

Dez. 2024	AQS - Merkblatt <i>zu den Rahmenempfehlungen der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) für die Qualitätssicherung bei Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen</i>	P-9/3
--------------	--	--------------

Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))

1 Arbeitsgrundlagen

- DIN 38402-11 (A 11); Probenahme von Abwasser, 2009-02
- DIN EN ISO 5667-16 (L 1); Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren, 2019-03
- DIN 38412-33 (L 33); Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen, 1991-03
- DIN 38412-59 (L 59); Algenwachstumshemmtest auf Mikrotiterplatte mit einzelligen Süßwasser-Grünalgen, 2022-12
- DIN EN ISO 10523 (C5); Bestimmung des pH-Werts, 2012-04
- LAW A-AQS-Merkblätter für die Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Herausgegeben von der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA); <https://www.lawa.de/Publikationen-363-AQS-Merkblaetter.html>

Weitere Literatur siehe Abschnitt 19.

2 Begriffe

Es gelten die in DIN 38412–33 (L 33) festgelegten Begriffe.

Zusätzlich:

Positivkontrolle

Gut beschriebene Referenzsubstanz, die, wenn nach einem bestimmten Testverfahren bewertet, die Eignung des Testsystems zur Erzielung einer reproduzierbaren, in geeignetem Maße positiven oder reaktiven Antwort im Testsystem nachweist.

Blindprobe

Gemisch von Wasser und Nährstoffen ohne den Testorganismus

Eigenfluoreszenz

Fluoreszenz der Probe, gemessen unter denselben Bedingungen und Einstellungen wie bei den Messungen für die Ansätze mit Algen.

3 Zweck

Dieses Merkblatt regelt die Analytische Qualitätssicherung (AQS) bei der Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen. Es beinhaltet Hinweise und Ergänzungen zu der in Abschnitt 1 genannten Norm DIN 38412-33 (L 33) und bietet Hilfestellung zur praktischen Durchführung.

Berücksichtigt werden auch Aspekte der Testdurchführung auf Mikrotiterplatte. Diese Testvariante war bei Erscheinen der Norm DIN 38412-33 (L33) im Jahr 1991 nicht verbreitet; die Vorgaben der

P-9/3	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	Dez. 2024
-------	---	-----------

Norm können aber auch bei Durchführung des Algenabwassertests auf Mikrotiterplatte umgesetzt werden.

Die Norm DIN 38412-59 (L 59) „Algenwachstumshemmtest auf Mikrotiterplatte mit einzelligen Süßwasser-Grünalgen“ beschreibt ausführlich eine Testdurchführung auf 24-Well-Mikrotiterplatten für Umweltproben und dient als Orientierung zur Darstellung der Mikrotiterplattenvariante für DIN 38412-33 (L33) in diesem AQS-Merkblatt.

4 Testorganismus

Die als Testalge vorgeschriebene Grünalge *Scenedesmus subspicatus* CHODAT, Stamm 8681 wurde mittlerweile in *Desmodesmus subspicatus* umbenannt. Sie ist als axenische Kultur von Kultursammlungen erhältlich, z. B. als SAG 86.81 von der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen.

In diesem Merkblatt wird der Name *Desmodesmus subspicatus* verwendet, auch wenn der Name *Scenedesmus subspicatus* Bestandteil des Normtitels ist.

5 Algenstammkultur

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

Das äußere Erscheinungsbild der Testalgen ist bei Bezug neuer Algen mikroskopisch zu prüfen und die morphologische Übereinstimmung mit der Testalgenart zu bestätigen.

Eine Stammkulturhaltung der Algen ist auf festem (z. B. Agar, 1,5 %) oder in flüssigem Nährmedium möglich. In Anhang A werden in Ergänzung zu dem Medium in der Norm verschiedene, stärker konzentrierte Medien aufgeführt, die ebenfalls für eine Stammkulturhaltung in Frage kommen.

Es hat sich bewährt, das Agarmedium mit der überimpften Kultur zunächst für 3 Tage bis 4 Tage unter den gleichen Licht- und Temperaturbedingungen wie bei der Testdurchführung zu inkubieren und anschließend verschlossen (z. B. mit Parafilm®) im Kühlschrank bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ zu lagern.

Für eine Stammkultur in flüssigem Wachstumsmedium die Algen mittels steriler Impföse vom Agarmedium in Flüssigmedium überführen und 4 Tage bis 7 Tage unter den gleichen Licht- und Temperaturbedingungen wie bei der Testdurchführung inkubieren. Bei Kultur in flüssigem Wachstumsmedium ist eine häufigere Subkultur (z. B. einmal pro Woche) als bei der Stammkulturhaltung auf Agarmedium notwendig, um Wachstumstörungen zu verhindern.

Die Algenkulturen dürfen nicht mit anderen Algenarten oder Mikroorganismen kontaminiert sein. Die Inokulation der Stamm-, Vor- und Testkulturen ist unter sterilen Bedingungen, z. B. unter Verwendung einer Sterilbank und sterilen Geräten, Materialien und Medien durchzuführen.

Die mikroskopische Prüfung der Algenkultur im Hinblick auf Kontaminationen und Morphologie sollte (bei Verwendung der Algen für Tests) mindestens alle drei Monate erfolgen.

Anmerkung 1: Die Erfahrung hat gezeigt, dass es sinnvoll ist, die Algenstammkultur mindestens einmal je Jahr durch eine neue Algenkultur aus einer Stammsammlung zu ersetzen.

Dez. 2024	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	P-9/3
--------------	--	--------------

6 Geräte

Für alle im Test eingesetzten Prüf- und Messmittel ist das LAWA-AQS-Merkblatt A-8 zu beachten.

Alle Materialien, die mit den Algen, den Lösungen und den Medien in Berührung kommen, müssen aus Glas oder chemisch inertem Material bestehen sowie sauber und frei von Substanzen sein, die den Test stören könnten (z. B. Kupfer).

– Inkubationseinrichtung

Als Lichtquelle können Leuchtstoffröhren oder LED-Lichtpaneele (Farbtemperatur etwa 4300 K) eingesetzt werden. Die direkt über den Testgefäßen gemessene Lichtintensität muss innerhalb eines Schwankungsbereiches von $\pm 10\%$ homogen sein und sollte in einem photosynthetisch wirksamen Wellenbereich von 400 nm bis 700 nm und zwischen $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ und $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ bzw. zwischen 4440 lx bis 8880 lx liegen.

Lichtquelle und Beleuchtungsbedingungen sind so zu wählen, dass sowohl die einheitlichen Bedingungen an den Stellplätzen (siehe Anmerkung 2 in Abschnitt 11.2 der Norm DIN 38412-33 (L33)) als auch das Gültigkeitskriterium für die Biomasseproduktion (Erhöhung der Chlorophyll-Fluoreszenz im Kontrollansatz innerhalb von 72 h um mindestens das 30-fache (siehe Abschnitt 12 der Norm DIN 38412-33 (L33)) erfüllt werden.

Für die Durchführung des Tests auf Mikrotiterplatte zusätzlich oder alternativ zu den in der Norm DIN 38412-33 (L 33) in Abschnitt 7 aufgeführten Geräten:

- **Kolbenhubpipetten** mit Kunststoffspitzen
- **Kryogefäße**, geeignet für das Tiefgefrieren von Aliquoten der Kaliumdichromat-Testlösung
- **Mikrotiterplatten mit Deckel**, Polystyrol, durchsichtig, flacher Boden; mit unbehandelter Oberfläche (Suspensionsplatten). Vorbehandelte bzw. beschichtete Platten, z. B. Zellkulturplatten, sind aufgrund der höheren Variabilität des Algenwachstums zwischen den Parallelansätzen nicht geeignet.
- **Verschlussfolie, z. B. Parafilm®**
- **Klebefolie**, gasdurchlässig.
- **Orbitalschüttler**
- **Mikrotiterplatten-Fluorimeter**

Das verwendete Gerät muss in der Lage sein, die Fluoreszenz einer Algensuspension mit einer Zelldichte ab $5 \cdot 10^3$ Zellen/ml zu messen. Das Gerät ist regelmäßig einer Überprüfung mit geeigneten Referenzmaterialien (z.B. nach den Angaben in der Geräteanleitung) zu unterziehen. Es wird empfohlen, die Überprüfung mindestens alle 2 Jahre durchzuführen

7 Reagenzien

- **Wasser** (= Verdünnungswasser) deionisiert oder von vergleichbarer Reinheit (Leitfähigkeit $<10 \mu\text{S/cm}$), zur Herstellung der Lösungen für das Nährmedium, für die Referenzsubstanz und für die Verdünnung der Probe.

Chemikalien nach Abschnitt 8 der Norm DIN 38412-33 (L 33); zusätzlich

- **Kaliumdichromat**, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, CAS-RN: 7778-50-9.

P-9/3	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	Dez. 2024
--------------	--	--------------

8 Probenahme

Für die Probenahme und die Probenaufbewahrung sind Gefäße aus chemisch inerten Materialien wie z. B. Glas, PTFE, Polypropylen oder Polyethylen zu verwenden.

Das Gesamtprobenvolumen sollte ausreichend für die Bildung von Teilproben sein, um etwaige Wiederholungsuntersuchungen zu erlauben.

9 Probenkonservierung

Abwasserproben möglichst bald nach der Entnahme untersuchen.

Aus Praktikabilitätsgründen werden in diesem Merkblatt in Anlehnung an DIN EN ISO 5667-16 (L 1), Abschnitt 6 hinsichtlich der Konservierungsdauer und der Lagertemperaturen teilweise von der Norm DIN 38412-33 (L 33) abweichenden Anforderungen beschrieben.

Anmerkung 2: Vorgabe der Norm DIN 38412-33 (L 33): wenn unumgänglich, die Abwasserproben durch Kühlen (2 °C bis 4 °C, bis zu 3 Tagen) oder Tiefgefrieren (-18 °C, bis zu 2 Wochen) konservieren.

Eine Konservierung der Proben im Labor erfolgt durch:

- Kühlen der Proben entgegen der ursprünglichen Normvorgabe bei (5 ± 3) °C für maximal 48 h im Dunkeln. Die Kühlung sollte möglichst bald nach der Probenahme einsetzen. Dies kann z. B. in Kühlboxen mit Eis oder in einem Fahrzeug-Kühlschrank vor Ort und während des Transports erfolgen. Im Labor werden die Proben bei (5 ± 3) °C gelagert. Tiefgefrieren bei ≤ 18 °C bis zu 2 Monate ist zulässig, wenn es nicht möglich ist, den Test innerhalb von 48 h anzusetzen. Aufgrund der Volumenvergrößerung beim Einfrieren dürfen 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 angepasst wird. Im Allgemeinen ist es angemessen, für mehrmalige Bestimmungen nach Homogenisierung Teilproben für das Tiefgefrieren herzustellen und maximal 11-Gefäße zu verwenden.
- Eine Probenvorbehandlung (z. B. Neutralisation) vor dem Einfrieren unterbleibt. Zusätzlich eingefrorene Teilproben sollten bis zur endgültigen Auswertung tiefgekühlt aufbewahrt werden.
- Proben aus Kühlwassersystemen mit Bioziden, die schnell abgebaut werden, sind schnellstmöglich zu untersuchen oder sofort nach der Probenahme einzufrieren.

Konservierungsmaßnahmen sind zu dokumentieren.

10 Probenvorbehandlung

Eingefrorene Proben werden am Tag des Tests kurz vor der Verwendung aufgetaut. Die Dauer des Auftauens hängt stark von der Menge der Probe ab. Ein Wasserbad mit einer Temperatur von (25 ± 2) °C und leichtem Schütteln wird empfohlen. Alternativ darf die Probe im Kühlschrank bei (5 ± 3) °C im Dunkeln, z. B. über Nacht, aufgetaut werden. Eine Mikrowellenbehandlung zum Auftauen ist nicht zulässig.

Nach dem vollständigen Auftauen sind die Proben unmittelbar zu testen. Aufgetaute Proben dürfen weder erneut eingefroren werden noch in einem Kühlschrank bis zur Prüfung an nachfolgenden Tagen gelagert werden.

Die Probe nur durch Schütteln per Hand oder per Magnetrührer homogenisieren.

Dez. 2024	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegen- über Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	P-9/3
--------------	--	--------------

Den pH-Wert der homogenisierten Probe nach DIN EN ISO 10523 (C5):2012-04 ermitteln und dokumentieren. Falls erforderlich, ein für den Test benötigtes Aliquot (siehe auch Abschnitt 11) der homogenisierten Probe entnehmen und durch Zusatz von Salzsäure oder Natronlauge auf einen pH-Wert von $7,0 \pm 0,2$ einstellen. Die Konzentration der zur Neutralisation erforderlichen Säure oder Base ist so zu wählen, dass das zugegebene Volumen 5 % des Gesamtvolumens nicht überschreitet. Eine Über- oder Unterschreitung des Neutralpunktes ist zu vermeiden. Bei einer Übertitration den pH-Wert durch Zugabe der homogenisierten Probe einstellen. Ausfällungen während der pH-Wert-Anpassung sind zu dokumentieren; in diesen Fällen den Überstand für den Test verwenden.

Sind im Abwasser störende ungelöste Stoffe (grobe Bestandteile) enthalten, bleibt die Probe nach Neutralisation 30 min bis 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Das überstehende Wasser wird für den Test verwendet.

11 Herstellung der Testansätze

Es sind jeweils mindestens 2 Parallelansätze für die Kontrolle, die Verdünnungsstufen, die Eigenfluoreszenz und die Referenzsubstanz zu untersuchen.

Bei Verwendung von Mikrotiterplatten sind auf jeder Platte Ansätze für die Kontrolle, für die Positivkontrolle (Referenzsubstanz) und eine Blindprobe mitzuführen.

Blindproben (bestehend aus einer Mischung von Wasser und Nährmedium) sind auf allen Mikrotiterplatten mitzuführen, da Mikrotiterplatten-Fluorimeter in den Platten auch ohne Anwesenheit von Algen eine geringe Fluoreszenz (Signalwert des Messgeräts) messen. Diese kann nicht auf null gesetzt werden. Die Fluoreszenzwerte der Ansätze zu Testbeginn und Testende werden um die Fluoreszenzwerte der gleichzeitig gemessenen Blindprobe korrigiert.

Tabelle 1 beschreibt die Zusammensetzung der Testansätze für ein Endvolumen von 100 ml.

Das benötigte Gesamtvolumen für die jeweiligen Testansätze hängt von den eingesetzten Kulturgefäßen (z. B. Kolben, Röhrchen, Mikrotiterplatte) und der Anzahl der Parallelansätze ab, d. h. Tabelle 1 ist ggf. volumenproportional anzupassen.

Vor Zugabe des Inokulums sind alle Ansätze auf Raumtemperatur zu temperieren.

P-9/3	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	Dez. 2024
--------------	--	--------------

Verdünnung	Verdünnungsstufe G	Abwasser [ml]	Verdünnungswasser [ml]	Nährlösung [ml]	Inokulum [ml]	Endvolumen des Testansatzes [ml]
Kontrolle	-	-	80	10	10	100
Positivkontrolle	-	(80)	0	10	10	100
1:1,25	1	80	0	10	10	100
1:2	2	50	30	10	10	100
1:3	3	33,3	46,7	10	10	100
1:4	4	25	55	10	10	100
1:6	6	16,6	63,4	10	10	100
1:8	8	12,5	67,5	10	10	100
1:12	12	8,3	71,7	10	10	100
1:16	16	6,25	73,75	10	10	100
1:24	24	4,15	75,85	10	10	100
1:32	32	3,13	76,87	10	10	100
1:48	48	2,08	77,92	10	10	100
1:64	64	1,56	78,44	10	10	100
Blindprobe	-	-	90	10	-	100

Tabelle 1: Beispiel für die Zusammensetzung von Testansätzen

11.1 Herstellung des Kontrollansatzes

Den Kontrollansatz mit Verdünnungswasser (siehe Abschnitt 7) ansetzen.

11.2 Herstellung der Verdünnungsstufen

Die in Tabelle 4 der Norm DIN 38412-33 (L 33) vorgeschriebenen Verdünnungsstufen für die Abwassertestung bilden zwei geometrische Verdünnungsreihen auf der Basis 2 und 3 ab, in denen von einer Verdünnung zur nächsten jeweils die Abwasserkonzentration halbiert wird:

Die erste der geometrischen Verdünnungsreihen enthält neben der vorbehandelten Probe (Verdünnung 1: 1,25, als $G = 1$ festgelegt) die Verdünnungsstufen $G = 2$, $G = 4$, $G = 8$ usw. Die zweite geometrische Verdünnungsreihe enthält ausgehend von einer ersten Verdünnung der Probe im Verhältnis 1 Teil unverdünnte vorbehandelte Probe und 2 Teile Verdünnungswasser ($G = 3$) die Verdünnungsstufen $G = 6$, $G = 12$, usw. Diese Verdünnungsreihen werden ineinander verschachtelt, um daraus eine Verdünnungsreihe mit $G = 1$, $G = 2$, $G = 3$, $G = 4$, $G = 6$, $G = 8$ usw. für die G_A -Wertbestimmung zu bilden.

Die unter Berücksichtigung der Volumina für Nährlösung und Inokulum kleinstmögliche Verdünnungsstufe gilt als $G=1$ (80 % Abwasseranteil).

Die Volumina von Abwasser, Verdünnungswasser, Nährlösung und Inokulum zum Ansatz definierter Verdünnungsstufen sind in Tabelle 1 bis zur Verdünnungsstufe 64 beispielhaft für ein Endvolumen von 100 ml aufgeführt.

Dez. 2024	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	P-9/3
--------------	--	--------------

Bei höheren Verdünnungsstufen wird eine Vorverdünnung der Probe empfohlen, um Verdünnungsfehler, die beim Pipettieren von sehr kleinen Volumina auftreten können, zu minimieren.

Auf Mikrotiterplatten könnten flüchtige Substanzen in den Verdünnungsansätzen der Probe das Algenwachstum in benachbarten Wells auf der Mikrotiterplatte, z. B. in den Wells mit den Kontrollen, hemmen, wenn die Platte nur mit einem Deckel verschlossen wird. Dies kann auch bei Verwendung von Deckeln mit Kondensationsringen auftreten. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen müssen die Wells mit Testansätzen mit flüchtigen Inhaltsstoffen voneinander und von dem Kontrollansatz isoliert werden, z. B. durch Verwendung einer gasdurchlässigen Klebefolie oder durch Ansatz von Kontrolle und Probe auf separaten Mikrotiterplatten.

11.3 Herstellung des Positivkontroll-Ansatzes

Parallel zu jeder Testserie sind Testansätze mit Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) als Positivkontrolle mit mindestens 2 Parallelen mitzuführen. Sie dienen dem Ausschluss ungeeigneter Algen und als Hinweis auf mögliche Störungen im Testablauf.

Für Positivkontrollansätze mit einer Konzentration von 0,3 mg/l $K_2Cr_2O_7$ im Testansatz (nach Mischung mit Nährlösung und Inokulum) wird entsprechend DIN 38412-33 (L 33) die Hemmwirkung auf die Biomasseproduktion von *Desmodesmus subspicatus* in Prozent, ausgedrückt als Veränderung der Chlorophyll-Fluoreszenz nach 72 Stunden, ermittelt.

Es wird empfohlen, den Stammansatz der Referenzsubstanzlösung mit einer im Handel erhältlichen Lösung mit zertifizierten Stoffmengenkonzentration von $K_2Cr_2O_7$ herzustellen. Für den Stammansatz, die Zwischenverdünnungen und die im Test einzusetzende Konzentrationsstufe wird Wasser nach Abschnitt 7 verwendet, eine pH-Wert-Einstellung unterbleibt. Der Testansatz soll 80 Volumenanteile Kaliumdichromat-Lösung, 10 Volumenanteile Nährlösung und 10 Volumenanteile Inokulum enthalten (siehe Tabelle 1).

Anmerkung 3: *Da $K_2Cr_2O_7$ eine giftige, krebserregende Substanz ist, kann zur Herstellung der Lösung für den Test durch Verwendung einer im Handel erhältlichen Lösung mit definierter $K_2Cr_2O_7$ -Konzentration (z. B. Titrisol®) das Risiko des Einatmens von $K_2Cr_2O_7$ -Staub vermieden werden.*

Ansatzbeispiel für die Herstellung einer Testlösung mit 0,37 mg/l $K_2Cr_2O_7$ aus einer im Handel erhältlichen Lösung mit zertifizierten Stoffmengenkonzentration ($1/60 \text{ mol/l} \approx 4903 \text{ mg/l}$ nach Verdünnung mit Wasser):

- Eine Stammlösung nach Angaben der Hersteller in 1 l Wasser ansetzen (enthält $1/60 \text{ mol/l} \approx 4903 \text{ mg/l}$).
- 10 ml dieser Stammlösung in einen 100 ml Messkolben geben und mit Wasser bis zum Messstrich auffüllen ($490,3 \text{ mg/l } K_2Cr_2O_7$, Zwischenlösung 1).
- 7,65 ml der Zwischenlösung 1 in einen 1000 ml Messkolben geben und mit Wasser bis zum Messstrich auffüllen, um die Zwischenlösung 2 zu erhalten (enthält $3,75 \text{ mg/l}$ Kaliumdichromat). Die Zwischenlösung 2 ist maximal bis zu einem Jahr im Kühlschrank bei $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ haltbar und wird für den Testansatz zur weiteren Verdünnung genutzt.
- Für die Testlösung 10 ml der Zwischenlösung 2 in einen 100 ml Messkolben geben und bis zum Messstrich mit Wasser auffüllen (enthält $0,375 \text{ mg/l}$ Kaliumdichromat). Diese Lösung wird wie das unverdünnte Abwasser (siehe Tabelle 4 in DIN 38412-33 (L 33)) im Ansatz verwendet. Durch Mischung von 80 Volumenanteilen der Testlösung mit 10 Volumenanteilen

P-9/3	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	Dez. 2024
--------------	--	--------------

teilen Nährlösung und 10 Volumenanteilen Inokulum ergibt sich im Positivkontrollansatz eine Konzentration von 0,3 mg/l Kaliumdichromat.

Lösung		Wasser (ml)	Gesamt- volumen	Konzentration (mg/l)	Resultierende Lösung
zertifizierte Lösung	1 Ampulle	entsprechend Herstellerangaben	1000 ml	4903	Stammlösung 1
Stammlösung 1	10 ml	90 ml	100 ml	490,3	Zwischenlösung 1
Zwischenlösung 1	7,65 ml	992,35	1000 ml	3,75	Zwischenlösung 2
Zwischenlösung 2	10 ml	90 ml	100 ml	0,375	Testlösung
80 ml Testlösung + 10 ml 10-fach konzentrierte Nährlösung + 10 ml Inokulum ergeben 100 ml Testansatz mit 0,3 mg/l Kaliumdichromat im Ansatz.					

Tabelle 2: Beispiel für die Herstellung der Testlösung aus der Titrisol-Lösung

Anmerkung 4: *Es hat sich bewährt, Aliquote der Testlösung in Kryogefäße abzufüllen, einzufrieren und die erforderliche Anzahl an Aliquoten am Tag des Tests aufzutauen.*

11.4 Herstellung des Blindproben-Ansatzes

Bei Durchführung des Tests auf Mikrotiterplatte ist auf jeder Platte ein Blindprobenansatz mit mindestens 2 Parallelen mitzuführen. Dieser besteht aus der 10-fach-Nährlösung nach Abschnitt 8.3.4 der Norm und Verdünnungswasser.

11.5 Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Abwasserprobe

Eine hohe Eigenfluoreszenz des Abwassers hat einen Einfluss auf das Ergebnis der Berechnung der Biomasseproduktion in den Verdünnungsstufen der Probe und kann somit das Testergebnis verändern.

Die Eigenfluoreszenz des Abwassers ist bei Testansatz bestimmen und mit der Fluoreszenz einer Algenlösung mit $5 \cdot 10^4$ Zellen je ml abzugleichen. Der Vergleichswert kann anhand einer separaten Fluoreszenz-Messung einer auf $5 \cdot 10^4$ Zellen je ml eingestellten Algenkultur ermittelt oder aus einer Kalibrationskurve von Zellzahl gegen Fluoreszenz entnommen werden.

Übersteigt die Eigenfluoreszenz des Abwassers diesen Vergleichswert, ist sie bei der Testauswertung rechnerisch zu berücksichtigen.

Anmerkung 5: *Die Eigenfluoreszenz kann sich während der Inkubation verändern. Rechnerisch berücksichtigt wird nur die Eigenfluoreszenz der Probe zu Testbeginn.*

Dez. 2024	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	P-9/3
--------------	--	--------------

11.6 Plattenbelegungsschema

Tabelle 3 zeigt ein Beispiel für die Belegung einer 24-Well-Mikrotiterplatte mit einer Probe, die in 4 Verdünnungsstufen (G = 1 bis G = 4) untersucht wird. Auch die Eigenfluoreszenz der Probe wird in diesem Beispiel auf der Platte mitbestimmt.

	1	2	3	4	5	6
A	KO	KO	KO	BP	BP	BP
B	G = 1	G = 1	G = 1	G = 2	G = 2	G = 2
C	G = 3	G = 3	G = 3	G = 4	G = 4	G = 4
D	PK	PK	PK	EF	EF	EF
Legende KO Kontrolle, PK Positivkontrolle, G Verdünnungsstufe, BP Blindprobe, EF Eigenfluoreszenz-Ansatz						

Tabelle 3: Beispiel für die Anordnung von Testansätzen mit jeweils 3 Parallelen auf einer 24-Well-Mikrotiterplatte

Die Bestimmung der Eigenfluoreszenz kann auch auf einer separaten Platte erfolgen, die nicht inkubiert werden muss.

12 Algenkultur

Bei der Herstellung der Nährmedien-Stammlösungen sowie von Stamm- und Testkulturen Geräte und Verfahren einsetzen, die eine sterile Algenkultur sicherstellen. Die Sterilisation von Lösungen und Medien erfolgt durch Sterilfiltration oder durch 20-minütiges Autoklavieren bei (121 ± 2) °C. Zum Autoklavieren werden die Gefäße nur lose abgedeckt (z. B. mit Aluminiumfolie). Die Gefäße dürfen nicht luftdicht verschlossen werden.

Zur Bestimmung der Zelldichte in Algensuspensionen für das Ansetzen der Vorkultur und des Inokulums können ein nach Zellzahlen kalibriertes Fluorimeter bzw. Photometer, ein Partikelzählgerät oder ein Mikroskop mit Zählkammer (Hämozytometer) eingesetzt werden.

Die Methode zur Ermittlung der Zellkonzentration für die Einsaat ist im Testprotokoll anzugeben.

Bei Einrichtung des Tests sowie bei Veränderungen in der Anzucht der Algen oder Veränderungen an Messgeräten sind Validierungen der gewählten Methode vorzunehmen und zu dokumentieren.

12.1 Vorkultur

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 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.

DIN 38412-33 (L33) gibt eine Inkubationsdauer von etwa 2 Tagen bis 3 Tagen und eine Ausgangszellzahl von etwa 10^4 Zellen je ml vor. Erfahrungsgemäß sind je nach Inkubationsbedingungen und Animpfdichte auch Zeiträume von 2 Tagen bis 4 Tagen Vorkulturdauer und angepasste Algendichten geeignet, um eine exponentiell wachsende Algenvorkultur für die Bereitstellung des Inokulums für den Test hervorzubringen, mit dem dann sicher die geforderte Vermehrung der Algen im Test erreicht

P-9/3	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	Dez. 2024
-------	---	-----------

werden kann. Bewährt hat sich eine Animpfdichte von etwa $5 \cdot 10^3$ Zellen/ml bis $1 \cdot 10^4$ Zellen/ml bei 3 Tagen Vorkulturdauer.

Anmerkung 6: *Beim Übergang von Stammkultur auf festem Agar zu flüssigen Vorkultur sind unter Umständen zweimalige Passagen erforderlich, damit die Algen in die exponentielle Wachstumsphase übergehen.*

Das Datum des Ansatzes der Vorkultur ist im Testprotokoll anzugeben.

12.2 Inokulum

Die Zelldichte in der Vorkultur unmittelbar vor Gebrauch messen, um das Inokulum in der erforderlichen Zelldichte (nach Norm $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml) durch Verdünnung der Vorkultur mit Nährmedium herstellen zu können.

Auch bei der Inokulum-Zelldichte führen erfahrungsgemäß etwas geringere Zelldichten von $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml bis $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml dazu, dass ein exponentielles Wachstum der Kontrolle im Test gewährleistet wird.

Anmerkung 7 *Durch Variation der Zelldichte im Inokulum innerhalb des angegebenen Bereichs kann die Vermehrung ggf. optimiert werden.*

13 Inkubationsbedingungen

Die Inkubationsbedingungen so gestalten, dass die Chlorophyll-Fluoreszenz im Kontrollansatz sich innerhalb von 72 h um mindestens das 30-fache erhöht (Gültigkeitskriterium).

Anmerkung 8: *Die Erhöhung der Chlorophyll-Fluoreszenz in den Kontrollansätzen sollte den Faktor 100 nicht überschreiten, da dann die Eigenbeschattung der Algen und Nährstoffmangel evtl. kein logarithmisches Wachstum mehr zulassen. Durch Änderung der Inkubationsbedingungen im Rahmen der zulässigen Spanne für Animpfzellzahl, Temperatur und Licht kann eine Reduktion des Wachstums erreicht werden.*

Wird die im Labor übliche Vermehrung der Testalgen bei sonst unveränderten Testbedingungen nicht mehr erreicht, kann ggf. ein Austausch der Leuchtstoffröhren Abhilfe schaffen.

Bei Raumklimatisierung ist auf eine ausreichende Luftzirkulation im Bereich der Inkubationseinrichtung zu achten, da lokal Erwärmungen z. B. durch Beleuchtungseinrichtungen und Schüttler hervorgerufen werden können.

Da bereits geringe Unterschiede in der Temperatur oder der Raumbeleuchtungsstärke zwischen einzelnen Stellplätzen zu Abweichungen im Wachstum identischer Ansätze führen können, ist eine Überprüfung entsprechend Punkt 11.2 in DIN 38412-33 (L 33) bei Veränderungen an der Inkubationseinrichtung, mindestens aber halbjährlich, durchzuführen und zu dokumentieren.

Auf der Mikrotiterplatte werden Kontrolle und Testansatz auf einer Platte inkubiert, so dass die Licht- und Temperaturunterschiede aufgrund der geringeren Fläche der Platte bei der Inkubation geringer als bei Tests mit Kolben sein sollten. Für die Überprüfung der Anforderung in Abschnitt 11.2, Anmerkung 2 der Norm (Wachstum identischer Testansätze) ist jeweils das Wachstum in den 24 Wells einer nur mit Kontrollansätzen bestückten Platte zu ermitteln.

Im Test ist die Einhaltung der Inkubationstemperatur von (23 ± 2) °C, wobei die Temperaturabweichungen während des Tests nicht mehr als ± 1 °C betragen dürfen, zu überprüfen und zu dokumentieren. In der Regel ist die Kontrolle in geeigneten Referenzgefäßen (Kolben) oder Referenzkörpern

Dez. 2024	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	P-9/3
--------------	--	--------------

hinreichend. Zur Kontrolle können Minimum-Maximum-Thermometer verwendet werden. Dann genügt die Angabe der Minimum- und Maximum-Temperatur.

In den Testgefäßen sind die Algen in Suspension zu halten (z. B. durch Aufschütteln, kontinuierliches Schütteln, Rühren).

Die Mikrotiterplatte mit den Testansätzen muss kontinuierlich orbital geschüttelt werden, um die Zellen in freier Suspension zu halten und den CO₂-Massentransfer von der Luft ins Testmedium zu erleichtern.

Bei Verwendung von Mikrotiterplatten diese mit einem Deckel oder einer gasdurchlässigen Klebefolie abdecken, so dass sie ausreichend gegen Kontamination durch die Umgebungsluft geschützt sind und die Verdunstung reduziert wird. Verdunstung beeinflusst das Testergebnis. Wird ein Deckel verwendet, kann dieser zur maximalen Verringerung der Verdunstung mit einem Klebefilm (z. B. Parafilm®) abgedichtet werden.

Anmerkung 9 *Eine luftdichte Abdichtung kann den CO₂-Massentransfer von der Luft in die Testansätze behindern.*

Anmerkung 10 *Wenn statt eines Deckels Klebefolien verwendet werden, kann der Klebstoff die Testansätze beeinträchtigen.*

14 Messung

Die Inkubationsdauer von 72 Stunden darf um nicht mehr als eine Stunde über- oder unterschritten werden. Die Testansätze nach Ende der Inkubationszeit stets unmittelbar vor der Messung durch Schütteln oder mittels Pipette durchmischen, um eine homogene Verteilung der Algen zu erreichen.

Algenagglutinationen, die auf eine schlechte Qualität der Algenkultur oder auf die Probe zurückzuführen sind, können die Fluoreszenzmessung stören und zu einer hohen Variabilität zwischen den Parallelansätzen führen. Jede makroskopische Agglutination von Algenzellen vor der Homogenisierung wird im Testprotokoll dokumentiert.

Bei Verwendung von Mikrotiterplatten ist bei Messung von oben der Deckel oder die Klebefolie zu entfernen.

Da die Algen durch das Messlicht geschädigt werden können, ist auf konstante und möglichst kurze Messzeiten zu achten.

Die Fluoreszenz wird bei $\lambda = (685 \pm 20)$ nm nach Anregung mit Licht im Wellenlängenbereich zwischen 400 nm und 500 nm (Maxima bei 435 nm und 485 nm) fluorimetrisch gemessen. Bei der Messung muss sichergestellt sein, dass die Fluoreszenz im linearen Bereich des Fluorimeters gemessen wird. Dieser kann anhand einer, mittels Verdünnungen einer Algensuspension erstellten, Kalibrierkurve ermittelt werden. Das Fluorimeter so einstellen, dass es am Testende keine Signalüberschreitung gibt.

In Mikrotiterplatten-Fluorimetern sollte, sofern das Gerät dies ermöglicht, die Fluoreszenz an verschiedenen Stellen im Well gemessen und daraus ein Durchschnittswert für das Well berechnet werden. Die Geräte-Einstellungen „Messpunkte pro Well“ und „Verstärkung“ sollten optimiert und gespeichert werden. Die Einstellungen dürfen im Verlauf eines Tests nicht geändert werden.

P-9/3	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	Dez. 2024
--------------	--	--------------

15 Auswertung

Bei Messung der Fluoreszenz von Ansätzen auf Mikrotiterplatte ist der Fluoreszenzwert des Blindprobenansatzes zu Beginn und am Ende des Tests jeweils von den Fluoreszenzwerten der Testansätze und Kontrollen abzuziehen.

Die Hemmwirkung auf die Biomasseproduktion, ausgedrückt als Minderung der Chlorophyll-Fluoreszenz, wird durch Vergleich der Chlorophyll-Fluoreszenz der Testansätze bzw. der Ansätze der Positivkontrollen mit der Chlorophyll-Fluoreszenz der Kontrollen in Prozent berechnet. (siehe auch Beispieldatensatz für einen Mikrotiterplattentest in Anhang 3).

Lag die Eigenfluoreszenz des Abwassers zu Testbeginn über dem Fluoreszenzwert einer Algensuspension mit $5 \cdot 10^4$ Zellen je ml, muss der Eigenfluoreszenzwert berücksichtigt werden. Von der Endfluoreszenz der Verdünnungsstufen F_G wird die Eigenfluoreszenz F_E proportional zum Volumenanteil des Abwassers im Testansatz abgezogen (z. B. Verdünnungsstufe $G = 4$: 25 % des Eigenfluoreszenzwertes F_E werden von F_G der Verdünnungsstufe $G = 4$ abgezogen.).

Bei Verwendung von mehr als einer Mikrotiterplatte sind zur Berechnung der prozentualen Hemmung der Biomasseproduktion der Testansätze und der Positivkontrolle für jede Mikrotiterplatte die Fluoreszenzwerte der individuell auf dieser Mikrotiterplatte mitgeführten Kontrollen zu verwenden.

Anmerkung 11: *Abwasserproben mit hohen Nährstoffgehalten können erfahrungsgemäß das Algenwachstum fördern.*

16 Gültigkeitskriterien

Der Test ist gültig, wenn

- sich die Chlorophyll-Fluoreszenz im Kontrollansatz innerhalb von 72 h um mindestens das 30-fache erhöht hat.
- die Abweichungen der Parallelansätze der Kontrolle die vorgegebenen Grenzen nicht überschreiten: bei den Kontrollansätzen darf die Abweichung des höchsten und des niedrigsten Wertes der Fluoreszenz am Testende von ihrem Mittelwert bei Tests mit 2 Kontrollansätzen nicht mehr als 7,5 % betragen. Werden mehr als 2 Kontrollansätze angesetzt, darf der Variationskoeffizient einen Wert von $0,075 \cdot \sqrt{n/(n-1)}$ nicht überschreiten (Gültigkeitskriterium, $n = 3$: 9,2 %, $n = 6$: 8,2 %).
- 0,3 mg/l $K_2Cr_2O_7$ im Positivkontrollansatz 20 % bis 80 % Hemmung hervorrufen.

Bei Verwendung von Mikrotiterplatten sind die Kriterien für jede Mikrotiterplatte einzeln zu erfüllen (Ausnahme bei Anwesenheit flüchtiger Substanzen siehe Abschnitt 11.2).

17 Testergebnis

Als Ergebnis gilt der kleinste Wert von G (G_A -Wert), bei dem unter den Bedingungen der Norm eine Hemmwirkung der Biomasseproduktion < 20 % gemessen wird.

18 Dokumentation

Zur Dokumentation des Tests ist ein entsprechendes Testprotokoll (Musterprotokoll mit Mindestangaben siehe Anhang 1) einschließlich der Beurteilung der Gültigkeitskriterien anzufertigen.

Dez. 2024	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	P-9/3
--------------	--	--------------

Über die Ergebnisse der Positivkontrolltestung mit Kaliumdichromat ist eine Spannweitenzielkarte zu führen.

19 Literatur

- [1] Bringmann, G. et al.: Comparison of the toxicity thresholds of water pollutants to bacteria, algae, and protozoa in the cell multiplication inhibition test, Water Research Volume 14; Issue 3, 231-241, 1980.
- [2] Kuhl, A. et al.: Handling and culturing of Chlorella. In: D. M. Prescott, ed., Methods in cell physiology. Vol. I, p. 159-187, Academic Press, New York and London, 1964.
- [3] Chu, S.P.: The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: Part I. methods and Culture Media, Journal of Ecology 30, 284-325, 1942.

P-9/3	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	Dez. 2024
--------------	--	--------------

Anhang 1

MUSTER-TESTPROTOKOLL (Mindestangaben)

ALGENTEST nach DIN 38412 – 33 (L 33)

Untersuchungsstelle

Angaben zur Probe:					
Probenahmestelle:					
Probenehmer:			Proben-Nummer:		
Probenahme-Datum:			Probenahme-Uhrzeit:		
Sonstige Angaben zur Probe (z. B. pH, Leitfähigkeit, 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 (Stammsammlung):		Bezugsdatum:	Stamm-Nr.:	Art der Stammkulturhaltung:	Medium:
Testvorbereitungen:					
Ansatzdatum der Vorkultur:	Zellen/ml (Vorkulturrende):		Zellen/ml im Test:	Ermittlung der Zellkonzentration mittels:	
Referenzsubstanz Kaliumdichromat:					
(Titer)lösung:	Konzentration: (mg/l)	Ansatzdatum:	Testlösung: (mg/l)	Datum:	
Testdurchführung:					
Eigenfluoreszenz der Probe (F _E) (t=0h):	Fluoreszenzwert von 5 · 10 ⁴ Zellen je ml:		Ausgangsfluoreszenz der Kontrolle beim Testansatz F _K (t=0h):		

Testbeginn Datum/Uhrzeit: _____ / _____ Handzeichen _____

Dez. 2024	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	P-9/3
--------------	--	--------------

MUSTER-TESTPROTOKOLL (Mindestangaben)

Fortsetzung

ALGENTEST nach DIN 38412 – 33 (L 33)

Versuchsauswertung:

Testende: Datum/Uhrzeit: _____ / _____

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

Kontrolle	Fluoreszenz F_K	Mittelwert F_K	Erhöhung der Chlorophyllfluoreszenz	Variations-Koeffizient (Kontrolle)
Verdünnungsstufe G	Fluoreszenz F_G	Hemmwirkung H_F (%)	Mittelwert H_F (%)	
Referenzsubstanz $K_2Cr_2O_7$ 0,3 mg/l				

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: $F_K(t = 72 \text{ h} \pm 1 \text{ h}) / F_K(t = 0 \text{ h})$

Eigenfluoreszenz rechnerisch berücksichtigt

nein

ja

P-9/3	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	Dez. 2024
--------------	--	--------------

TESTPROTOKOLL (Mindestangaben)

Fortsetzung

Einhaltung der Gültigkeitskriterien:

Gültigkeitskriterium	Anforderung	Ermittelter Wert	Kriterium erfüllt	
			ja	nein
Erhöhung der Chlorophyllfluoreszenz in der Kontrolle	Mindestens 30-fach			
Abweichung der Kontrollansätze (Parallelen)	n=2: < 7,5 % n=3: VarKoeff. < 9,2 %, n=6: VarKoeff. < 8,2 %			
Hemmung Referenzsubstanz Kaliumdichromat	Hemmung zwischen 20 % und 80 % (Biomasse)			

Bemerkungen:

Ergebnis: $G_A =$

Testauswertung

Datum, Unterschrift

Dez. 2024	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	P-9/3
--------------	--	--------------

Anhang 2

Beispiele für geeignete Nährmedien zur Stammkulturhaltung von *Desmodesmus subspicatus*

a) Nährmedium nach Bringmann-Kühn

Das Nährmedium nach Bringmann-Kühn [1] wird aus 9 konzentrierten Stammlösungen und Wasser zubereitet. Für die Stammkultur von *Desmodesmus subspicatus* ist das im Originalrezept mit aufgeführte Di-Natriummetasilikat entbehrlich, Dinatriumcarbonat lässt sich durch Natriumhydrogencarbonat ersetzen.

Tabelle B.1 Stammlösungen für Nährmedium nach Bringmann-Kühn

Stammlösungen			Gebrauchslösung
1.	49,6 g/l	NaNO ₃	10 ml
2.	3,9 g/l	K ₂ HPO ₄ , wasserfrei	10 ml
3.	7,5 g/l	MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 ml
4.	3,6 g/l	CaCl ₂ · 2H ₂ O	10 ml
5.	1,0 g/l	EDTA Na ₂ (Titrplex III)	10 ml
6.	0,3 g/l	Citronensäure, reinst	10 ml
7.	0,3 g/l	Fe-III-Citrat (ca. 19 % Fe) (löst sich erst beim Erwärmen), im Dunkeln aufbewahren (z. B. Umwickeln mit Alufolie)	10 ml
8.	Spurenelemente (zusammen in einer Stammlösung) 2,86 g/l H ₃ BO ₃ 1,81 g/l MnCl ₂ · 4 H ₂ O 0,22 g/l ZnSO ₄ · 7 H ₂ O 0,08 g/l CuSO ₄ · 5 H ₂ O 12,50 g/l Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O 0,04 g/l CoCl ₂ · 6 H ₂ O		
9.	Spurenelemente (Zwischenverdünnung) 4 ml auf 100 ml Wasser (1:25)		1 ml
10.	50 g/l Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃ (Lösung steril filtrieren)		1 ml

P-9/3	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegen- über Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	Dez. 2024
--------------	--	--------------

Herstellen des gebrauchsfertigen Mediums:

Von den Stammlösungen 1 - 7 werden jeweils 10 ml, von der Zwischenverdünnung der Stammlösung 8 jeweils 1 ml in einen Messkolben mit ca. 800 ml Wasser (siehe Abschnitt 7) pipettiert. Anschließend wird mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Nach dem Autoklavieren (20 min. bei $(121 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$) und Abkühlen kann das Medium im Kühlschrank bei $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden. Vor Gebrauch werden unter sterilen Bedingungen entweder 0,05 g/l NaHCO_3 (wasserfrei z. A.) oder alternativ 1 ml der Stammlösung 10 hinzugegeben.

b) Nährmedium nach Kuhl

Das Nährmedium nach Kuhl [2] wird aus 7 konzentrierten Stammlösungen und Wasser (siehe Abschnitt 7) zubereitet.

Tabelle B.2 Stammlösungen für Nährmedium nach Kuhl

Stammlösungen			Gebrauchslösung
1.	101,1 g/l	KNO_3	10 ml
2.	62,1 g/l	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$	10 ml
3.	8,9 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	10 ml
4.	24,65 g/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 ml
5.	1,47 g/l	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	10 ml
6.	6,95 g/l	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (Fe-EDTA-Komplex) *)	10 ml
8.	Spurenelemente (zusammen in einer Stammlösung) 61 mg/l H_3BO_3 169 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ 287 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 2,5 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ 12,5 mg/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$		1 ml

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 Wasser (siehe Abschnitt 7) pipettiert. Anschließend wird mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Nach dem Autoklavieren (20 min. bei $(121 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$) und Abkühlen wird 1 ml der Stammlösung 6 hinzugegeben.

Das sterilisierte Nährmedium kann über einige Wochen im Kühlschrank bei $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden.

Dez. 2024	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	P-9/3
--------------	--	--------------

(Fortsetzung)

*) Herstellung des Fe-EDTA-Komplexes:

0,69 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 0,93 g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ werden in 80 ml Wasser durch kurzes Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird die Lösung auf 100 ml aufgefüllt. Aufbewahrung kühl bei $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ und dunkel. 1 ml enthält die o. g. Eisenkonzentration.

c) Nährmedium nach Chu

Das Nährmedium Nr. 12 nach Chu [3] wird aus 8 konzentrierten Stammlösungen und Wasser (siehe Abschnitt 7) zubereitet.

Tabelle B.3 Stammlösungen Nährmedium nach Chu

Stammlösungen			Gebrauchslösung
1.	3,0 g/l	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	10 ml
2.	0,5 g/l	K_2HPO_4	10 ml
3.	7,5 g/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10 ml
4.	2,5 g/l	K_2SiO_4	10 ml
5.	0,5 g/l	KCl	10 ml
6.	2,0 g/l	Na_2CO_3	10 ml
7.	0,05 g/l	Na_2CO_3	10 ml
8.	Spurenelemente (zusammen in einer Stammlösung) 2 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 2 mg/l Na_2SiO_3 2 mg/l AlCl_3 2 mg/l H_3BO_3 1 mg/l LiCl 1 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$		1 ml

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 Wasser (siehe Abschnitt 7) pipettiert. Anschließend wird mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Nach dem Autoklavieren (20 min. bei $(121 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$) und Abkühlen kann das sterilisierte Nährmedium über einige Wochen im Kühlschrank bei $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden.

P-9/3	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	Dez. 2024
--------------	--	--------------

Anhang 3

Beispieldatensatz

Für einen Beispieldatensatz werden die gemessenen Fluoreszenzwerte und die daraus berechneten Hemmungen der Biomasseproduktion für eine Abwasserprobe mit 4 Verdünnungsstufen und Testdurchführung auf einer 24-Well-Mikrotiterplatte dargestellt.

Anmerkung A.3.1 *Die Berechnungen erfolgen mittels Tabellenkalkulationsprogramm und allen darin verfügbaren Nachkommastellen. In den Tabellen werden gerundete Werte angegeben.*

Die Testansätze sind gemäß Tabelle A.3.1 auf der Mikrotiterplatte angeordnet.

Tabelle A.3.1 Beispiel für die Anordnung von Testansätzen mit jeweils 3 Parallelen auf einer 24-Well-Mikrotiterplatte

	1	2	3	4	5	6
A	KO	KO	KO	BP	BP	BP
B	G = 1	G = 1	G = 1	G = 2	G = 2	G = 2
C	G = 3	G = 3	G = 3	G = 4	G = 4	G = 4
D	PK	PK	PK	EF	EF	EF
Legende KO Kontrolle, PK Positivkontrolle, G Verdünnungsstufe, BP Blindprobe, EF Eigenfluoreszenz-Ansatz						

Die zu Testbeginn für die Wells gemessenen Fluoreszenzwerte sind in Tabelle A.3.2 aufgeführt.

Tabelle A3.2 Fluoreszenzeinheiten zu Testbeginn t_0

	1	2	3	4	5	6
A	220	223	216	72	77	73
B	810	787	792	594	611	597
C	469	472	454	410	417	404
D	224	245	235	754	756	749

Der Mittelwert der Parallelen des Blindprobenansatzes (Well A4 bis A6) ist $t_0 = 74$. Die zu Testbeginn für die Ansätze gemessenen Fluoreszenzwerte werden um diesen Blindprobenwert korrigiert (Tabelle A.3.3)

Anmerkung A.3.2 *In diesem Beispiel liegt die gemessene Eigenfluoreszenz unter dem Fluoreszenzwert einer Algensuspension mit $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml mit einem Messwert von 2403 und muss bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.*

Dez. 2024	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	P-9/3
--------------	--	--------------

Tabelle A.3.3 Fluoreszenzeinheiten zu Testbeginn t_0 , korrigiert um Blindprobe (Mittelwert)

	1	2	3	4	5	6
A	146	149	142	-	-	-
B	736	713	718	520	537	523
C	395	398	380	336	343	330
D	150	171	161	680	682	675

Der Anfangsfluoreszenzwert der Kontrolle (Mittelwert Well A1 bis A3) ist 147.

Nach 72 Stunden wird die Fluoreszenz in den Wells erneut gemessen (Tabelle A.3.4):

Tabelle A.3.4 Fluoreszenzeinheiten am Testende t_{72}

	1	2	3	4	5	6
A	11011	10593	10755	66	71	65
B	1194	1176	1133	3170	3093	2914
C	6726	6630	6184	10118	10312	10487
D	5281	5469	5083	279	292	302

Der Mittelwert der Parallelen des Blindprobenansatzes (Wells A4 bis A6) ist $t_{72} = 67$. Die zu Testende für die Ansätze gemessenen Fluoreszenzwerte werden um diesen Blindprobenwert korrigiert (Tabelle A.3.5):

Tabelle A.3.5 Fluoreszenzeinheiten am Testende t_{72} , korrigiert um Blindprobe (Mittelwert)

	1	2	3	4	5	6
A	10944	10526	10688	-	-	-
B	1127	1109	1066	3103	3026	2846
C	6659	6563	6117	10051	10245	10420
D	5214	5402	5016	212	225	235

Der Mittelwert der Parallelen des Kontrollansatzes (Well A1 bis A3) ist $t_{72} = 10719$.

Damit wird die Hemmung in den Testansätzen für die Verdünnungsstufen und die Referenzsubstanz entsprechend Abschnitt 13 von DIN 38412-33 (L 33) berechnet (Tabelle A.3.5).

P-9/3	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	Dez. 2024
--------------	--	--------------

Tabelle A.3.6 Hemmung (in %) der Parallelansätze

	1	2	3	4	5	6
A	-	-	-	-	-	-
B	89,5	89,7	90,1	71,1	71,8	73,4
C	37,9	38,8	42,9	6,1	4,4	2,8
D	51,4	49,6	53,2	-	-	-

Die für die einzelnen Verdünnungsstufen und die Positivkontrolle berechneten Werte für die Hemmwirkung (Mittelwerte der Parallelansätze) sind in Tabelle A.3.7 zusammengefasst.

Tabelle A.3.7 Hemmung (in %) der Verdünnungsstufen und der Referenzsubstanz (Mittelwert der Parallelansätze)

	1	2	3	4	5	6
A	-			-		
B	(G = 1) 90		(G = 2) 72			
C	(G = 3) 40		(G = 4) 5			
D	PK 51		-			

Für die Beurteilung der Gültigkeit des Tests wird der Anstieg der Chlorophyllfluoreszenz in der Kontrolle sowie die Standardabweichung und der Variationskoeffizient berechnet (Tabelle A.3.8).

Tabelle A.3.8 Chlorophyllfluoreszenz für die Kontrolle nach 72 h Inkubation sowie Variationskoeffizient der Parallelansätze

	1	2	3	Mittelwert	StdAbw	VarKoeff.
t₀	146	149	142	146		
t₇₂	10944	10526	10688	10719	210,7	1,97
Anstieg	75,0	70,6	75,3	73,6		

Die Gültigkeitskriterien sind in Tabelle A.3.9 zusammengefasst.

Dez. 2024	Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegen- über Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (DIN 38412-33 (L 33))	P-9/3
--------------	--	--------------

Tabelle A.3.9 Übersicht über die Gültigkeitskriterien für den Beispieldatensatz

Gültigkeitskriterium	Anforderung		erfüllt	
			ja	nein
Erhöhung der Chlorophyll- fluoreszenz in der Kontrolle	mindestens 30-fach	74	x	
Variationskoeffizient der Kontrollansätze	Vergleichswert: n=3: 9,2 %	1,97	x	
Hemmung Referenzsubstanz Kaliumdichromat	Hemmung zwischen 20 % -80 %	51 %	x	

Als Testergebnis wird ein G_A -Wert von 4 ermittelt.