Moment der Dosierung der Bakteriensuspension zur Probe an ermittelt und aufgezeichnet, bis der maximale Intensitätswert (Spitzenwert) erreicht wird. Weiterhin wird nach einer Kontaktzeit von 15 min und 30 min oder optional 5 min (Bild 1) gemessen.



Legende

- t Zeit
- y relative Leuchteinheiten
- 1 Beginn der Messung
- 2 Zugabe der Bakterien
- 3 Aufzeichnung des Spitzenwertes zwischen 0 s bis 5 s
- 4 Mischung der Probe vor Aufzeichnung des Messwerts nach 30 min

Bild 1 — Grundlegendes Ablaufschema für den kinetischen Leuchtbakterientest

Die *Vibrio fischeri*-Suspension wird in der Messkammer des Luminometers zur Probe hinzudosiert und gemischt.

Testkriterium ist die Abnahme der Leuchtintensität zu jedem Endpunkt im Vergleich zum Spitzenwert. Der für die Leuchtintensitätsänderungen der Kontrollansätze während der Kontaktzeit ermittelte Korrekturfaktor, f_{kt} , wird mit berücksichtigt. Die Hemmwirkung der Probe kann anhand von Verdünnungsreihen, z. B. wie in Anhang C beschrieben, als G-Wert oder als effektive Konzentration (EC_{20} oder EC_{50}) bestimmt werden. Der G-Wert ist der am höchsten konzentrierte Ansatz im Test, bei dem die Leuchtintensitätshemmung unter 20 % liegt. Zur Berechnung höherer Hemmwirkungen kann eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung grafisch oder mittels statistischer Auswertungen ermittelt werden. Die Hemmung einer Probe wird dargestellt als die Konzentration (EC_{20} oder EC_{50}), die eine Verminderung von 20 % oder 50 % der Lichtemission im Vergleich zur Kontrolle hervorruft. Dieser Wert wird durch Interpolation innerhalb einer Verdünnungsreihe bestimmt.

Hinsichtlich Färbung und Trübung sind keine besonderen Korrekturmaßnahmen erforderlich, da sich diese Faktoren während der gesamten Messung nicht ändern. Die Hemmwirkung zu verschiedenen Kontaktzeiten und bei verschiedenen Probenkonzentrationen liefert vollständige kinetische Toxizitätswerte zur Probe (Hemmung, dargestellt als Prozentsatz gegen Konzentration gegen Zeit). Sie ermöglicht verschiedene Annahmen über die Art der Schadstoffe, wenn die Ergebnisse mit vorhandenen Messungen verglichen werden (siehe Anhang B).

5 Störungen

Flüchtige Stoffanteile oder Stoffe, die mit dem Verdünnungswasser oder der Testsuspension reagieren oder während des Tests ihren Zustand ändern, können das Testergebnis verfälschen oder die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse beeinträchtigen.

Da Sauerstoff für die Biolumineszenz benötigt wird [18], kann bei stark sauerstoffzehrenden Proben (oder Proben mit einem geringen Sauerstoffgehalt) ein Sauerstoffmangel auftreten, der zu einer Hemmung der Lichtemission führen kann.

Enthält die Probe biologisch leicht abbaubare Nährstoffe kann eine nicht durch Schadstoffe bedingte Abnahme der Biolumineszenz eintreten [19].

Proben mit einem pH-Wert außerhalb des Bereiches von pH 6,0 bis pH 8,5 können die Biolumineszenz beeinträchtigen [18], [20]. Soll der etwaige toxische Effekt des pH-Werts unberücksichtigt bleiben, so ist eine Einstellung des pH-Werts notwendig.

Da es sich bei dem Testorganismus *Vibrio fischeri* um ein marines Bakterium handelt, führt die Untersuchung von meereswasserhaltigen Proben häufig zu einer Erhöhung der Biolumineszenz, wodurch Hemmwirkungen maskiert werden können (siehe ISO 11348-3:2007, Anhang D).

Salzkonzentrationen in der Originalprobe über 30 g/l NaCl oder Stoffkonzentrationen anderer Substanzen gleicher Osmolarität können zusammen mit der im Test geforderten Salzaufstockung zu hyperosmotischen Wirkungen führen. Zur Vermeidung dieser Wirkungen sollte die resultierende Salzkonzentration in den Testansätzen die Osmolarität einer Lösung von 35 g/l NaCl nicht überschreiten.

6 Reagenzien und Materialien

Als Reagenzien solche mit bekanntem Reinheitsgrad und destilliertes Wasser oder Wasser gleichen Reinheitsgrades verwenden.

6.1 Testbakterien. Lumineszierende Bakterien des Stamms *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 verwenden.

Die für die Toxizitätsmessungen verwendeten Bakteriensuspensionen entsprechend den Anweisungen in ISO 11348 herstellen. Die Bakteriensuspensionen vor dem Test aus der Vorratssuspension auf die Testkonzentration verdünnen (Beispiel: ISO 11348-3:2007, Variante B).

6.2 Natriumchlorid-Lösung, zur Verdünnung.

20 g Natriumchlorid (NaCl) in Wasser lösen und mit Wasser auf 1 l auffüllen.

6.3 Natriumhydroxid-Lösung, z. B. $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$.

6.4 Salzsäure, z. B. $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$.

Zur Einstellung des pH-Werts kann es erforderlich sein, Säuren oder Basen niedrigerer oder höherer Konzentrationen zu verwenden.

6.5 Lösung für gefriergetrocknete Bakterien.

- 20,0 g Natriumchlorid (NaCl);
- 2,035 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- 0,30 g Kaliumchlorid (KCl).

In Wasser lösen und mit Wasser auf 1 l auffüllen. Diese Lösung, aufgeteilt in kleine Volumina, im Gefrierschrank bei -18°C bis -20°C lagern.

6.6 Referenzsubstanzen.

Die folgenden drei Lösungen der Referenzsubstanzen einzeln mit Natriumchlorid-Lösung (6.2) als Verdünnung ohne Einstellung des pH-Werts bei Verwendung von gefriergetrockneten Bakterien herstellen:

- a) 6,8 mg/l 3,5-Dichlorphenol (DCP, $C_6H_4OCl_2$);
- b) 19,34 mg/l Zinksulfat-Heptahydrat ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$);
- c) 105,8 mg/l Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$).

Die Konzentrationen in a) bis c) entsprechen ungefähr dem Doppelten der erwarteten EC_{50} -Werte für die jeweiligen Referenzsubstanzen in ISO 11348-3. Zu Konzentrationen der Referenzsubstanzlösungen für frisch gezogene oder flüssig getrocknete Bakterien siehe ISO 11348-1 oder ISO 11348-2. Die benötigten Volumina hängen von der jeweiligen Versuchsanordnung ab.

ANMERKUNG 1 Für die Herstellung der Lösungen der Referenzsubstanzen können im Handel erhältliche Lösungen mit definierten Konzentrationen von $ZnSO_4$ und $K_2Cr_2O_7$ verwendet werden.

ANMERKUNG 2 Weitere Informationen zu Referenzsubstanzen siehe [22].

7 Geräte

Übliches Laborgerät und insbesondere Folgendes.

7.1 Gefrierschrank zur Lagerung der konservierten Bakterien.

7.2 Brutschrank oder Kühlschrank zur Temperierung der Lösung für gefriergetrocknete Bakterien (6.5) auf $(4 \pm 3) ^\circ C$.

7.3 Thermostat mit Thermoblock zur Temperierung der Testansätze und der *Vibrio fischeri*-Suspension auf $(15 \pm 1) ^\circ C$. Während eines Tests sollte die Temperaturabweichung höchstens $\pm 0,3 ^\circ C$ betragen.

7.4 Luminometer, mit mindestens einem Dispenser (Mindest-Einspritzvolumen 0,2 ml).

Das Gerät muss die Leuchtintensität mindestens 5 s in Zeitintervallen von 0,2 s oder kürzer messen und aufzeichnen können. Einspritzung und Aufzeichnung müssen zeitgleich durchgeführt werden.

7.5 Teströhrchen, Küvetten, Testplatten oder andere geeignete **Testgefäße** aus chemisch inertem Material, passend zu dem ausgewählten Luminometer.

7.6 pH-Messgerät.

7.7 Stoppuhr.

7.8 Kolbenhubpipetten, Nennvolumen 100 µl bis 1 000 µl, ISO 8655-2 [3].

7.9 Schüttler, z. B. Vortex-Mischer, zur Mischung der Proben vor der Messung.

7.10 Leitfähigkeitsmessgerät.

7.11 Sauerstoffmessgerät, siehe ISO 5814.

7.12 Sieb, Nennöffnungsweite 2 mm, ISO 565 [1].

8 Probenahme und Probenvorbehandlung

8.1 Probenahme

Die Proben in chemisch inerte und saubere Behälter nach ISO 5667-16 abfüllen. Die Behälter vollständig füllen und verschließen. Die Proben auf Eis, in einem Kühlschrank oder einer Kühlbox bei 2 °C bis 5 °C kühlen und so bald wie möglich nach der Probenahme untersuchen. Falls erforderlich, die Proben bei einer Temperatur von 2 °C bis 5 °C im Dunkeln bis maximal 48 h lagern. Wenn Proben tiefgefroren werden müssen, die Proben bei ≤ -18 °C im Dunkeln bis maximal zwei Monate lagern. Tiefgefrorene Proben direkt nach dem Auftauen in einem Wasserbad aufbereiten und untersuchen. Bei einer Langzeit-Lagerung dürfen die Proben gefriergetrocknet und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert werden. Keine Chemikalien zur Probenkonservierung verwenden. Erforderliche pH-Einstellung und Aufsalzung erst unmittelbar vor dem Test vornehmen.

8.2 Probenvorbehandlung

Die Proben sieben, um grobes Material (z. B. Pflanzenwurzeln oder Partikel größer als 2 mm) zu entfernen.

Sedimentproben durch kräftiges Schütteln (Vortexen) in Wasser (z. B. 20 % Massenanteil) suspendieren, um eine homogene Suspension zu erhalten [22]. Auch Massenanteile größer als 20 % können getestet werden, wenn die Suspension während der gesamten Messung homogen bleibt.

Von allen zu untersuchenden Proben und wässrigen Suspensionen der Proben den Sauerstoffgehalt messen. Für den Test wird eine Sauerstoffkonzentration > 3 mg/l benötigt. Liegt der Sauerstoffgehalt der unverdünnten Probe unter 3 mg/l, geeignete Verfahren zur Erhöhung des Sauerstoffgehaltes, z. B. Belüftung oder Rühren einsetzen.

Von allen zu untersuchenden Proben und wässrigen Suspensionen der Proben den pH-Wert messen. Bei einem pH-Wert zwischen 6,0 und 8,5 ist keine pH-Korrektur erforderlich. Die Beschaffenheit der Probe kann sich durch die Einstellung des pH-Werts ändern. Es kann vorkommen, dass sich der pH-Wert der Probe und der pH-Wert des Testansatzes aufgrund der Pufferkapazität des Testmediums unterscheiden. Daher kann es erforderlich sein, sowohl Untersuchungen mit Proben nach pH-Korrektur als auch mit Proben ohne pH-Korrektur durchzuführen.

Falls erforderlich, den pH-Wert der Probe durch Zugabe von Salzsäure (6.4) oder Natriumhydroxid-Lösung (6.3) einstellen. In Abhängigkeit vom Anwendungsbereich kann der pH-Wert auf $7,0 \pm 0,2$ oder auf den oberen Grenzwert ($8,5 \pm 0,2$) oder den unteren Grenzwert ($6,0 \pm 0,2$) eingestellt werden. Die Konzentration der Salzsäure oder der Natriumhydroxid-Lösung so wählen, dass das zugegebene Volumen nicht mehr als 5 % des Gesamtvolumens beträgt.

Der Probe oder der neutralisierten Probe 20 g/l Natriumchlorid zusetzen.

ISO 11348-3:2007, Anhang D, enthält weitergehende Informationen hinsichtlich des Vorgehens bei Meerwasserproben.

9 Durchführung

9.1 Vorbereitende Arbeiten

9.1.1 Herstellung der Testlösungen

Die Referenzsubstanzlösungen nach 6.6 herstellen. Jede gelieferte Bakteriencharge mit allen drei Referenzsubstanzen prüfen. Jede für den Test rekonstituierte Vorratssuspension mit mindestens einer der drei Referenzsubstanzen prüfen.

Die Proben nach 8.2 vorbereiten.

In einer ersten Serie von Teströhrchen (7.5) die benötigten Verdünnungsstufen der Probe, die Referenzsubstanz (6.6) und die Kontrolle (6.2) herstellen.

Eine serielle Verdünnungsreihe der Probe herstellen. Die Verdünnungen in getrennten Teströhrchen herstellen und in die Messküvetten oder Mikrotiterplatten überführen. Üblicherweise werden in diesem Testverfahren gleiche Volumina von Testsuspension und Probe (oder verdünnter Probe) gemischt, wodurch sich Verdünnungsstufen innerhalb einer Verdünnungsreihe von $D \geq 2$ ergeben.

Die geringste Verdünnung, die untersucht werden kann, ist 1,00 in 1,25. Sie wird durch Mischung von 4 Volumenteilen der Probe mit 1 Volumenteil der Testsuspension (z. B. 800 µl Probe plus 200 µl Testsuspension) hergestellt. Der entsprechende D -Wert wird mit $D = 1$ angegeben. Für diesen D -Wert wird ein zusätzlicher Kontrollansatz benötigt, der durch Zugabe von 200 µl Testsuspension zu 800 µl Natriumchlorid-Lösung hergestellt wird (siehe Anhang C).

Die Teströhrchen für die Kontrollansätze mit der Natriumchlorid-Lösung (6.2), die Ansätze der Referenzsubstanzen (6.6), der Proben (8.2) und der Verdünnungsreihen der Proben (Anhang C) bei $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ temperieren.

Die Testbedingungen so wählen, dass die Temperaturabweichung im Thermoblock in einem Test höchstens $\pm 0,3^\circ\text{C}$ beträgt.

9.1.2 Herstellung der Testsuspensionen

Die Vorratssuspensionen der Leuchtbakterien für den Test nach den Anweisungen für frisch gezogene Bakterien (ISO 11348-1), flüssig getrocknete Bakterien (ISO 11348-2) oder gefriergetrocknete Bakterien (ISO 11348-3) herstellen.

Die Testsuspension für den kinetischen Test z. B. nach ISO 11348-3:2007, 8.3.3, Variante B, herstellen, bei der die Testsuspension außerhalb der Teströhrchen angesetzt wird. Zur Herstellung der Testsuspension die rekonstituierte Bakteriensuspension vor Testbeginn mit Lösung (6.5) verdünnen.

Die Leuchtbakterien-Testsuspension für die Messung (Zelldichte etwa 2×10^6 Zellen/ml) bei $(4 \pm 3)^\circ\text{C}$ aufbewahren. Die Suspension ist nach einer Mindestaufbewahrungszeit von 30 min im Kühlschrank gebrauchsfertig und kann für Testzwecke genutzt werden, solange die in Abschnitt 12 aufgeführten Gültigkeitskriterien eingehalten werden.

Vor dem Start der Messung die Testsuspension mindestens 30 min bei $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufbewahren.

9.2 Testdurchführung

Je Verdünnungsstufe zwei oder drei parallele Ansätze bei einer Testtemperatur von $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ bestimmen.

Das zuzugebende Volumen von 500 µl bis 800 µl (entsprechend dem Probenvolumen) einstellen und den Dispenser mit der *Vibrio fischeri*-Bakterientestsuspension befüllen.

Die Proben gut mischen (7.9) und 200 µl bis 500 µl jeder gut gemischte Probe, je nach verwendetem Gerät in die Teströhrchen des Luminometers oder die Wells der Mikrotiterplatte, pipettieren. Wenn die Probe grobe Partikel enthält, kann das Abschneiden des dünnen Endes der Pipettenspitze das Pipettieren erleichtern. Pipettenspitzen mit einer weiteren Auslauföffnung sind auch im Handel erhältlich.

Das Teströhrchen (oder die Mikrotiterplatte) mit der Probe ins Luminometer stellen und den Testdurchlauf mit Zugabe der *Vibrio fischeri*-Bakteriensuspension in das Teströhrchen starten. Den maximalen Leuchtintensitätswert der Testsuspensionen während der ersten 5 s des Kontakts messen und aufzeichnen (mindestens 5 Messungen je Sekunde). Die höchste Leuchtintensität ist der Spitzenwert, I_p . Unmittelbar nach der Messung das Teströhrchen in den Inkubator zurückstellen und das nächste Teströhrchen messen. Diesen Vorgang für jeden Testansatz und Kontrolle wiederholen. Wenn ein Mikrotiterplattenreader verwendet wird, die Kontrollen und die Verdünnungsreihen der Proben unmittelbar vor der Überführung der Platte in den Inkubator messen. Während der Inkubation die Teströhrchen bei $(15 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufbewahren.

Die Leuchtintensität wahlweise nach 5 min, I_5 , und erneut nach 15 min, I_{15} , und nach 30 min, I_{30} , bestimmen und protokollieren. Die Proben vor jeder Messung durch Schütteln mit der Hand mischen. Den Vorgang für jede Kontrolle und Probe wiederholen.

Zeitabstände von 30 s zwischen den Proben haben sich als angemessen erwiesen, damit genügend Zeit für die Messung und den Wechsel der Teströhrchen zur Verfügung steht.

10 Auswertung

10.1 Hemmwirkung auf die Leuchtbakterien

Aus den gemessenen Leuchtintensitäten der Kontrollansätze den Korrekturfaktor, f_{kt} -Wert, für die Kontaktzeit (5 min, 15 min oder 30 min) nach Gleichung (1) berechnen. Hiermit werden die Ausgangsleuchtintensitäten, I_p , aller Testansätze korrigiert, bevor diese als Bezugswerte zur Bestimmung der durch die Probe bedingten Abnahme der Leuchtintensität verwendet werden können.

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_p} \quad (1)$$

Dabei ist

I_{kt} die Leuchtintensität des Kontrollansatzes nach einer Kontaktzeit von 5 min, 15 min oder 30 min, in relativen Leuchteinheiten;

I_p die maximale Leuchtintensität (Spitzenwert) in der Kontrollansatzsuspension unmittelbar nach Zugabe der Bakterien zur Probe in relativen Leuchteinheiten.

Den Mittelwert des Korrekturfaktors $\bar{f}_{kt}$ berechnen. Die Abweichung der Einzelmessungen vom Mittelwert, angegeben in Prozent mit einer signifikanten Stelle, nach Gleichung (2) berechnen:

$$\left[\frac{(\bar{f}_{kt} \pm f_{kt,i})}{\bar{f}_{kt}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Dabei ist $f_{kt,i}$ einer der beiden Einzelwerte des Korrekturfaktors.

Den korrigierten Wert für I_p für die Teströhrchen des Testansatzes (korrigierter Spitzenintensitätswert), I_{ct} , nach Gleichung (3) berechnen:

$$I_{ct} = I_p \cdot \bar{f}_{kt} \quad (3)$$

Dabei ist

$\bar{f}_{kt}$ der Mittelwert von $f_{kt,i}$

I_p die maximale Leuchtintensität (der Spitzenwert) der Testsuspensionsansätze unmittelbar nach Zugabe der Bakterien zur Probe, in relativen Leuchteinheiten.

Die Hemmwirkung eines Testansatzes nach Ablauf der Kontaktzeit (5 min, 15 min oder 30 min), H_t , in Prozent, nach Gleichung (4) berechnen:

$$H_t = \frac{(I_{ct} - I_t)}{I_{ct}} \times 100 \quad (4)$$

Dabei ist

I_{ct} der korrigierte Spitzenintensitätswert nach Gleichung (3);

I_t die Leuchtintensität des Testansatzes nach Ablauf der Kontaktzeit (5 min, 15 min oder 30 min), in relativen Leuchteinheiten.

Den Mittelwert der Hemmwirkung, $\bar{H}_t$, für jede Verdünnungsstufe in Prozent berechnen.

Die arithmetische Differenz, in Prozentpunkten, auf eine signifikante Stelle berechnen:

$$\bar{H}_t (\%) - H_{t,i} (\%)$$

Dabei ist

$H_{t,i}$ einer der beiden Einzelwerte der Hemmwirkung von zumindest einem Testansatz;

$\bar{H}_t$ der entsprechende Mittelwert.

10.2 Ermittlung von EC-Werten

Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung für jede Kontaktzeit mittels geeigneter linearer oder nicht-linearer Regressionsverfahren [19] berechnen.

Zur Berechnung der Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung mittels linearer Regression für jede Verdünnungsstufe der Probe nach der Kontaktzeit (5 min, 15 min oder 30 min) den Gamma-Wert (Verhältnis von Leuchtintensitätsabnahme zu verbleibender Leuchtintensität zum Zeitpunkt t), Γ_t , nach Gleichung (5) berechnen:

$$\Gamma_t = \frac{\bar{H}_t}{(100 - \bar{H}_t)} \quad (5)$$

Dabei ist

$\bar{H}_t$ der Mittelwert von H_t , berechnet nach Gleichung (4).

ANMERKUNG Ergibt eine bestimmte Testkonzentration eine Leuchthemmung von 0 % oder 100 %, dann kann der Gamma-Wert nicht berechnet werden. Es werden deshalb üblicherweise nur H_t -Werte zwischen 10 % und 90 % zur Berechnung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung verwendet.

Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung zu einer vorgegebenen Kontaktzeit lässt sich häufig durch folgende lineare Gleichung beschreiben:

$$\lg c_t = b \lg \Gamma_t + \lg a \quad (6)$$

Dabei ist

c_t der Anteil der Probe (z. B. Wasser oder Sediment) im Testansatz, in Prozent (%);

Γ_t siehe Gleichung (5);

b die Steigung der beschriebenen Geraden;

$\lg a$ der Wert des y-Achsenabschnittes der beschriebenen Geraden.

Mithilfe der Statistik der kleinsten Fehlerquadrate die EC_{20} - und EC_{50} -Werte mit den zugehörigen Vertrauensgrenzen ermitteln, wobei gilt

$$c_t = EC_{20t} \quad \text{bei} \quad \Gamma_t = 0,25$$

$$c_t = EC_{50t} \quad \text{bei} \quad \Gamma_t = 1,00$$

Für nicht-lineare Regressionsanalysen gibt es verschiedene Standard-Graphik- oder Statistik-Software-Pakete. Üblicherweise beruhen diese auf Funktionen für die Normalverteilung (z. B. Probit-Analyse), Logit-Verteilung (z. B. Logit-Analyse) oder Weibull-Verteilung (z. B. Weibull-Analyse). Berechnete Hemmwirkungen, H_t , können direkt verwendet werden, um Parameter der nicht-linearen Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zu schätzen, aus denen dann EC-Werte für jeden Bereich abgeleitet werden können [19].

Kann die Kurve rechnerisch an den Bereich der Wertepaare nicht angeglichen werden, können die EC-Werte unter Verwendung eines doppelt-logarithmischen Koordinatensystems graphisch ermittelt werden.

11 Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse entsprechend dem Beispiel in Tabelle 1 angeben.