

**Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die
Lichtemission von *Vibrio fischeri* - (Leuchtbakterientest)
Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien nach DIN EN ISO 11348-1, Stand Mai 2009**

1 Arbeitsgrundlagen

- DIN 38 402 - A11; Probenahme von Abwasser (Februar 2009)
- DIN EN ISO 5667-16 - L1; Allgemeine Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer Testverfahren (Februar 1999)
- DIN EN ISO 11348-1 - L51; Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) - Teil 1: Verfahren mit frisch gezüchteten Bakterien (Mai 2009)
- AQS-Merkblätter für die Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
Herausgegeben von der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA)
Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., Berlin 1991

Weitere Literatur siehe Abschnitt 11

2 Zweck

Das vorliegende Merkblatt enthält Ergänzungen und Hinweise für die praktische Durchführung des Tests zur Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von frisch gezüchteten Leuchtbakterien (*Vibrio fischeri* NRRL B-11177, ehemals als *Photobacterium phosphoreum* und jetzt als *Aliivibrio fischeri* (Beijerinck 1889) Urbanczyk et al. 2007 neu klassifiziert). Es legt außerdem verbindliche Maßnahmen zur analytischen Qualitätssicherung (AQS) und analytischen Qualitätskontrolle fest.

Für die Abwassertestung ist Annex B der Norm zu beachten. Dort ist die Verdünnungsfolge (G-Stufen in 2er und 3er Systematik) vorgegeben sowie die Inkubationszeit von 30 min festgeschrieben.

Für andere Anwendungsbereiche sind ggf. die dort getroffenen Festlegungen im Hinblick auf die pH-Wert-Einstellung des Probengutes, auf die zu testende Verdünnungsfolge und die Inkubationsdauer zu berücksichtigen.

Annex D ist anzuwenden bei der Untersuchung von marinen und Brackwasserproben sowie den entsprechenden Porenwässern und Eluatzen, da diese eine andere Ionenzusammensetzung aufweisen.

Bei salzbelasteten Proben aus dem nicht marinen oder Brackwasserbereich ist die unter 7.2 der Norm und Punkt 5 des Merkblattes beschriebene Vorgehensweise anzuwenden.

Störungen

Ammonium und H₂S in Umweltproben können zu einer Hemmung des Leuchtens führen. Ihr Einfluss im Leuchtbakterientest wurde in verschiedenen Studien ermittelt [1, 2, 3, 4]. Da in diesen Studien unterschiedliche Versuchsbedingungen (z.B. Inkubationszeiten, pH-Werte) gewählt wurden, werden hier keine Orientierungswerte für die Untersuchung gemäß ISO 11348-1 angegeben. Im Einzelfall wäre bei der Beurteilung der Ergebnisse zu prüfen, inwieweit Störungen durch Ammonium oder H₂S in den betrachteten Verdünnungsstufen nach Probenaufarbeitung vorliegen.

Bei einer hohen Belastung mit leicht abbaubaren Stoffen kann eine nährstoffbedingte Verminderung der Biolumineszenz auftreten; derartige Effekte sind mit Vorsicht zu interpretieren. (vgl. [5]). Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, dass derartige Stoffe im (Roh)Abwasser bei der Herstellung der Testansätze mit verdünnt werden.

3 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.

Das Gesamtprobenvolumen sollte ausreichend sein, um etwaige Wiederholungsuntersuchungen zu erlauben.

4 Probenkonservierung

Die nach Abschnitt 7 der Norm erhaltene Probe soll möglichst bald nach der Entnahme getestet werden.

Eine Konservierung darf nur durch Kühlen der Probe bei 2 - 5 °C für maximal 48 h im Dunkeln erfolgen. Die Kühlung soll möglichst bald nach der Probenahme einsetzen. Dies kann auch bereits vor Ort erfolgen, z.B. in Kühlboxen mit Eis oder in einem Fahrzeug-Kühlschrank.

Ist eine längere Probenaufbewahrung nicht zu vermeiden, kann die Probe bei ≤ -18 °C bis zu 2 Monate tiefgefroren werden. Aufgrund der Volumenvergrößerung beim Einfrieren sollen die Probengefäße dann nicht vollständig gefüllt werden. Ein Einfrieren sollte so schnell wie möglich nach der Probenahme erfolgen. Die Zeitspanne zum Einfrieren und Auftauen sollte so gering wie möglich sein, indem das Probenvolumen, d.h. die Größe des Gefäßes, minimiert wird. Im Allgemeinen ist es angemessen, zum Einfrieren maximal 1 l - Gefäße zu verwenden.

Proben aus Kühlwassersystemen, bei denen Biozide mit schneller Abklingkurve eingesetzt wurden, sind schnellstmöglich zu untersuchen oder sofort nach der Probenahme einzufrieren.

Eine weitere Probenvorbehandlung (z.B. Neutralisation und Aufsalzung) unterbleibt im Falle des Einfrierens. Es kann sinnvoll sein, die Probe nach Homogenisierung (s. Abschnitt 5) in Teilproben tiefzugefrieren. Zusätzlich eingefrorene Teilproben sollten bis zur endgültigen Auswertung aufbewahrt werden.

Konservierungsmaßnahmen sind zu dokumentieren.

5 Probenvorbehandlung

Das Auftauen tiefgefrorener Proben kann am Testtag bis zum vollständigen Auftauen z.B. in einem maximal 30 °C warmen Schüttel-Wasserbad (lokale Überhitzungen vermeiden) oder über Nacht im Kühlschrank erfolgen. Vollständiges Auftauen ist notwendig, da beim Einfrieren Konzentrierungseffekte im Innern der Probe, das zuletzt durchfriert, auftreten können. Eine Mikrowellenbehandlung ist nicht zulässig. Die aufgetaute und gegebenenfalls aufbereitete Probe soll bis zur Testung im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Die Probenvorbehandlung erfolgt direkt nach dem Auftauen am Testtag.

Die Probe wird nur durch Schütteln per Hand oder per Magnetrührer homogenisiert.

Der O₂-Gehalt der unverdünnten homogenisierten Probe wird gemessen und dokumentiert. Nur bei O₂-Gehalten der Probe unter 3 mg/l ist eine Belüftung zulässig. Dabei besteht die Gefahr, dass leichtflüchtige Stoffe aus der Probe gestriipt werden oder pH-Wert-Verschiebungen auftreten. Für die Belüftung darf nur saubere, ölfreie Druckluft verwendet werden oder der Sauerstoffeintrag erfolgt durch Rühren bis zur Erreichen eines Sauerstoffgehaltes > 3 mg/l. Eine Übersättigung ist zu vermeiden.

Alternativ kann für die Herstellung von Verdünnungsstufen für $G > 2$ die als Verdünnungswasser verwendete NaCl-Lösung belüftet werden.

Leitfähigkeit und pH-Wert der Probe werden ermittelt und dokumentiert.

Falls eine Anpassung des pH-Wertes erforderlich ist, wird ein für den Test benötigtes Aliquot der homogenisierten Probe entnommen und der pH-Wert mit HCl oder NaOH eingestellt. In Abhängigkeit vom Anwendungsbereich wird der pH-Wert auf $7,0 \pm 0,2$ eingestellt oder bei einem pH-Wert > 8,7 auf $8,5 \pm 0,2$ und bei einem pH-Wert < 5,8 auf einen pH-Wert von $6,0 \pm 0,2$ eingestellt. Die Konzentration der Säure bzw. Lauge ist so zu wählen, dass das zugegebene Volumen 5% des Gesamtvolumens nicht überschreitet.

Bei der pH-Wert-Einstellung ist eine Übertitration zu vermeiden. Bei einer Übertitration ist mit der homogenisierten Originalprobe rückzutitrieren. Ausfällungen während der pH-Wert-Anpassung sind zu dokumentieren. Der Überstand wird für den Test verwendet.

Die Probe wird nur mit festem NaCl aufgesalzen, um Verdünnungen des Probengutes durch die Salzlösung auszuschließen. Hyperosmotische Effekte durch die Aufsalzung sind zu vermeiden.

Durch eine Leitfähigkeitsmessung vor der Aufsalzung ist zu ermitteln, ob die Probe einen erhöhten Elektrolytgehalt aufweist. Die Leitfähigkeit ist jedoch kein unmittelbares Maß für den osmotischen Druck. Sie kann daher nur Richtwerte liefern.

Bei salzbelasteten Proben, die nicht dem marinen oder Brackwasserbereich zuzuordnen sind, ist das unter 7.2 der Norm und im Annex B beschriebene Verfahren anzuwenden.

Häufig genügt folgende Vorgehensweise:

- a) Liegt die Leitfähigkeit der unverdünnten Probe unter 1.400 $\mu\text{S}/\text{cm}$, erfolgt die Aufsalzung mit 20 g/l NaCl.
- b) Liegt die Leitfähigkeit der unverdünnten Probe zwischen 1.400 $\mu\text{S}/\text{cm}$ und 35.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, erfolgt die Aufsalzung mit NaCl bis zu einer Leitfähigkeit von 34.000 – 35.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (entsprechend etwa 20 g/l NaCl).
- c) Liegt die Leitfähigkeit der unverdünnten Probe zwischen 35.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ und 55.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, unterbleibt nach DIN EN ISO 11348-1 Abschnitt 7.2 die Aufsalzung der Probe, da die Salzkonzentration der Probe bereits 20 g/l NaCl-Äquivalente übersteigt. Die Verdünnungsstufen $G > 2$ werden durch Verdünnung der Probe mit der NaCl-Lösung (Punkt 5.2 der Norm) hergestellt.
- d) Liegt die Leitfähigkeit der unverdünnten Probe über 55.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, unterbleibt ebenfalls die Aufsalzung und es wird empfohlen, für die Herstellung der ersten Verdünnungsstufen der Probe solange destilliertes Wasser anstelle einer NaCl-Lösung zu verwenden, bis die maximal verträgliche Salzkonzentration in den Testansätzen unterschritten ist. Die weiteren Verdünnungen werden mit einer NaCl-Lösung (Punkt 5.2 der Norm) angesetzt.

Die resultierende Testansatzkonzentration darf eine Leitfähigkeit von 55.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ nicht überschreiten (Orientierungswert für die Osmolarität einer 35 g/l NaCl-Lösung).

Bei der Vorgehensweise d) sind die Leitfähigkeiten der Verdünnungsstufen zu ermitteln und zu dokumentieren.

Sind im Abwasser störende ungelöste Stoffe (grobe Bestandteile) enthalten, bleibt die Probe 1 Stunde stehen. Das überstehende Wasser wird für den Test verwendet.

Falls in dieser Zeit kein Absetzen der ungelösten Teilchen erfolgt, ist folgendermaßen vorzugehen: Die Probe für max. 10 Minuten bei etwa 5000 g zentrifugieren oder die Probe filtrieren. Generell ist eine Zentrifugation einer Filtration vorzuziehen, da bei der Filtration Probleme im Zusammenhang mit Adsorption oder Auswaschung von Stoffen aus dem Filtermaterial auftreten können. Durch Vorspülen mit 2 %-iger NaCl-Lösung können mögliche Störungen durch Benetzungsmittel, z.B. bei Celluloseacetat- oder Cellulosenitratfiltern verhindert werden. Es hat sich gezeigt, dass die Verwendung von Membranfilter aus Mischestern oder aus modifizierten Polysulfonen keine Störungen in den Test einbrachten. Die grundsätzliche Eignung des Filtermaterials sollte geprüft werden, indem eine 2 %-ige NaCl-Lösung gefiltert und anschließend im Leuchtbakterientest getestet wird.

Eine weitere Probenaufbewahrung der vorbehandelten Proben im Kühlschrank für Testzwecke an Folgetagen ist nicht zulässig.

Ein Wiedereinfrieren von bereits aufgetauten Proben ist nicht zulässig.

6 Geräte

Die Küvetten sind vor Gebrauch sorgfältig auf Reinheit und Materialfehler (Risse, Bläschen) zu kontrollieren. Küvetten verschiedener Hersteller dürfen nicht gemischt werden. Küvetten sind nur einmalig zu verwenden.

Die maximal zulässige Temperatur-Spanne der Stellplätze eines Thermoblocks (Inkubators) von 0,6 °C im Bereich zwischen 14 °C und 16 °C ist auch bei hohen Umgebungstemperaturen zu gewährleisten. Dies ist in regelmäßigen Abständen zu überprüfen und zu dokumentieren.

Um die Einhaltung der Inkubationstemperatur von $15 \pm 1^\circ\text{C}$ zu gewährleisten, ist bei der Aufstellung des Thermoblocks zu beachten, dass einseitige Erwärmungen, z.B. im Sommer (Fensterseite) oder im Winter (Heizung) vermieden werden.

Die Einschwingzeit bis zur Temperaturkonstanz im Thermoblock ist einzuhalten.

Wenn mehrere Thermoblocke gleichzeitig für Tests verwendet werden, müssen in jedem Thermoblock parallel zu den Testansätzen Kontrollansätze mitgeführt werden.

Bei hoher Luftfeuchtigkeit kann es durch Kondenswasser an den Küvetten zur Störung der Messung kommen.

Anhand der Messung der absoluten Leuchtintensität der Ansätze können gravierende Leuchtkraftunterschiede der Bakterienpräparate und –chargen erkannt werden. Bei Geräten, die die Leuchtintensität der Kontrollansätze automatisch auf den Wert 100 setzen und I_0 -Werte nur prozentual zu den Kontrollen ausgeben, empfiehlt sich, falls gerätetechnisch möglich, eine Nachrüstung der Geräte.

7 Testbakterien

7.1 Stammhaltung

Anmerkung 1: *Die Testdurchführung mit frisch gezüchteten Bakterien sollte nur in Laboratorien erfolgen, die über entsprechende Ausrüstungen und Erfahrungen für steriles Arbeiten mit Mikroorganismen verfügen.*

- Der vorgeschriebene Leuchtbakterienstamm ist unter der Nr. 7151 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), 38124 Braunschweig, Inhoffenstr. 7b, hinterlegt.
- Bei dem Bakterienstamm handelt es sich um Bakterien der Risikogruppe 1 (kein Risiko für Personal beim Umgang mit diesen Bakterien). Zum Schutz des Bakterienstammes vor Fremdinfection müssen jedoch grundsätzliche Arbeitsregeln der Mikrobiologie, besonders in Bezug auf Ausstattung der Laborräume und des Arbeitsplatzes, sowie des sterilen Arbeitens im Umgang mit dem Bakterienstamm (Stammhaltung, Isolierung, Kultivierung, Überprüfung der Reinkultur etc.) beachtet werden [6, 7].
- Bei der Lagerung der Bakterien im Labor ist darauf zu achten, dass die Kühlkette nicht unterbrochen wird.

Anmerkung 2: *Die DSMZ verschickt lyophilisierte Bakterien und gibt auf ihrer Homepage Informationen zur weiteren Kultivierung..*

- Mehrfach fraktionierte Ausstriche sind für die Gewinnung einer Reinkultur leuchtender Bakterien notwendig.

7.2 Testkulturen

- Die Herkunft der Leuchtbakterien sowie das Bezugsdatum und die Lagerungsbedingungen sind anzugeben.
- Der Hersteller bzw. Vertreiber sowie die Charge und das Bezugsdatum des verwendeten Rinderserumalbumins, des Casein-Peptons und des Hefeextraktes sind anzugeben.

Hinweis: Bewährt haben sich Bacto-Pepton (No. 0118) und Hefeextrakt (No. 0127) der Fa. DIFCO, sowie Rinderserumalbumin der Fa. Sigma (Artikel A - 2153).

- Für die nach den Abschnitten 8.2 und 8.3 der Norm geforderte Trübungsmessung ist die DIN EN ISO 7027: 2000-04 zu beachten.
- Es ist unbedingt darauf zu achten, dass das Schutzmedium vorgekühlt ist.
- Bei Passagen zwischen Vor- und Hauptkultur sollten Temperatursprünge zwischen den Medien vermieden werden.
- Die Vorratssuspensionen nach Abschnitt 8.4 der Norm sind bei ≤ -20 °C aufzubewahren. Bei der Lagerung im Labor ist darauf zu achten, dass die Kühlkette nicht unterbrochen wird.

8 Testdurchführung

Aufgetaute Bakterien dürfen nicht wieder eingefroren und für weitere Tests verwendet werden.

Der Zeitpunkt des Auftauens der Bakterien ist zu dokumentieren.

Die Angleichzeit nach Herstellung der Testsuspensionen muss mindestens 15 Minuten betragen und sollte 30 Minuten nicht überschreiten.

Der Zeitpunkt des Testbeginns ist zu dokumentieren.

Wenn bei gefärbten Proben bei der Testung nach Annex B der Norm in den beiden für den G_{1b} -Wert relevanten Verdünnungsstufen oder bei EC-Wert-Auswertungen im Bereich der betrachteten EC-Werte noch eine farbbedingte Beeinflussung des Messergebnisses möglich erscheint, ist eine Farbkorrektur, z.B. mit speziellen Farbkorrekturküvetten nach Annex A der Norm, durchzuführen (s. a. [8]). Die Verwendung von Geräten mit automatischer Farbkorrektur [9] ist zulässig. Die Art der Farbkorrektur ist im Testprotokoll zu dokumentieren.

9 Gültigkeitskriterien

9.1 Referenzsubstanzen

Es wird empfohlen, die Stammsätze der Referenzsubstanz-Lösungen für Zinksulfat-Heptahydrat und Kaliumdichromat mit Titerlösungen herzustellen.

ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	z.B. Titrisol-Lösung (Merck) 28,754 g/l für 1000 ml ergibt 0,1 N Lösung, daraus durch Verdünnungsschritte mit 2%-NaCl-Lösung eine Lösung mit 219,8 mg/l ZnSO ₄ × 7 H ₂ O herstellen.
K ₂ Cr ₂ O ₇	z.B. Titrisol-Lösung (Merck) 4,903 g/l für 1000 ml, 0,1 N, 1/60 Mol/l, daraus durch Verdünnungsschritte mit 2%-NaCl-Lösung eine Lösung mit 22,6 mg/l K ₂ Cr ₂ O ₇ herstellen.

3,5-Dichlorphenol wird in unterschiedlichen Qualitäten angeboten. Für den Einsatz als Referenzsubstanz ist eine Reinheit > 99% gefordert. Es empfiehlt sich die Herstellung einer Stammlösung (ohne Lösungsvermittler!), aus der für den aktuellen Test die Testlösung durch Verdünnung hergestellt wird.

Bei jeder Bakteriencharge sind nach Herstellung Testansätze mit allen 3 Referenzsubstanzen zu testen. Dies kann z.B. im Rahmen der Testung der ersten Probenserie mit den neuen Bakterien erfolgen.

Für Referenzansätze mit jeweils einer Konzentration (Endkonzentration im Test) von

4,5 mg/l	3,5-Dichlorphenol (C ₆ H ₄ OCl ₂ , p.A.)(Reinheit > 99%)
25 mg/l	Zn(II) als Zinksulfat Heptahydrat (ZnSO ₄ × 7 H ₂ O, p.A.), (entspricht 109,9 mg/l Zinksulfat Heptahydrat)

4 mg/l Cr(VI) als Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$, p.A.)
(entspricht 11,3 mg/l Kaliumdichromat)

(Lösungen in 2% NaCl, nicht neutralisiert; einzeln prüfen)

muss die Hemmung der Lichtemission nach 30 Minuten Kontaktzeit zwischen 20 % und 80 % liegen.

Für jedes aufgetaute Bakteriensuspensionsröhrchen ist mindestens eine der drei Referenzsubstanzen mit zu testen.

Es empfiehlt sich, die Referenzsubstanzen im Wechsel einzusetzen, da dadurch eine regelmäßige Überprüfung der Charge auch nach Lagerung im Labor gegeben ist (Führung von Zielwert-Kontrollkarten).

9.2 Weitere Anforderungen

Der Mittelwert des Korrekturfaktors $\overline{f_{kt}}$ muss mindestens 0,6 betragen und darf den Wert 1,3 nicht übersteigen.

Die Abweichungen der Parallelbestimmungen von ihrem Mittelwert dürfen in den Kontrollansätzen nicht mehr als 3 % betragen: $((\overline{f_{kt}} + \overline{f_{kti}}) / \overline{f_{kt}}) \times 100 \leq 3 \%$ und $((\overline{f_{kt}} - \overline{f_{kti}}) / \overline{f_{kt}}) \times 100 \leq 3 \%$

In den Testansätzen, die zur Ermittlung des G_{10} -Werts verwendet werden, d.h. die letzte Verdünnungsstufe mit Hemmungen $\geq 20 \%$ und die erste Verdünnungsstufe mit Hemmungen $< 20 \%$, oder die den EC-Wert bestimmen, dürfen die Abweichungen der Parallelbestimmungen von ihrem Mittelwert nicht mehr als 3 Prozentpunkte betragen: $(\overline{H}_t (\%) - H_{ti} (\%)) \leq 3$ Prozentpunkte. Beispiel für nicht erfülltes Gültigkeitskriterium: s. Anhang

Anmerkung 3: *Wenn das Gültigkeitskriterium "Abweichung der Parallelbestimmungen von ihrem Mittelwert" nicht erfüllt wird, weil die Abweichung mehr als 3 % bzw. 3 Prozentpunkte beträgt, sollte zunächst die Temperatur im Thermoblock überprüft werden.*

Kontrollen über das Gesamtverfahren (kompletter Messdurchgang mit Kontrollen) sollen im Rahmen der Testetablierung und bei jeder relevanten Änderung wie Messgeräthewechsel, Wechsel der Inkubationseinrichtung oder Personalwechsel durchgeführt werden.

Werden eigene Berechnungsmakros (z.B. Excel-Tabellen) für die Testauswertung verwendet, ist anhand der Daten aus dem Musterprotokoll dieses AQS-Merkblattes zu prüfen und zu dokumentieren, ob die verwendeten Formeln zu korrekten Ergebnissen führen.

10 Dokumentation

Zur Dokumentation der Testdurchführung ist ein entsprechendes Testprotokoll (z.B. Musterprotokoll, s. S. 9 u. 10 dieses Merkblattes) anzufertigen.

11 Literatur

- [1] J.F. Postma, S. deValk, M. Dubbeldam, J.L. Maas, M. Tonkes, C.A. Schipper, B. Kater, Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53 (2002), S. 226–237
- [2] E. Küsters, F. Dorusch, R. Altenburger, Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005), S. 2621–2629
- [3] S. Zander-Hauck, R. Klopp, U. Iske, Zur Problematik von Toxizitätsgrenzwerten für Deponiesickerwässer. *Korrespondenz Abwasser* 40 (1993), S. 340-349

- [4] BUWAL 1999: Altlasten. Gefährdungsabschätzung – Anwendung ökotoxikologischer Testverfahren auf Sickerwasser und Eluate von belasteten Standorten. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Bern
- [5] E. Grabert, F. Kössler, About the effect of nutrients on the luminescent bacteria test. In: J.W. Hastings, L.J. Kricka, P.E. Stanley (Hrsg.): Bioluminescence and Chemiluminescence, Molecular Reporting with Photons. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, (1996), S. 291-294
- [6] E. Bast, Mikrobiologische Methoden - Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, 2. Aufl. 2001. Korr. Nachdruck, (2001), 425 S.
- [7] R. Fries, Qualitätssicherung im bakteriologischen Labor. Enke Verlag, Stuttgart (1995)
- [8] B. Klein, Möglichkeiten und Grenzen der Farbkorrektur im Leuchtbakterientest mit Hilfe von Absorptions-Korrektur-Küvetten. Z. Wasser-Abwasser-Forsch. 23 (1990), S. 70-74.
- [9] E. Grabert, Korrektur der absorptiven Hemmung im Leuchtbakterientest durch ein kombiniertes luminometrisches/photometrisches Verfahren. Technische Universität Berlin; Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung, Heft 8; "Neue Anwendungen der Lumineszenz in der wirkungsbezogenen Analytik", Berlin (1997), S. 37-44

Anhang

Beispiel für eine Nicht-Erfüllung der Gültigkeitskriterien bezüglich der zulässigen Abweichungen (3% bzw. 3 Prozentpunkte) der Parallelansätze.

Kontrollansätze									
Ansätze	Messwerte			\bar{f}_{K30}	Gültigkeitskontrolle		erfüllt ?		
	I_0	I_{K30}	f_{K30} (I_{K30}/I_0)		Abweichung vom Mittelwert \bar{f}_{K30} (%) ¹⁾				
50%	295	265	0,8983	0,8508	5,6	nein			
	305	245	0,8033						
Testansätze									
Ansätze	Verdün- nungs- stufe G	Messwerte			H_{30} %	\bar{H}_{30} %	Gültigkeitskontrolle		erfüllt ?
		I_0	I_{30}	I_{C30}			Abweichung vom Mittelwert in %-Punkten ²⁾		
50%									
3	2	292	195	248,4	21,5	25,1	3,6	nein	
4		285	173	242,5	28,7				
5	3	303	228	257,8	11,6	7,55	4,1	nein	
6		302	248	256,9	3,5				

1) Die prozentuale Abweichung der f_{K30} -Werte der Parallelansätze von ihrem Mittelwert
 $((\bar{f}_{K30} - I_{K30}/I_0) / \bar{f}_{K30}) \times 100$) ist ein Maß für die Schwankungsbreite der Kontrollansätze.

2) Die Abweichung der H_{30} -Werte der Parallelansätze in Prozentpunkten von ihrem Mittelwert
 $(\bar{H}_{30} - H_{30})$ ist ein Maß für die Schwankungsbreite der Testansätze.

TESTPROTOKOLL (Mindestangaben)

LEUCHTBAKTERIENTEST nach DIN EN ISO 11348-1

(mit frisch gezüchteten Bakterien)

Untersuchungseinrichtung

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

Probenvorbehandlung:				
Konservierung der Probe:			pH-Wert:	pH-Einstellung auf:
keine	gekühlt	eingefroren am:	aufgetaut am:	Leitfähigkeit bei 25 °C (µS/cm):
				Sauerstoffgehalt (mg/l):
Homogenisierung der Probe durch:			Abgesetzt:	<input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ja
Aufsalzung:	<input type="checkbox"/> 20 g/l NaCl	<input type="checkbox"/> abweichende Vorgehensweise:		
sonstige Probenvorbereitungsmaßnahmen (z.B. Zentrifugation, Filtration, Belüftung):				

Leuchtbakterien:		
Stamm, Bezugsquelle:		(Chargen)nummer:
		Lieferdatum:
Herstellung der Vorratssuspension am:		
Herstellung der Vorkultur:	Herstellung der Hauptkultur (Ernte):	TE/F (=FNU)
Datum:	Datum/Uhrzeit:	
Aufbewahrungstemperatur und -dauer im Gefrierschrank:		
Überprüfung der Bakteriencharge mit 3 Referenzsubstanzen am:		

Thermoblock-Check:
Parameter, ggf. Geräteeinstellungen:
Letzte Überprüfung der Testtemperatur im Thermoblock am :

Referenzsubstanzen im Test:		
Zinksulfat-heptahydrat	3,5-Dichlorphenol	Kaliumdichromat
(Titer)lösung:	Stammlösung:	(Titer)lösung:
Konzentration (mg/l):	Konzentration (mg/l):	Konzentration (mg/l):
Ansatzdatum:	Ansatzdatum:	Ansatzdatum:
Zwischenverdünnung (mg/l):	Zwischenverdünnung (mg/l)	Zwischenverdünnung (mg/l)
Datum:	Datum:	Datum:

TESTPROTOKOLL (Mindestangaben)

Fortsetzung

LEUCHTBAKTERIENTEST nach DIN EN ISO 11348 - 1

(mit frisch gezüchteten Bakterien)

Auftauen der Bakterien: Datum/Uhrzeit: /

 Testbeginn (I_0 -Messung): Datum/Uhrzeit: / Handzeichen

Kontrollansätze								
Ansätze	Messwerte			f_{K30} (I_{K30}/I_0)	\bar{f}_{K30}	Gültigkeitskontrolle		
	I_0	I_{K30}				Abweichung vom Mittelwert f_{K30} (%) ¹⁾	erfüllt ?	
80%								
50%								
Testansätze								
Ansätze	G-Stufe	Messwerte			H_{30} %	\bar{H}_{30} %	Gültigkeitskontrolle	
		I_0	I_{30}	I_{C30}			Abweichung vom Mittelwert in %-Punkten ²⁾	erfüllt ?
80%								
1	1							
2								
50%								
3	2							
4								
5	3							
6								
Referenzansätze (Endkonzentration im Test)								
25 mg/l Zn^{2+}								
4,5 mg/l 3,5-DCP								
4 mg/l Cr(IV)								
1) Volumen der Testsuspension: 0,2 oder 0,5 ml								
2) Volumen des Testansatzes: 1 ml								

 Farbkorrektur durchgeführt: nein ja Art: geräteintern Farbkorrekturküvetten

 Gültigkeitskriterien (nach DIN EN ISO 11348 -1, Abschnitt 12) erfüllt: ja nein

Bemerkungen:

Ergebnis: G_{lb} =
--

Datum/ Unterschrift