

Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38 412 - L33)

1 Arbeitsgrundlagen

- DIN 38 402- A 11; Probenahme von Abwasser (Dezember 1995)
- DIN 38 402- A 30; Vorbehandlung, Teilung und Homogenisierung heterogener Wasserproben (Sept. 1997)
- DEV L 1; Allgemeine Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer Testverfahren (37. Lieferung 1997)
- DIN 38 412- L 33; Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (März 1989)

AQS-Merkblätter
für die Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
Herausgegeben von der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA)
Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., Berlin 1991

2 Zweck

Zur Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen ist nach o.g. Norm zu verfahren. Das vorliegende Merkblatt legt verbindliche Maßnahmen zur analytischen Qualitätssicherung (AQS) fest und enthält Ergänzungen und Hinweise für die praktische Durchführung.

3 Algenstammkultur

- Die Bezugsquelle und das Bezugsdatum sowie die Art der Stammkulturhaltung sind anzugeben.

Anmerkung 1: *Für die Stammkulturhaltung hat sich die Kultur auf festem Agar bewährt. Die Zusammensetzung eines geeigneten Nährbodens wird auf Anfrage von der Stammsammlung in Göttingen (Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen, Nikolausberger Weg 18, 37073 Göttingen) verschickt.*

Als Medien für die Flüssigkulturhaltung können z.B. ein Medium nach Kuhl (1962) oder das Medium Nr. 12 nach Chu (1942) (s. Anhang) verwendet werden

- Beim Überimpfen der Stammkulturen ist eine mikroskopische Prüfung auf abnorme Zellen, Fremdalgen und bakterielle Verunreinigungen durchzuführen. Gegebenenfalls muß mit einer neuen Kultur begonnen werden.

4 Probenahme

Für die Probenahme und den Transport sollten Gefäße aus Glas verwendet werden. Müssen die Proben eingefroren werden, können Gefäße aus Polypropylen oder Polyethylen eingesetzt werden.

5 Probenkonservierung

Die nach Pkt. 4 erhaltene Probe soll möglichst bald nach der Entnahme getestet werden. Eine Konservierung darf nur durch Kühlen (0 - 5 °C) für weniger als 2 Tage erfolgen. Ist eine längere Probenaufbewahrung nicht zu vermeiden, kann die Probe bei ≤ -18 °C bis zu 2 Monate gefroren werden. Es kann sinnvoll sein, die Probe nach Homogenisierung (siehe 6.) in Teilproben abzufüllen und die Teilproben tiefzufrieren, wenn ggf.

nach Vorliegen des Testergebnisses weitere Verdünnungsstufen zur Ermittlung des G_A -Wertes getestet werden müssen.

Konservierungsmaßnahmen sind zu dokumentieren.

6 Probenvorbehandlung

- Tiefgefrorene Proben müssen vor der Weiterverarbeitung unbedingt vollständig aufgetaut werden, da Konzentrierungseffekte im Innern der Probe auftreten. Das Auftauen tiefgefrorener Proben kann z.B. in einem maximal 40 °C warmen Wasserbad erfolgen. Gelegentliches sanftes Schütteln der Probe wird empfohlen.
- Die Probe wird nach DIN 38 402 - A 30 (Sept. 1997) homogenisiert.
- Der pH-Wert des Abwassers vor Testbeginn wird dokumentiert.
- Falls erforderlich, wird das Abwasser vor Ansatz der Verdünnungen durch Zusatz von Salzsäure oder Natronlauge auf einen pH-Wert von $7,0 \pm 0,2$ eingestellt. Die Konzentration der zur Neutralisation erforderlichen Säure oder Base ist so zu wählen, daß das zuzugebende Volumen möglichst klein ist. Eine Über- oder Unterschreitung des Neutralpunktes ist zu vermeiden.
- Sind im Abwasser störende ungelöste Stoffe (grobe Bestandteile) enthalten, bleibt die Probe 1 Stunde stehen. Das überstehende Wasser wird für den Test verwendet.
- Die nach Pkt. 5 konservierte Probe (oder ein für den Test benötigtes Aliquot) muß vor dem Test auf eine Temperatur von 20 ± 1 °C gebracht werden.

7 Algenkultur

- Die Methode zur Ermittlung der Zellkonzentration für die Einsaat ist anzugeben. Bei Einrichtung des Tests sowie bei Veränderungen in der Anzucht der Algen oder Veränderungen an Meßgeräten sind Kalibrierungen der gewählten Methode vorzunehmen und zu dokumentieren.
- Das Impfmateriale für die Testkultur soll während der exponentiellen Wachstumsphase der Algenvorkultur entnommen werden. Es ist deshalb zu überprüfen, wie lange sich die Algen in der Vorkultur unter den Bedingungen des jeweiligen Labors in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Bei Einrichtung des Algentests und nach Veränderung der Anzuchtbedingungen sollten deshalb sowohl für die Vorkultur als auch für die Testkultur Wachstumskurven aufgenommen werden.
- Das Datum des Ansatzes der Vorkultur ist anzugeben.
- Der Verdünnungsfaktor der Vorkultur für den Testansatz ist anzugeben.

8 Inkubation

- Bei Raumklimatisierung ist auf eine ausreichende Luftzirkulation im Bereich der Inkubationseinrichtung zu achten, da lokal Erwärmungen z.B. durch Leuchtstofflampen und Schüttler hervorgerufen werden können.
- Da bereits geringe Unterschiede in der Temperatur oder der Raumbelichtungsstärke zwischen einzelnen Stellplätzen zu Abweichungen im Wachstum identischer Ansätze führen können, ist eine Überprüfung entsprechend Punkt 11.2 der Norm bei Veränderungen an der Inkubationseinrichtung, mindestens aber halbjährlich durchzuführen und zu dokumentieren.
- Die Einhaltung der Inkubationstemperatur von 23 ± 2 °C, wobei die Temperaturabweichungen während des Tests nicht mehr als ± 1 °C betragen dürfen, ist zu überprüfen und zu dokumentieren. In der Regel ist die Kontrolle in geeigneten Referenzgefäßen hinreichend. Zur Kontrolle können Minimum-Maximum-Thermometer verwendet werden. Dann genügt die Angabe der Minimum- und Maximum-Temperatur.
- Die Chlorophyll-Fluoreszenz im Kontrollansatz muß sich innerhalb von 72 h um mind. das 30fache erhöht haben. (*Gültigkeitskriterium*)

Anmerkung 2: *Die Erhöhung der Chlorophyll-Fluoreszenz sollte den Faktor 100 nicht überschreiten, da dann die Eigenbeschattung der Algen und Nährstoffmangel evtl. kein logarithmisches Wachstum mehr zulassen.
Wird die im Labor übliche Vermehrung der Testalgen bei sonst unveränderten Testbedingungen nicht mehr erreicht, kann ggf. ein Austausch der Leuchtstoffröhren Abhilfe schaffen.*

9 Durchführung

- Die Inkubationsdauer von 72 Stunden darf um nicht mehr als eine halbe Stunde über- oder unterschritten werden.
- Die Zeitdifferenz zwischen der Entnahme der Proben aus der Inkubationseinrichtung und der Vermessung derselben sollte möglichst kurz sein; die Messung muß zügig erfolgen.
- Da die Algen durch das Meßlicht geschädigt werden können, ist auf konstante und möglichst kurze Meßzeiten zu achten.
- Bei Verwendung von Fluorimetern mit Standküvetten ist sicherzustellen, daß die Algensuspension während der Messung homogen bleibt, z.B. durch permanente Durchmischung mittels Magnetrührer.
- Wenn Linearität zwischen Zellkonzentration und Fluoreszenzsignal nicht mehr gegeben ist, ist eine Küvette mit angepaßter Schichtdicke einzusetzen oder eine Quenchkorrektur durchzuführen.

10 Auswertung

- Bei den Kontrollansätzen darf die Abweichung des höchsten und des niedrigsten Wertes von ihrem Mittelwert bei Tests mit 2 Kontrollansätzen nicht mehr als $\pm 7,5\%$ betragen. Werden mehr als 2 Kontrollansätze angesetzt, so muß der Variationskoeffizient $v \leq 0,075 \cdot \sqrt{n/(n-1)}$ sein. (*Gültigkeitskriterium*)
- Eine Eigenfluoreszenz des Abwassers kann zu Störungen des Verfahrens führen.
- Das Ausmessen aller Testansätze vor Versuchsbeginn ist bei Proben mit hoher Eigenfluoreszenz erforderlich. Es empfiehlt sich, Verdünnungen der Abwasserproben mit zu inkubieren, am Versuchsende deren Fluoreszenz zu ermitteln und diese von denen der Testansätze mit Abwasser abzuziehen. Gegebenenfalls ist auf eine andere Methode zur Bestimmung der Algenbiomasse (z.B. Zellzählung) zurückzugreifen.

11 Referenzsubstanz

Parallel zu jeder Testserie sind Testansätze mit Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) als Referenzsubstanz mit zu testen. Sie dienen dem Ausschluß ungeeigneter Algen und als Hinweis auf mögliche Störungen im Testablauf. Für Referenzansätze mit einer Konzentration von $0,5\text{ mg/l } K_2Cr_2O_7$ wird die Hemmwirkung auf die Biomasseproduktion von *Scenedesmus subspicatus* in %, ausgedrückt als Veränderung der Chlorophyll-Fluoreszenz nach 72 Stunden entsprechend DIN 38 412 - L 33 ermittelt. Es wird empfohlen, den Stammansatz mit einer Titerlösung $K_2Cr_2O_7$ herzustellen. Für den Stammansatz und die im Test einzusetzende Konzentrationsstufe wird A. bidest. verwendet, eine pH-Wert-Einstellung unterbleibt. Der Testansatz soll entsprechend Tabelle 4 der Norm 80 Volumenanteile Kaliumdichromat-Lösung, 10 Volumenanteile Nährlösung und 10 Volumenanteile Inokulum enthalten. Die ermittelte Wirkung ist zu protokollieren.

Der Test ist gültig, wenn $0,5\text{ mg/l } K_2Cr_2O_7$ im Testansatz 30 % bis 80 % Hemmung verursachen. (*Gültigkeitskriterium*)

Anhang

Geeignete Nährmedien zur Stammkulturhaltung von *Scenedesmus subspicatus*

Nährmedium nach Kuhl

(Kuhl, A. (1962): in Deutsch. Bot. Ges. (Edit.), Beiträge zur Physiologie und Morphologie der Algen, S. 157-166, Fischer Verlag, Stuttgart)

Das Nährmedium nach Kuhl wird aus 7 konzentrierten Stammlösungen und A. bidest. zubereitet.

Stammlösungen			Gebrauchslösung
1.	101,1 g/l	KNO ₃	10 ml
2.	62,1 g/l	NaH ₂ PO ₄ * 1 H ₂ O	10 ml
3.	8,9 g/l	Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	10 ml
4.	24,65 g/l	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	10 ml
5.	1,47 g/l	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 ml
6.	6,95 g/l	FeSO ₄ * 7 H ₂ O (Fe-EDTA-Komplex) *)	1 ml
7.	Spurenelemente (zusammen in einer Stammlösung)		1 ml
	61 mg/l	H ₃ BO ₃	
	169 mg/l	MnSO ₄ * 1 H ₂ O	
	287 mg/l	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	
	2,5 mg/l	CuSO ₄ * 5 H ₂ O	
	12,5 mg/l	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	

Herstellen des gebrauchsfertigen Mediums :

Von den Stammlösungen 1 - 5 werden jeweils 10 ml, von der Stammlösung 7 jeweils 1 ml in einen Meßkolben mit ca. 500 ml A. bidest. pipettiert. Anschließend wird mit A. bidest. auf 1000 ml aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren (20 min. bei 120 °C) und Abkühlen wird 1 ml der Stammlösung 6 hinzugegeben. Das sterilisierte Nährmedium kann über einige Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

*) Herstellung des Fe-EDTA-Komplexes:

0,69 g FeSO₄ * 7 H₂O und 0,93 g Na₂-EDTA werden in 80 ml A. bidest durch kurzes Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Lösung auf 100 ml aufgefüllt. Aufbewahrung kühl und dunkel. 1 ml enthält die o.g. Eisenkonzentration.

Anhang

Geeignete Nährmedien zur Stammkulturhaltung von *Scenedesmus subspicatus* (Fortsetzung)

Nährmedium nach Chu

Das Nährmedium Nr. 12 nach Chu (Journal of Ecology 30, 284-325, 1942) wird aus 8 konzentrierten Stammlösungen und A. bidest. zubereitet.

Stammlösungen		Gebrauchslösung
1.	3,0 g/l Ca(NO ₃) ₂	10 ml
2.	0,5 g/l K ₂ HPO ₄	10 ml
3.	7,5 g/l MgSO ₄ * 7 H ₂ O	10 ml
4.	2,5 g/l K ₂ SiO ₄	10 ml
5.	0,5 g/l KCl	10 ml
6.	2,0 g/l Na ₂ CO ₃	10 ml
7.	0,05 g/l FeCl ₃ * 6 H ₂ O	10 ml
8.	Spurenelemente (zusammen in einer Stammlösung)	1 ml
2	mg/l ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	
2	mg/l MnSO ₄ * 4 H ₂ O	
2	mg/l Na ₂ SiO ₃	
2	mg/l AlCl ₃	
2	mg/l H ₃ BO ₃	
1	mg/l LiCl	
1	mg/l CoCl ₂ * 6 H ₂ O	

Herstellen des gebrauchsfertigen Mediums :

Von den Stammlösungen 1-7 werden je 10 ml, von der Stammlösung 8 wird je 1 ml in einen Meßkolben mit ca. 500 ml A. bidest pipettiert. Anschließend wird mit A. bidest auf 1000 ml aufgefüllt.

Nach dem Autoklavieren (20 min. bei 120 °C) und Abkühlen kann das sterilisierte Nährmedium über einige Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

TESTPROTOKOLL (Mindestangaben)**ALGENTEST** nach DIN 38 412 - L33_____
Untersuchungsstelle

Angaben zur Probe:	
Probenahmestelle:	
Probenehmer:	Proben-Nummer:
Probenahme-Datum:	Probenahme-Uhrzeit:
Sonstige Angaben zur Probe (z.B. pH, Leitfähigkeit, Geruch, Trübung, Färbung):	

Probenvorbehandlung:					
Konservierung der Probe:				pH-Wert:	
keine	gekühlt	eingefroren am:	aufgetaut am:	pH-Einstellung auf:	pH-Einstellung mit:
Homogenisierung der Probe durch:				Abgesetzt:	<input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja

Algenstammkultur			
Bezugsquelle:	Bezugsdatum:	Art der Stammkulturhaltung:	Medium:

Testvorbereitungen:				
Ansatzdatum der Vorkultur:	Zellen/ml:	Verdünnungsfaktor der Vorkultur für den Testansatz:	Zellen/ml im Test:	Ermittlung der Zellkonzentration mittels:

Referenzsubstanz Kaliumdichromat:				
(Titer)lösung:	Konzentration:	Ansatzdatum:	Zwischenverdünnung:	Datum:
	(mg/l)		(mg/l)	

Testdurchführung:	
Eigenfluoreszenz der Probe (F _E):	Ausgangsfluoreszenz der Kontrolle beim Testansatz F _K (t=0h):

Testbeginn Datum/Uhrzeit: _____ / _____ Handzeichen _____

TESTPROTOKOLL (Mindestangaben) Fortsetzung

ALGENTEST nach DIN 38 412 - L33

Versuchsauswertung:

Testende: Datum/Uhrzeit: _____ / _____

Temperatur: Minimum: _____ °C Maximum: _____ °C

Kontrolle	Fluoreszenz F_K	Mittelwert F_K	Erhöhung der Chlorophyllfluoreszenz	Variationskoeffizient
Verdünnungs- stufe G	Fluoreszenz F_G	Hemmwirkung H_F (%)	Mittelwert H_F (%)	
Referenzsubstanz $K_2Cr_2O_7$ 0,5 mg/l				

$$H_F = \frac{F_K - F_G}{F_K}$$

H_F = Hemmwirkung auf die Biomasseproduktion in %, ausgedrückt als Minderung der Chlorophyll-Fluoreszenz

F_K = gemessene Chlorophyllfluoreszenz im Kontrollansatz

F_G = gemessene Chlorophyllfluoreszenz im Testansatz

Erhöhung der Chlorophyllfluoreszenz: $F_K(t = 72 \pm 0,5 \text{ h}) / F_K(t = 0 \text{ h})$, (mindestens 30)

Gültigkeitskriterien erfüllt: ja nein

Bemerkungen: _____

Ergebnis: $G_A =$

Testauswertung _____

Datum, Unterschrift