

Basisvalidierung genormter Verfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Validierungsdokument

A Allgemeine Angaben

Die Vorlage zu dieser Norm wurde im Arbeitskreis „Biologische Testverfahren“ des NAW in der Zeit von Januar 1997 bis Dezember 2000 erarbeitet. Im April 1998 wurde auf Grundlage eines ersten Entwurfs ein bundesweiter Ringversuch durchgeführt. Im Ergebnis wurde die Norm redaktionell und fachlich überarbeitet. Die Endfassung des Normentwurfs wurde im NAW als Manuskript zur Norm verabschiedet.

Obmann des Arbeitskreises

Herr Dr. Pluta

Mitglieder des Arbeitskreises:

A.1 Anwendungsbereich

A.1.1 Erfasste Parameter

Erfasstes Testkriterium ist die Dehydrogenaseaktivität des Testorganismus *Arthrobacter globiformis* in dotiertem, künstlichem Sediment, gemessen als Resazurinumsatz. Als Ergebnis wird die Hemmwirkung auf die Dehydrogenaseaktivität im Vergleich zu einer unkontaminierten Kontrolle berechnet.

A.1.2 Arbeitsbereich

A.1.2.1 Geprüfte Matrices

Das Verfahren gilt für folgende Matrices:

Künstliches Sediment,
Boden
Schwebstoffe
Sediment
Quarzsand

Zusammensetzung des künstlichen Sedimentes:

Quarzsand W4	70,0 %
Kaolin	20,0 %
Dolomit	0,5 %
Torf H3 – H5 (unbehandelt, über 1 mm gesiebt)	5,0 %
Eisen(III)oxid, Fe ₂ O ₃	4,5 %

Den Feuchtegehalt des künstlichen Feststoffes mit Wasser oder Schadstoff-Lösung auf 33 % (H₂O auf Feuchtgewicht Feststoff) einstellen.

Bezugsquellen:

Quarzsand (Siebfraktion W4 besteht aus mehr als 50% Partikeln der Größenklasse von 50 bis 190 µm) der Fa. Millisil-Quarzwerke GmbH, Frechen.

Kaolin (0,1-4 µm) von Aldrich-Sigma (Art.-Nr. K-7375).

Dolomit von Carl Jäger Tonindustribedarf GmbH, Hilgert.

Torf von Terra Plant Service, Analyse und Consulting GmbH.

Eisen(III)oxid von Fluka (Art.-Nr. 44956).

A.1.2.2 Geprüfter und kalibrierter Konzentrationsbereich

Aufgrund des Versuchsansatzes wurde ein Konzentrationsbereich von 45 (\pm 3) mg/l des Reaktionssubstrats Resazurin geprüft.

A.1.2.3 Selektivität / Spezifität

Keine Angaben

A.1.2.4 Mögliche Erweiterungen des Verfahrens

Zur Baggergutbewertung sind weitere Spezifikationen, insbesondere bezüglich der Probenaufbereitung und des Ansatzes von Verdünnungsreihen, nötig.

A.2 Störungen

A.2.1 Störungen, die die Selektivität / Richtigkeit / Präzision des Verfahrens beeinflussen

Ein pH-Bereich < 6 und > 9 kann zu einem unspezifischen Farbumschlag des Indikators Resazurin führen und täuscht damit unter Umständen eine geringere Enzymaktivität vor. Umweltprouben mit hoher mikrobieller Aktivität können nicht untersucht werden, es sei denn, die Aktivität wird durch geeignete Verfahren unterdrückt.

A.3 Chemikalien / Geräte

A.3.1 Blindwerte / Blindwertschwankungen

Für die Berechnung der Hemmwirkung sind sowohl der Blindansatz zum Testansatz als auch der Blindansatz zum Kontrollansatz zu berücksichtigen.

A.3.2 Spezielle Reinigungsverfahren

Keine Angaben

A.3.3 Haltbarkeit von Chemikalien. Lösungen, Standards

Die angesetzte Resazurinlösung ist bei 4°C im Dunkeln bis zu einer Woche haltbar. Nährmedien und Phosphatpuffer sind vor Gebrauch zu autoklavieren. Die autoklavierten Nährmedien sind bei 4°C bis zu 1 Woche haltbar.

A.3.4 Stabilität der Geräteparameter (z.B. Nullpunkt, Temperatur)

Keine Angaben

A.3.5 häufig auftretende Kontaminationen / Hinweise zur Vermeidung

Zur Vermeidung von Kontaminationen sollen vornehmlich Geräte aus Glas verwendet werden. Zum Aufbewahren von Lösungen dürfen nur sterile Glasgeräte verwendet werden. Für die Probenahme dürfen nur sorgfältig gereinigte Glasgeräte verwendet werden.

A.3.6 chromatographische Verfahren

Keine Angaben

A.3.7 Verfügbarkeit von Standardreferenzmaterialien mit Herstellernachweis

A.4 Proben / Probenaufbereitung

A.4.1 Hinweise zur Probennahme

Die Proben an einer definierten Stelle als Stichproben entnehmen. Probenbehälter bis zum Rand füllen. Das Probenvolumen kann je nach Umfang der Untersuchungen schwanken. Eine Probenmenge von etwa 250 ml wird empfohlen.

A.4.2 Probenstabilität / Probenkonservierung

Um Veränderungen der ursprünglichen Beschaffenheit durch physikalisch/chemische Reaktionen oder biologische Vorgänge so gering wie möglich zu halten, ist der Test zeitnah nach der Probennahme durchzuführen. Die Proben können gekühlt (2-5°C) maximal bis zu 14 Tagen im Dunkeln aufbewahrt werden.

A.4.3 „clean up“

Nicht relevant

A.5 Kalibrierung

A.5.1 Art der Kalibrierung

Keine Angaben

A.5.2 verwendete Referenz- / Kontroll- / Kalibriersubstanzen

Keine Angaben

A.5.3 kalibrierter Konzentrationsbereich

Keine Angaben

A.5.4 Präzision bei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus

Keine Angaben

A.6 Untersuchung zur Richtigkeit

Keine Angaben

A.6.1 verwendetes Referenzmaterial

Keine Angaben

A.6.2 Blindwerte

Keine Angaben

A.6.3 Abweichungen vom Sollwert bei unterschiedlichen Konzentrationen

Keine Angaben

A.7 Untersuchung zur Wiederfindung

Keine Angaben

A.7.1 eingesetzte Matrices

Keine Angaben

A.7.2 Höhe und Schwankung der Wiederfindung

Keine Angaben

A.8 Probleme bei der Probenuntersuchung / Testdurchführung

A.8.1 Störungen

(siehe A.2.1)

A.8.2 besondere Durchführungsschwierigkeiten

Keine Angaben

A.9 Verfahrenskenndaten zur Kontrolle der Richtigkeit, Präzision, Robustheit (aus Ringversuchen)

A.9.1 analysierte Parameter

- Dehydrogenaseaktivität von *Arthrobacter globiformis* in dotiertem künstlichen Sediment. Dotiert mit BAC und Zink
- Ermittlung von Hemmungen der Stoffwechselaktivität

A.9.2 verwendete Referenzmaterialien

dotiertes Sediment mit:

- BAC
- Zink (zugegeben als Zinksulfat-Heptahydrat, CAS-Nr. 7446-20-0)

Die von Sigma (Art.-Nr. B-4136) bezogene Substanz Benzalkoniumchlorid ist ein Gemisch aus Alkylbenzdimethylammoniumchloriden und besteht hauptsächlich aus C₁₂-Homologen, enthält aber auch C₁₄ und C₁₆-Homologe.

A.9.3 untersuchte Matrices

künstliches Sediment

A.9.4 untersuchte Konzentrationsniveaus

EC₅₀-Werte der dotierten Chemikalien

BAC: 600 mg/kg TG

Zink: 1200 mg/kg TG, zugegeben als Zinksulfat-Heptahydrat

A.9.5 Zahl der teilnehmenden Labors

16

A.9.6 Ausreißerquote

BAC-dotiertes Sediment: 0,00%

Zink-dotiertes Sediment: 7,69%

A.9.7 Wiederholvariationskoeffizient

BAC-dotiertes Sediment: 17,51%

Zink-dotiertes Sediment: 15,67%

A.9.8 Vergleichsvariationskoeffizient

BAC-dotiertes Sediment: 31,01%
Zink-dotiertes Sediment: 35,72%

A.9.9 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Keine Angaben

A.9.10 ggf. Vergleich mit Ergebnissen anderer Verfahren

B Zusätzliche Validierungskriterien für biologische Testverfahren

B.1 Biologische Systeme

B.1.1 Herkunft und Bezugsmöglichkeit

Arthrobacter globiformis,
Stammnummer 20124 DSMZ
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Mascheroder Weg 1b
38124 Braunschweig

B.1.2 Vorbehandlung, Akklimatisation, Adaption

Die Herstellung einer Vorkultur sieht eine Kultur aus Gründen der Praktikabilität über Nacht vor. Nach unserer Erfahrung befindet sich diese Kultur bei 30 °C noch in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Angabe von 14 bis 16 Stunden ist daher als maximale Kulturzeit zu betrachten.

B.1.3 Aufbewahrung, Hälterung, Zucht

Die Bakterien werden zur Aufbewahrung mit DMSO 4% (V/V) versetzt und bei –20°C portioniert eingefroren.

A. globiformis bildet die zahlenmäßig dominierende Fraktion der aeroben chemotrophen Bodenmikroflora. Eine charakteristische Eigenschaft der Gattung *Arthrobacter* ist die Vielgestaltigkeit (Pleomorphie) während des Wachstumszykluses. In jungen Kulturen zeigen sich in der logarithmischen Phase Stäbchen, die teilweise verzweigt sind (0,5 - 0,8 * 1 - 4 µm) und die sich in der stationären Phase zu kokkoiden Formen verkürzen (Ø 0,6 - 0,8 µm). In der exponentiellen Phase ist *Arthrobacter* grampositiv und in der stationären gramlabil.

Es ist empfehlenswert, daß Labors mit geringer Erfahrung bei der Kultur von Mikroorganismen eine Wachstumskurve der Testorganismen aufnehmen. Als Beobachtungsgrößen können die Bestimmungen von Zellzahl und optischer Dichte gewählt werden. Die unterschiedlichen Wachstumsphasen sollten durch makroskopische und mikroskopische Beobachtungen begleitet werden, da Corynebakterien in der stationären Phase oder unter ungünstigen Bedingungen ausflocken können. Corynebakterien besitzen hydrophobe Oberflächeneigenschaften und lagern sich daher gut an natürliche Feststoffe an. Die Bakterien *B. cereus* und *A. globiformis* wurden auf diese Fähigkeit getestet und ursprünglich aus diesem Grund als Testorganismen ausgewählt.

B.1.4 Nahrung, Futterqualität

Nährmedium für *Arthrobacter* entspricht dem Nährmedium für Corynebakterien der DSMZ:

Pepton aus Casein	10,0	g/l
Hefeextrakt	5,0	g/l
D(+)- Glukose	5,0	g/l
NaCl	5,0	g/l

in Wasser lösen und mit Wasser auf 1000 ml auffüllen.

— Das Nährmedium bei 120 °C±3 °C 20 min autoklavieren.

Für die Vorkultur und den Testansatz wird das Nährmedium 0,33fach konzentriert eingesetzt.

B.1.5 Qualitätskriterien der Testorganismen

Die Testorganismen sollen in den Kontrollansätzen eine Enzymaktivität zeigen, die einem Reazurinumsatz (gemessen als Extinktionsabnahme) von 60 (±10)% entspricht. Damit wird eine ausreichende Aktivität der Bakterien gewährleistet, ohne dass das Enzymsubstrat limitiert wird.

B.1.6 Zeitintervall, in denen ein Einsatz möglich ist

Die eingefrorenen Bakterien sind jederzeit einsetzbar.

B.2 Proben und Probenvorbereitung

B.2.1 Probennahme

Die Probenahme von kontaminierten Feststoffen erfolgt entsprechend den Materialien (z.B. Boden nach DIN 4021). Auch wenn nur geringe Probenmengen benötigt werden, sollten mindestens 100 ml Probenvolumen genommen werden, um ausreichend repräsentativ für eine Probenstelle zu sein – empfohlen werden 250 ml.

B.2.2 geeignete und ungeeignete Probenkonservierungsbedingungen und –techniken

Alle zu testende Feststoffe so schnell wie möglich untersuchen. Eine Probenlagerung im Dunkeln bei 2-5°C ist bis zu 14 Tagen möglich. Eine Probenkonservierung durch chemische Zusätze oder andere Probenkonservierungstechniken (z.B. thermische Behandlung) sind nicht zulässig. Getrocknete Proben sind zwar prinzipiell möglich zu untersuchen, sollten aber nur in Ausnahmefällen und unter Angabe der Vorbehandlung genutzt werden. Die Hinweise in DIN EN ISO 5667-16 sind zu beachten.

B.2.3 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung ist abhängig von der Art des Testguts. Bei der Verwendung von Modellsubstraten sind in der Regel keine besonderen Vorbereitungsschritte, außer einer Gleichgewichtseinstellung zwischen Feststoff und Wasserphase zu beachten.

Bodenmaterialien sind ebenfalls meist unproblematisch, es sei denn sie stammen aus der ungesättigten Zone und erzeugen ähnliche Störungen wie Sedimente.

Sedimente sind problematisch, wenn sie anoxisch sind und eine hohe mikrobielle Aktivität besitzen.

Vorbehandlung von anoxischen Sedimenten

Alle Testorganismen benötigen für ihren Metabolismus Sauerstoff im Testansatz. Obwohl die meisten kontaminierten Sedimente anoxisch sind, darf diese Eigenschaft die Biotests nicht

beeinflussen. Theoretisch liegen zwischen den oxischen und anoxischen Endpunkten eine Reihe von graduellen Zwischenstadien. Um eine Methodenanpassung zu erreichen, müßte zuerst bekannt sein, ob die zu untersuchenden Proben anoxisch sind und wie stabil diese sich unter Sauerstoffzufuhr verhalten.

In natürlichen Sedimenten ist das Redoxpotential sehr unterschiedlich. Es wird vor allem durch mikrobielle Prozesse im Verlauf des Kohlenstoffabbaues bestimmt. Idealisiert kann eine vertikale Schichtung mit von oben nach unten abnehmendem Redoxpotential angenommen werden. Auf eine aerobe Zone folgt zunächst die Zone der Manganreduktion, dann werden Nitrate, dann Eisenhydroxide und Sulfate verwertet. Da Sedimente durch Strömung oder Bioturbation durchmischt werden können, variieren die verschiedenen Redoxbedingungen auf sehr kleinem Raum. Meist sind nur die obersten Millimeter eines Sedimentes oxisch. Die Redoxpotentiale der Sedimentproben, die im Rahmen des Baggergutuntersuchungsprogrammes aus dem Hamburger Hafen untersucht wurden, wurden sofort nach Ankunft im Labor nach DIN 38404-6 gemessen. Die Potentiale der Oberflächenproben lagen zwischen -40 und +140 mV. Die Oberflächenproben wurden mit einem Kastengreifer genommen, die obersten Zentimeter wurden gesammelt, homogenisiert und in die Probengefäße gefüllt. Aufgrund der Redoxpotentiale konnte nicht davon ausgegangen werden, daß es sich nur um die oxische Sedimentschicht handelte, es war eher ein Gemisch aus oxischer und sauerstofffreier Schicht. Die Sedimentkerne wurden mit einem Corer genommen. Die Kerne wurden homogenisiert und in die Probengefäße gefüllt.

Es wurden zwei Verfahren zur Vorbehandlung der Sedimente verglichen. Bei der ersten Methode wurden die Sedimente direkt in die Probengefäße eingewogen, mit 2 mL Reinstwasser verdünnt und 1 bis 48 Stunden überkopf geschüttelt. Im zweiten Verfahren wurde eine größere Sedimentmenge eingewogen und mit Wasser 1:3 (w/v) verdünnt. Die Suspension wurde unter Belüftung gerührt. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, daß leicht flüchtige Schadstoffe ausgestrippt werden können. Nach 1, 24 und 48 Stunden wurden pH- und Redoxwerte gemessen. Die Entwicklung des Redoxpotentials unterschied sich zwischen geschüttelten und belüfteten Proben nicht wesentlich. In den Sedimentkernen stieg bereits nach 10 Minuten Rühren das Redoxpotential deutlich an, nach einer Stunde wurden Werte um 380 mV erreicht, die sich auch nach 48 Stunden nicht mehr wesentlich veränderten. In den Oberflächensedimenten wurden nach 24 Stunden Redoxpotentiale von etwa 550 mV erreicht.

In den belüfteten Proben blieb der pH-Wert weitgehend konstant, in den geschüttelten Proben sank der pH in fast allen Proben um 0,5 bis 1. Die pH-Werte der Sedimente lagen zwischen 6,5 und 7,8. Da die Sedimente wenig gepuffert waren, hatten die Testansätze nach dem Beimpfen mit Testbakterien einen pH-Wert von etwa 7. Um ein möglichst hohes Redoxpotential zu erreichen und einen zu starken Abfall des pH-Werts zu vermeiden, ist ein Belüftungszeitraum von 24 bis 48 Stunden geeignet.

Um einen weiteren Hinweis zu erhalten, ob eine Vorbehandlungszeit von 24 oder von 48 Stunden für den Dehydrogenasetest günstiger ist, wurden die Variabilitäten der chemischen Resazurinumsetzung nach diesen Zeitspannen untersucht. Nach 48 Stunden lagen die Variationskoeffizienten von 15 Oberflächensedimenten alle unter 5 %, bei 14 Proben waren sie sogar niedriger als 3 %. Die Streuungen der chemischen Resazurinreduktion waren so klein, daß alle Versuche ausgewertet werden konnten. Die chemische Aktivität der Sedimente, die nur 24 Stunden geschüttelt worden waren, streute weitaus mehr. 10 der 15 Proben hatten einen Variationskoeffizienten von über 10 %, 6 der Proben sogar von über 20 %. Daraus wurde abgeleitet, daß bei den untersuchten Sedimenten als Vorbehandlung 48 Stunden Schütteln in den Probengefäßen am günstigsten für eine vollständige Belüftung ist.

Vorbehandlung von biologisch aktiven Sedimenten

Um bei enzymatischen Testverfahren in allen Proben vergleichbare Ausgangsbedingungen zu haben, ist es notwendig, daß den Testorganismen in der Kontrolle und in den Proben zu Anfang der Reaktion etwa die gleiche Menge an Substrat zur Verfügung steht. Die mikrobi

elle Eigenaktivität der Sedimente stört die Toxizitätsbestimmung stark, da die Aktivität der autochthonen Mikroflora in ähnlichen Größenordnungen liegen kann wie die der Testbakterien.

Eine Möglichkeit, die Enzymaktivität der Testbakterien trotz der biologischen Aktivität der Sedimente zu untersuchen, besteht darin, die Substratkonzentrationen so weit zu erhöhen, daß den Testbakterien zu Anfang des Versuches in allen Ansätzen eine ähnliche Substratmenge zur Verfügung steht. Bei dieser Vorgehensweise wird das Sediment, da es nicht sterilisiert werden muß, am wenigsten verändert. Ein entscheidender Nachteil dieser Vorgehensweise ist, daß vor dem Versuch für jede Probe die optimale Resazurinkonzentration ermittelt werden mußte, da die Aktivität der autochthonen Mikroorganismen sehr verschieden sein kann. Diese Vorgehensweise ist sehr zeitaufwendig und nur durchzuführen, wenn wenige Proben untersucht werden müssen

Im Rahmen von Reihenuntersuchungen ist es günstiger, die biologische Aktivität der Sedimente vor dem Einsatz im Test so weit zu unterdrücken, dass während der Dauer des Testes kein nennenswerter Umsatz der Enzymsubstrate durch die autochthone Mikroflora stattfindet. Da Sedimente durch Autoklavieren sehr stark verändert werden, ist diese Methode am wenigsten zur Sterilisation zu empfehlen (ASTM, 1991). Der Einsatz von bakteriziden Agenzien scheidet aus prinzipiellen Gründen aus. Daher wurde als schonendes Verfahren zur biologischen Inaktivierung der Sedimente die Möglichkeit überprüft, sie kurzzeitig in der Mikrowelle zu erhitzen und so Enzymaktivitäten der Sedimentbiozönose für die Dauer des DHA-Sedimentkontakttestes zu unterdrücken. Um in allen Testansätzen die biologische Aktivität zu unterdrücken, war es notwendig, die Testansätze (PE-Zentrifugenröhrchen, Durchmesser 16 mm) vor der Zugabe der Testorganismen mindestens 3 mal für 10 Sekunden zu erhitzen. Dabei wurden die Proben kurzzeitig auf 80 - 90 °C erwärmt. In diesen Ansätzen fand kein biologischer Resazurinumsatz mehr statt. Wahrscheinlich wurde ein Großteil oder alle aktiven Mikroorganismen abgetötet. Kürzere Zeiten oder niedrigere Temperaturen führten dazu, dass die Dehydrogenaseaktivität der Sedimente nicht in allen Proben unterdrückt wurde. Eine besser zu handhabende Methode ist das zwei- bis dreimalige Erhitzen des Testgutes bei 80 °C (jeweils 10 Minuten bei PE-Zentrifugenröhrchen, Durchmesser 16 mm) im Wasserbad mit sofortiger Abkühlung im Wasserbad wieder auf Raumtemperatur. Ein messbarer Resazurinumsatz durch die autochthonen Organismen wurde auch hierdurch für mindestens 6 Stunden unterdrückt.

Literatur

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (1991) Guide for collection, storage, characterisation and manipulation of sediments for toxicological testing. ASTM Standard E 1391-90. In: BURTON, G.A., JR. (ed.): 513/873-2201, 1 - 15. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

B.3 Kalibrierung

B.3.1 Auswahl und Einsatz geeigneter Referenz- oder Kontrollsubstanzen, um die Empfindlichkeit der Organismen zu prüfen oder die Abbaupotenz eines Inokulums zu definieren.

Dotierung eines künstlichen Feststoffes mit Benzalkoniumchlorid (600mg/kg TG) zur Sensitivitätsprüfung der Testorganismen. Benzalkonium wurde von der Firma Sigma bezogen. Benzalkonium wird zu 99% von dem künstlichem Sediment gebunden. Es ist somit eine Kontrollsubstanz für den gesamten Test. Die Sensitivitätsprüfung kann auch mit p-Nitrophenol erfolgen, das nur zu etwa 2 % am künstlichen Sediment sorbiert. 80 mg/L p-nitrophenol ergaben eine Hemmung von 34,4 % bis 77,5 % (Extremwerte) mit *B. cereus* als Testorganismus. Bei einer Standardabweichung von 12,9 % ergab sich ein relativer Variationskoeffizient von 4,6 %.

B.3.2 Verwendung von Referenz- oder Kontrollsubstanzen in Ökotoxizitätstests, die unter den Testbedingungen stabil und bei der Testkonzentration in Lösung bleiben.

Es wurden eine Reihe von Substanzen getestet, die in der Regel an Feststoffe sorbieren, da der Test für diese Fragestellung entwickelt wurde. P-Nitrophenol stellt eine Ausnahme dar und wurde unter B3 beschrieben.

Literatur zu der Wirkung von Stoffen in Kontakttests:

Hayen, W. (1997): Beurteilung der Kombinationswirkung von binären Stoffgemischen auf die Dehydrogenaseaktivität von *Arthrobacter globiformis* in Bodensuspensionen, Diplomarbeit Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

Liß, W. (1997) Vergleich mikrobieller Biotests zur ökotoxikologischen Bewertung kontaminierter Sedimente unter Berücksichtigung der Wirkpfade von Schadstoffen Fortschr.-Ber. VDI Reihe 15 Nr. 176 Düsseldorf: VDI Verlag 1997.

Janßen, E. (1996): Applikation des Dehydrogenasen-Kontakttests für *Arthrobacter globiformis* und vergleichende Untersuchungen zur Sensitivität, Diplomarbeit Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

Rönnpapel, K.; Liß, W.; Ahlf, W. (1995) Microbial bioassays to assess the toxicity of solid associated contaminants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31, 99-103.

Rönnpapel, K.; Janßen, E.; Ahlf, W. (1998) Asking for the indicator function of bioassays evaluating soil contamination: Are bioassay results reasonable surrogates of effects on soil microflora? *Chemosphere*, 36, 1291-1304.

B.3.3 Verwendung von Referenz- oder Kontrollsubstanzen in Abbautests, die unter den Testbedingungen ein geeignetes, reproduzierbares Abbauverhalten zeigen.

Keine Angaben

B.3.4 Messung und Berücksichtigung von Blindwerten, um Effekte der Testumgebung ohne das Testgut auf die Testorganismen zu erfassen.

Keine Angaben

B.3.5 Vergleich der Messwerte, die mit Referenz- oder Kontrollsubstanzen und Blindwerten in Ringversuchen erhalten wurden, um eine Aussage zur Reproduzierbarkeit der Methode machen zu können.

Siehe A.9.4 – 9.8

B.4 Analytik und Informationen über Testsubstanzen

B.4.1 Eignung und Reproduzierbarkeit der vorgesehenen Analytik als Messparameter in Abbautests.

Die Methode kann bei Abbautests als Begleitparameter Anwendung finden. Eine Stimulation kann eine potenzielle Abbaubarkeit von dotierten Stoffen in Böden anzeigen.

B.4.2 Hinweise, ob und welche Angaben über Testsubstanzen bei der späteren Anwendung der Testmethode vorliegen sollten.

Die Hinweise in DIN EN ISO 5667-16 sind zu beachten

B.5 Testansätze und Testdurchführung

B.5.1 Etablierung von Kriterien zur Prüfung von Testsubstanzen in realitätsnahen Matrices.

Keine Angabe

B.5.2 Etablierung von Prüfkriterien oder Kriterien zum Ausschluss problematischer Testsubstanzen bei Abbauprüfungen.

Keine Angabe

B.5.3 Etablierung von Kriterien zur Erreichung einer ausreichenden Verteilung schwer wasserlöslicher Stoffe in Testansätzen für Abbauprüfungen.

Keine Angabe

B.5.4 Zugabe der Testsubstanz in die Testsysteme.

Gut wasserlösliche Testsubstanzen in Wasser lösen und zum Feststoff geben. Schwer wasserlösliche Stoffe in einem geeigneten, schnell verdampfenden Lösemittel (z.B. Aceton) lösen, mit einer Pipette die Testsubstanz-Stammlösung auf den getrockneten Feststoff zur Dotierung auftropfen und die Lösung sorgfältig einrühren. Anschliessend so lange offen stehen lassen, bis das Lösungsmittel verdampft ist. Definiertes Feuchtgewicht einstellen. Die so vorbereiteten Feststoffe 3 Tage bei Raumtemperatur stehen lassen, um eine Gleichgewichtseinstellung zu ermöglichen.

B.5.5 Definition des Anwendungsbereichs und der Auswertekriterien für problematische Testsubstanzen in Ökotoxizitätstests.

Keine Angaben

B.5.6 Etablierung von Kriterien zur Erkennung der Stabilität von Prüfsubstanzen in Testansätzen.

Keine Angaben

B.5.7 Etablierung von Kriterien zur Erkennung toxischer Wirkungen in Abbauansätzen.

Keine Angaben

B.5.8 Festlegung geeigneter Testbedingungen.

Keine Angaben

B.5.9 Festlegung und ggf. Begründung der Wahl des Test- oder Kulturmediums.

siehe:

Janßen, E.: Applikation des Dehydrogenasen-Kontakttests für *Arthrobacter globiformis* und vergleichende Untersuchungen zur Sensitivität, 1996, Diplomarbeit Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

B.5.10 Festlegung und ggf. Begründung des gemessenen Effektes

Keine Angaben

B.5.11 Vorsehen von Plausibilitätskontrollen und ggf. statistische Behandlung der Mess- und Kontrollwerte.

Keine Angaben

B.6 Verfahrenskennndaten

Siehe A.9

Anlagen zum Validierungsprotokoll

1 Organisation der Ringversuche

1.1 Durchführung der Ringversuche

Zur Validierung der DIN L48 wurde ein Ringversuch, bestehend aus zwei dotierten Sedimentproben und einem Kontrollsediment durchgeführt. Der Ringversuch wurde durch die Firma

Dr. Fintelmann und Dr. Meyer
Handels- und Umweltschutzzlaboratorien GmbH
Mendelssohnstr. 15D
22761 Hamburg

unter der Leitung von Frau Dr. Neumann-Hensel organisiert. In Vorbereitung des Ringversuchs erfolgte der zentrale Versand der Arbeitsvorschrift und des Testbakteriums *Arthrobacter globiformis*. So wurde abgesichert, dass alle Teilnehmer den selben Bakterienstamm verwendeten.

1.2 Versand der Proben

Die Proben wurden in Glasgefäßen im März 1998 an die Teilnehmer versandt.

1.3 Teilnehmende Laboratorien

Arbeitsgruppe Analytik und Umwelttechnik Peutestr. 51, 20539 Hamburg (Herr Kunze).

Bayrisches Landesamt f. Wasserwirtschaft, Institut für Wasserforschung, Kaulbachstr. 37
80539 München (Herr Dr. Popp).

Bundesanstalt für Gewässerkunde, Außenstelle Berlin, Außenstelle Berlin Schnellerstr. 140,
12439 Berlin (Frau Pfitzner).

ECT Ökotoxikologie GmbH Oekotoxikologie GmbH, Böttgerstr. 2-14, 65439 Flörsheim/Main
(Herr Dr. Bruns)

Dr. Fintelmann und Dr. Meyer GmbH, Mendelssohnstr. 15D, 22761 Hamburg (Frau Neumann-Hensel).

Fraunhofer IUCT Außenstelle für Biochemische Ökotoxikologie, Arthur-Scheunert-Allee 114,
14558 Bergholz-Rehbrücke (Frau Dr. Wenzel).

GKSS Forschungszentrum, Max-Planck-Str. 21502 Geesthacht (Frau B. Schmidt)

Hüls Infracor GmbH, Prüfinstitute für Analytik, Biologie und Toxikologie, Paul-Baumann-Str.
1, 45764 Marl (Frau Dr. Diefenbach).

Ruhrverband Essen, Kronprinzenstr. 37, 45128 Essen (Frau Zander-Hauck).

RWTH Aachen, Bio V Ökologie, Ökotoxikologie, Ökochemie, Worringerweg 1, 52056 Aachen (Dr. T. Ratte)

TU Berlin, Fachbereich 07 Institut für Ökologie und Biologie, Keplerstr. 4-6, 10589 Berlin (Prof. P.-D. Hansen).

TU Hamburg-Harburg AB Umweltschutztechnik, Eißendorferstr. 21077 Hamburg (Herr Dr. Ahlf).

UFZ Leipzig-Halle GmbH, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig (Herr Dr. Altenburger).

Umweltbundesamt, Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Versuchsfeld Marienfelde, Schichauweg 58, 12307 Berlin (Herr Dr. Pluta).

Umweltschutz Nord GmbH & Co. Industriepark 6 27767 Ganderkesee (Frau Viebranz).

Universität Oldenburg, Institut für angewandte Toxikologie und Umwelthygiene GmbH, Carl von Ossietzky Str. 26111 Oldenburg (Dr. M. Müller).

2 Auswertung der Ergebnisse

2.1 Statistische Auswertung

16 Labors beteiligten sich am Ringversuch. Alle Teilnehmer gaben Ergebnisprotokolle ab. Zwei Ergebnisse wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die Auswertung erfolgte nach DIN 38402 Teil 42 und wurde von Frau Donnevert , Fachhochschule Giessen Friedberg durchgeführt. Die Ergebnisse der Auswertung sind als Anlagen dem Protokoll beigefügt.