

Thomas Ziehl

**Einsatz von Biotests in der
Routine-Gewässerüberwachung des
Saarlandes**

Diplomarbeit

BEI GRIN MACHT SICH IHR WISSEN BEZAHLT



- Wir veröffentlichen Ihre Hausarbeit, Bachelor- und Masterarbeit
- Ihr eigenes eBook und Buch - weltweit in allen wichtigen Shops
- Verdienen Sie an jedem Verkauf

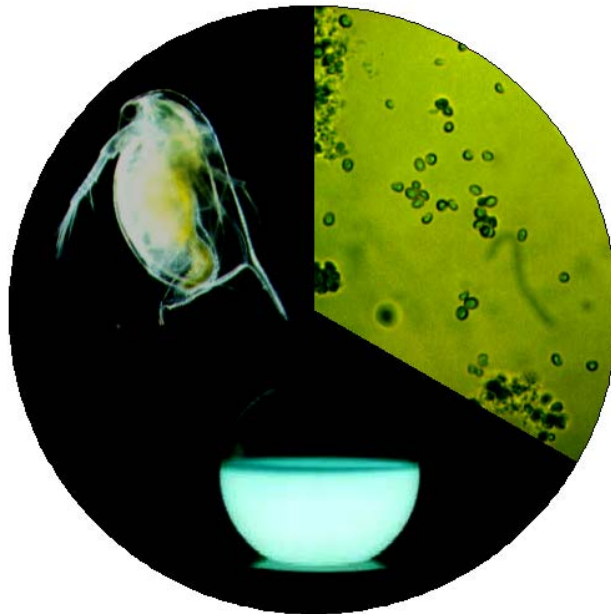
Jetzt bei www.GRIN.com hochladen
und kostenlos publizieren



Institut für Mikrobiologie an der Universität des Saarlandes

Diplomarbeit

Einsatz von Biotests in der Routine- Gewässerüberwachung des Saarlandes



angefertigt am Lehrstuhl für Mikrobiologie
in Zusammenarbeit mit dem

Staatlichen Institut für Gesundheit und Umwelt Saarbrücken

von

Thomas Zieh

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Kaltwasser für die Vergabe des sehr interessanten und praxisrelevanten Themas sowie für seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. H-D. Janke, der freundlicherweise die Zweitkorrektur der Arbeit übernahm.

Den MitarbeiterInnen des Lehrstuhls für Allgemeine Mikrobiologie danke ich für die freundliche Aufnahme und die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt Herrn Diplom-Biologen Christof Siersdorfer und Frau Diplom-Biologin Simone Peter für ihre Diskussionsbereitschaft, Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen MitarbeiterInnen des Staatlichen Instituts für Gesundheit und Umwelt in Saarbrücken, die mich bei meiner Arbeit unterstützten.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Diplom-Biologen Adam Schmitt für seine stete Diskussionsbereitschaft, seine wertvollen Tips bei der Ausarbeitung und seine Mitarbeit bei der Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Herrn Diplom-Biologen Christoph Klein danke ich für seine tatkräftige Hilfe bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Der Firma Dr. Lange GmbH danke ich für die Bereitstellung der Materialien für den LCK 486-Leuchtbakterientest.

Mein Dank gilt außerdem all denen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit durch konstruktive Kritik unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meiner Freundin Ana João Trindade für ihre Geduld und hilfreiche Unterstützung in der Endphase der Ausarbeitung.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre.

Abkürzungsverzeichnis

AOX	Adsorbierbare Organische Halogenverbindungen
AQS	Analytische Qualitätssicherung
ARGE	Arbeitsgemeinschaft
ASW	Artificial Sea Water (KREBS 1992 a)
BSB ₅	Biologischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen
CEN	Comité Européen de Normalisation
CKW	Chlorierte Kohlenwasserstoffe
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DEV	Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Dissolved Organic Carbon
EC ₂₀	Effektive Konzentration eines (Schad-)Stoffes, bei der Organismen im Biotest zu 20 % gehemmt werden
EC ₅₀	Effektive Konzentration eines (Schad-)Stoffes, bei der Organismen im Biotest zu 50 % gehemmt werden
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G _A	Verdünnungsstufe einer Testreihe, bei der erstmalig eine Hemmwirkung von weniger als 20 % auf die Biomasseproduktion der Algen auftritt (Algentest)
G _D	Verdünnungsstufe einer Testreihe, bei der erstmalig eine Hemmwirkung von weniger als 5 % auf die Schwimmfähigkeit der Daphnien auftritt (Daphnientest)
G _F	Verdünnungsstufe einer Testreihe, bei der erstmalig alle Fische überleben (Fischtest)
G _{L, 30 min}	Verdünnungsstufe einer Testreihe, bei der erstmalig eine Leuchthemmung von weniger als 20 % nach 30 min (24 h) Kontaktzeit auftritt (LCK 486-Leuchtbakterientest)
G _{L, 24 h}	
G _{L, DIN}	Verdünnungsstufe einer Testreihe, bei der erstmalig eine Leuchthemmung von weniger als 20 % auftritt (DIN-Leuchtbakterientest)
GLP	Good Laboratory Practice
ICP-MS	Induktiv gekoppeltes Plasma mit Massenspektrometer
ISO	International Organisation for Standardisation
K.A.	Keine Angabe
LAWA	Länderarbeitsgemeinschaft Wasser
LC ₅₀	Letale Konzentration eines Stoffes, bei der 50 % der Fische überleben (Fischtest)
OD ₅₈₅	Optische Dichte bei 585 nm
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenstoffe
PCB	Polychlorierte Biphenyle

PCDD	Polychlorierte Dibenzodioxine
PCDF	Polychlorierte Dibenzofurane
PE	Polyethylen
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
SIGU	Staatliches Institut für Gesundheit und Umwelt Saarbrücken
SSWC	Salted-Sea-Water-Kulturmedium mit C-Quelle (NEALSON 1978)
TASI	Technische Anleitung Siedlungsabfall
TCDD	Tetrachlor-Dibenzodioxin
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TOC	Total Organic Carbon
Upm	Umdrehungen pro Minute

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2. EINLEITUNG	3
3. MATERIAL UND METHODEN.....	12
3.1 NÄHRMEDIEN.....	12
3.1.1 <i>Algen</i>	12
3.1.1.1 Mineralnährmedium nach DIN 38 412 Teil 33 (DEV 1991 a), modifiziert.....	12
3.1.2 <i>Daphnien</i>	13
3.1.2.1 Künstliches Süßwasser nach DIN 38 412 Teil 30 (DEV 1989 a).....	13
3.1.2.2 M4- Medium (ELENDET 1990)	14
3.1.3 <i>Leuchtbakterien</i>	16
3.1.3.1 Salted-Sea-Water-Kulturmedium mit C-Quelle (SSWC, NEALSON 1978).....	16
3.1.3.2 Artificial-Sea-Water-Medium für Leuchtbakterien (ASW, KREBS 1992 a)	16
3.2 PROBESTELLEN	16
3.2.1 <i>Charakterisierung der Probestellen</i>	17
3.2.1.1 Saar-Altarm in Saarlouis	17
3.2.1.2 Heinitzbach bei Neunkirchen	18
3.2.1.3 Rossel bei Emmersweiler	20
3.2.1.4 Prims bei Dillingen.....	21
3.3 PROBENAHME, PROBENVORBEREITUNG UND ELUTIONEN.....	24
3.3.1 <i>Probenahme und Probenvorbereitung nach DIN 38 414 Teil 11 (DEV 1987)</i>	24
3.3.2 <i>Elutionsverfahren</i>	24
3.3.2.1 Bestimmung der Eluierbarkeit mit Wasser im Schüttelversuch ("Präzisierte DEV S 4-Methode") (SIEVERS 1996).....	24
3.3.2.2 Elution mit 1 %iger DMSO- und 2 %iger NaCl-Lösung nach SCHEIBEL et al. (1991).....	25
3.3.2.3 Elution modifiziert nach STOLL (1997).....	25
3.3.2.4 Elution nach DANIELS et al. (1989).....	25
3.4 CHARAKTERISIERUNG DER WASSERPROBEN.....	26
3.4.1 <i>Abwässer</i>	26
3.4.1.1 Temperatur.....	26
3.4.1.2 pH-Wert.....	26
3.4.1.3 Leitfähigkeit	27
3.4.1.4 O ₂ -Gehalt.....	27
3.4.1.5 Weitergehende analytische Untersuchungen	27
3.4.2 <i>Begleitende Analytik bei Oberflächenwässern und Sediment-Eluaten</i>	27
3.5 SEDIMENTUNTERSUCHUNGEN	30
3.5.1 <i>Korngrößenverteilung</i>	30
3.5.2 <i>Bestimmung des Wassergehaltes und des Trockenrückstandes nach DIN 38 414 Teil 2 (DEV 1985 a)</i>	30
3.5.3 <i>Bestimmung des Glührückstands und des Glühverlusts nach DIN 38 414 Teil 3 (DEV 1985 b)</i> ... 31	31
3.6 LAGERUNG DER PROBEN.....	31
3.6.1 <i>Eluate und Oberflächenwasserproben</i>	31
3.6.2 <i>Direkteinleiterproben</i>	31
3.6.3 <i>Referenzproben</i>	32
3.7 BIOLOGISCHE TESTMETHODEN	32
3.7.1 <i>Algentest modifiziert nach DIN 38 412 Teil 33 (DEV 1991 a)</i>	32
3.7.1.1 Testorganismus und Grundlage des Verfahrens	32
3.7.1.2 Anzucht und Stammhaltung	32
3.7.1.3 Inkubationsbedingungen.....	32
3.7.1.4 Probenvorbereitung	32
3.7.1.5 Herstellung der Vorkultur.....	33
3.7.1.6 Testdurchführung	33
3.7.1.7 Messung	33
3.7.1.8 Auswertung und Gültigkeitskriterium	34
3.7.1.9 Gültigkeitskriterium	34
3.7.2 <i>Daphnientest nach DIN 38 412 Teil 30 (DEV 1989 a)</i>	35
3.7.2.1 Testorganismus und Grundlage des Verfahrens	35
3.7.2.2 Anzucht und Stammhaltung	35
3.7.2.3 Probenvorbereitung	35
3.7.2.4 Gewinnung geeigneter Testtiere	35

3.7.2.5	Testdurchführung	36
3.7.2.6	Auswertung	36
3.7.2.7	Gültigkeitskriterien.....	36
3.7.3	<i>Leuchtbakterientest nach DIN 38 412 Teil 34 (DEV 1991 b)</i>	37
3.7.3.1	Testorganismus und Grundlage des Verfahrens	37
3.7.3.2	Probenvorbereitung	37
3.7.3.3	Testdurchführung	37
3.7.3.4	Messung und Auswertung	38
3.7.3.5	Gültigkeitskriterien.....	39
3.7.3.6	Farbkorrektur für stark gefärbte Proben nach LUMIStox Applikation 01 (DR. LANGE GMBH a).....	39
3.7.4	<i>Leuchtbakterientest LCK 486</i>	40
3.7.4.1	Testorganismus und Grundlage des Verfahrens	40
3.7.4.2	Probenvorbereitung	40
3.7.4.3	Testdurchführung	40
3.7.4.4	Messung und Auswertung	41
3.7.4.5	Gültigkeitskriterien für den LCK 486-Test.....	41
3.7.5	<i>Referenzproben zur Qualitätssicherung der Biotestergebnisse</i>	42
3.8	MIKROSKOPIE	42
3.8.1	<i>Lichtmikroskopie</i>	42
3.8.1.1	Optische Geräte	42
3.8.1.2	Längenmessung	42
3.8.1.3	Zellzahlbestimmung	42
3.8.2	<i>Transmissionselektronenmikroskopie</i>	43
3.8.2.1	Optische Geräte	43
3.8.2.2	Fixierung und Einbettung der Präparate	43
3.8.2.3	Herstellung der Ultradünnschnitte	44
3.8.2.4	Kontrastierung der Ultradünnschnitte.....	44
4.	ERGEBNISSE	45
4.1	VALIDIERUNG DER BIOTESTS.....	45
4.1.1	<i>Algentest, modifiziert nach DIN 38 412 Teil 33 (DEV 1991 a)</i>	45
4.1.1.1	Überprüfung des Einflusses der Stellplätze auf die Biomasseproduktion.....	45
4.1.1.2	Einfluß der NaHCO ₃ -Konzentration auf das Algenwachstum.....	46
4.1.1.3	Einfluß einer 1 %igen (v/v) DMSO-Lösung auf das Wachstum der Algen.....	47
4.1.2	<i>Daphnientest nach DIN 38 412 Teil 30 (DEV 1989 a)</i>	48
4.1.2.1	Bestimmung des EC ₅₀ -Wertes von Kaliumdichromat	48
4.1.2.2	Bestimmung des Einflusses von DMSO auf die Schwimmfähigkeit der Daphnien	49
4.1.3	<i>Leuchtbakterientest nach DIN 38 412 Teil 34 (DEV 1991 b)</i>	50
4.1.3.1	Bestimmung der EC ₂₀ - und EC ₅₀ -Werte von Ammoniumacetat, Dimethylsulfoxid und Phenol	50
4.1.3.2	Untersuchung des Einflusses von DMSO auf die Wirkung von Phenol auf die Leuchtbakterien.....	51
4.1.4	<i>Leuchtbakterientest LCK 486</i>	53
4.1.4.1	Bestimmung der Hemmwirkung von Phenol auf Leuchten und Wachstum der Leuchtbakterien.....	53
4.1.4.2	Bestimmung der Hemmwirkung von Ammoniumacetat auf Leuchten und Wachstum der Leuchtbakterien.....	54
4.1.4.3	Untersuchung des Einflusses von DMSO auf Leuchten und Wachstum der Leuchtbakterien.....	56
4.1.4.4	Überprüfung des Einflusses der Probenfiltration auf die Ergebnisse im chronischen Leuchtbakterientest	57
4.2	ABWASSERUNTERSUCHUNGEN MIT BIOTESTS.....	59
4.2.1	<i>Ablauf Rauchgaswäsche Kraftwerk</i>	60
4.2.2	<i>Ablauf Deponiesickerwasser-Kläranlage</i>	60
4.2.3	<i>Ablauf Kommunale Kläranlage</i>	61
4.2.4	<i>Kokereiabwässer</i>	62
4.2.4.1	Probe 130/97	62
4.2.4.2	Probe 584 /97	63
4.2.4.3	Probe 781/97	64
4.3	OBERFLÄCHENWASSERUNTERSUCHUNG MIT BIOTESTS	65
4.3.1	<i>Rossel, Heinitzbach und Altarm Saarlouis</i>	65
4.3.2	<i>Prims bei Dillingen</i>	66
4.4	UNTERSUCHUNG DER SEDIMENTPROBEN	67
4.4.1	<i>Chemisch-physikalische Untersuchungen</i>	67
4.4.1.1	Bestimmung der Korngrößen und deren Verteilung.....	67
4.4.1.2	Bestimmung des Wassergehaltes und des Trockenrückstandes nach DIN 38 414 Teil 2 (DEV 1985 a).....	69
4.4.1.3	Bestimmung des Glührückstands und des Glühverlusts nach DIN 38 414 Teil 3 (DEV 1985 b).....	69
4.4.1.4	Experimente zur Auswahl einer geeigneten Elutionsmethode für Sedimentuntersuchungen mittels Biotests	70
4.4.1.5	Bestimmung der Konzentrationen von Metallen, Nährstoffen und Polychlorierten Biphenylen	71

4.4.1.6	Bestimmung der Pestizid-Gehalte	74
4.4.1.7	Bestimmung Gehalte an Chlorierten Kohlenwasserstoffen	75
4.4.2	<i>Untersuchung der Sedimenteluat mit Biotests</i>	76
4.4.2.1	Saar-Altarm in Saarlouis	76
4.4.2.2	Heinitzbach bei Neunkirchen	79
4.4.2.3	Rosset bei Emmersweiler	81
4.4.3	<i>Untersuchungen zur Anwendbarkeit des LCK 486-Tests für die Untersuchung von Gewässer- und Sedimentproben</i>	84
4.4.3.1	Einfluß autochthoner Bakterien auf das Wachstum in den Testansätzen.....	84
4.4.3.2	Einfluß von Nährstoffen und organischer Belastung auf das Leuchten und Wachstum	87
4.4.3.3	Einfluß von Alkali- und Erdalkalitionen auf Leuchten und das Wachstum der Leuchtbakterien	87
5.	DISKUSSION	89
5.1	ÜBERPRÜFUNG DER BIOTESTS AUF DEREN GÜLTIGKEIT UND UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES DER PROBENVORBEREITUNG AUF DIE BIOTESTERGEBNISSE	89
5.1.1	<i>Algentest modifiziert nach DIN 38 412 Teil 33 (DEV 1991 a)</i>	89
5.1.2	<i>Daphnientest nach DIN 38 412 Teil 30 (DEV 1989 a)</i>	90
5.1.3	<i>Leuchtbakterientest nach DIN 38 412 Teil 34 (DEV 1991 b)</i>	91
5.1.4	<i>Leuchtbakterientest LCK 486</i>	92
5.2	ABWASSERUNTERSUCHUNGEN MIT BIOTESTS.....	95
5.2.1	<i>Ablauf Rauchgaswäsche Kraftwerk</i>	95
5.2.2	<i>Ablauf Kläranlage Hausmülldeponie</i>	95
5.2.3	<i>Kommunale Kläranlage</i>	96
5.2.4	<i>Kokereiabwasser</i>	97
5.2.4.1	Probe 130/97	97
5.2.4.2	Probe 584/97	98
5.2.4.3	Probe 781/97	98
5.3	UNTERSUCHUNG SAARLÄNDISCHER FLIEßGEWÄSSER	99
5.3.1	<i>Chemisch-physikalische Sediment-Untersuchungen</i>	99
5.3.1.1	Bestimmung der Korngrößen und deren Verteilung.....	99
5.3.1.2	Bestimmung von Wassergehalt und Glührückstand	99
5.3.1.3	Metall-, Nährstoff-, PCB- und CKW-Gehalte	100
5.3.2	<i>Untersuchung von Oberflächenwässern und Sediment-Eluaten mit Biotests</i>	101
5.3.2.1	Experimente zur Auswahl einer geeigneten Elutionsmethode für biologische und chemische Sedimentuntersuchungen	101
5.3.2.2	Untersuchung der Sedimente und Oberflächenwässer des Saar-Altarms in Saarlouis, der Rosset bei Emmersweiler und des Heinitzbachs bei Neunkirchen	101
5.3.2.3	Oberflächenwasser Prims und Kokereiabwasserproben 584/97 und 781/97	102
5.3.3	<i>Untersuchungen zur Anwendbarkeit des LCK 486-Tests für die Untersuchung von Gewässer- und Sedimentproben</i>	103
5.3.3.1	Einfluß von Nährstoffen und organischer Belastung auf das Leuchten und Wachstum der Leuchtbakterien	103
5.3.3.2	Einfluß autochthoner Bakterien auf Leuchten und Wachstum der Leuchtbakterien.....	104
5.3.3.3	Einfluß von Alkali- und Erdalkalitionen auf Leuchten und Wachstum der Leuchtbakterien	105
5.3.3.4	Einfluß niedriger O ₂ -Gehalte auf das Leuchten.....	105
5.3.3.5	Gegenseitige Beeinflussung von Nährstoffangebot, Wachstum und Leuchten bei Leuchtbakterien	105
5.3.4	<i>Zusammenfassende Bewertung des LCK 486-Tests</i>	108
5.3.5	<i>Eignung von DMSO als Elutionsmittel zur Untersuchung von Sediment-Eluaten</i>	109
6.	LITERATURVERZEICHNIS	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Reaktionsschema der bakteriellen Lumineszenz (aus: KREBS 1992 b).....	6
Abbildung 2	Saar-Altarm in Saarlouis; Blick von St. Nazairer Allee in Richtung City	17
Abbildung 3	Saar-Altarm in Saarlouis; Blick von St. Nazairer Allee in Richtung City	18
Abbildung 4	Heinitzbach bei Neunkirchen; Blick in Fließrichtung nach Neunkirchen.....	19
Abbildung 5	Heinitzbach bei Neunkirchen unmittelbar nach Probenahme mit Sedimentschöpfer.....	19
Abbildung 6	Rossel bei Emmersweiler; Blick entgegen der Fließrichtung nach Frankreich	20
Abbildung 7	Rossel bei Emmersweiler; Blick in Fließrichtung.....	20
Abbildung 8	Prims bei Dillingen, unmittelbar vor der Mündung in die Saar; Blick entgegen der Strömung in Richtung Dillingen	21
Abbildung 9	Prims bei Dillingen; Blick auf die Mündung in die Saar.....	22
Abbildung 10	Schöpfer zur Probenahme von Sediment.....	24
Abbildung 11	Überkopfschüttler zur Elution der Sedimentproben.....	26
Abbildung 12	Algentestapparatur mit angehobener Schüttlerplatte.....	45
Abbildung 13	Überprüfung der Stellplätze im Algentest auf ihre Validität.....	46
Abbildung 14	Einfluß einer 1 %igen DMSO-Lösung auf die Vermehrung im Algentest innerhalb einer 72-stündigen Inkubationszeit.....	47
Abbildung 15	Einfluß von Kaliumdichromat auf die Schwimmfähigkeit der Daphnien nach einer 24-stündigen Kontaktzeit.....	48
Abbildung 16	Einfluß von DMSO auf die Schwimmfähigkeit von Daphnien.....	49
Abbildung 17	Einfluß von DMSO auf die Leuchtbakterien im DIN-Test nach 30 min Kontaktzeit.....	50
Abbildung 18	Einfluß einer 1 %igen (v/v) DMSO-Lösung auf die akute Wirkung von Phenol im DIN- Leuchtbakterientest (DEV 1991 b)	52
Abbildung 19	Hemmwirkung von Phenol auf das Leuchten der Bakterien im DIN-Leucht- bakterientest und im Langzeit-Leuchtbakterientest LCK 486 nach 30 min und 24 h Kontaktzeit.....	53
Abbildung 20	Abhängigkeit der Wachstums- und Leuchthemmung der Leuchtbakterien von der Phenol-Konzentration beim LCK 486-Test nach 24 h Kontaktzeit	54
Abbildung 21	Hemmwirkung von Ammoniumacetat auf das Leuchten im DIN- Leuchtbakterientest und im chronischen Leuchtbakterientest nach 30 min und 24 h Kontaktzeit	54
Abbildung 22	Abhängigkeit von Wachstums- und Leuchthemmung der Leuchtbakterien von der Ammoniumacetat-Konzentration im LCK 486-Test	55
Abbildung 23	Einfluß einer 1 %igen DMSO-Lösung auf Leuchten und Wachstum der Leuchtbakterien im LCK 486-Test.....	57
Abbildung 24	Untersuchung des Ablaufs eines saarländischen Kraftwerks mit dem DIN- und dem LCK 486-Leuchtbakterientest	60
Abbildung 25	Einfluß von Deponiesickerwasser auf Leuchten und Wachstum der Leucht- bakterien im LCK 486-Leuchtbakterientest nach 30 min und 24 h	61
Abbildung 26	Einfluß von mechanisch gereinigtem Abwasser auf die Lumineszenz von <i>Vibrio fischeri</i> nach 30 min und 24 h.....	61
Abbildung 27	Einfluß von Kokereiabwasser auf das Leuchten von <i>Vibrio fischeri</i> nach 30 min und 24 h Kontaktzeit	62
Abbildung 28	Untersuchung der Abwasserprobe 584/97 einer saarländischen Kokerei mit verschiedenen Varianten des Leuchtbakterientests.....	63
Abbildung 29	Untersuchung der Abwasserprobe 781/97 einer saarländischen Kokerei mit Leuchtbakterientests	64
Abbildung 30	Untersuchung der Oberflächenwasser-Proben mit dem Algentest	65

Abbildung 31	Vergleichende Untersuchung von 2 Kokereiabwasserproben und dem zugehörigen Vorfluter nach etwa 1000 m Fließstrecke mit dem Algentest.....	66
Abbildung 32	Korngrößenverteilung der Sedimente von Heinitzbach, Rossel und Saar-Altarm	68
Abbildung 33	Vergleich verschiedener Elutionsmethoden am Sediment des Saar-Altarmes in Saarlouis anhand der mit der Verdünnungsstufe G 2 erzielten Hemmung im DIN-Leuchtbakterientest.....	70
Abbildung 34	Einfluß verschiedener Eluate des Saar-Altarms auf das Wachstum der Algen.....	76
Abbildung 35	Einfluß der Sediment-Eluate des Saar Altarmes auf das Leuchten der Leucht_bakterien im DIN-Leuchtbakterientest und im LCK 486-Test nach 30 min Kontaktzeit.	77
Abbildung 36	Einfluß der Sediment-Eluate des Saar Altarmes auf das Leuchten der Leucht-bakterien nach 24 h Kontaktzeit.....	77
Abbildung 37	Einfluß verschiedener Verdünnungen von Oberflächenwasser und Eluaten des Saar-Altarms in Saarlouis auf die Vermehrung der Bakterien im LCK 486-Test innerhalb von 24 h.	78
Abbildung 38	Einfluß verschiedener Eluate des Heinitzbachs auf das Algenwachstum	79
Abbildung 39	Einfluß der Sediment-Eluate des Heinitzbachs auf das Leuchten der Leuchtbakterien nach 24 h Kontaktzeit.....	80
Abbildung 40	Verlauf der relativen Bakterienvermehrung innerhalb von 24 h gegenüber der NaCl-Kontrolle zum Zeitpunkt t=0 bei verschiedenen Verdünnungen von Oberflächenwasser und Eluaten des Heinitzbachs.....	80
Abbildung 41	Einfluß von Sediment-Eluaten der Rossel bei Emmersweiler auf das Algenwachstum in Algentest.	81
Abbildung 42	Akute Wirkung der Sediment-Eluate der Rossel auf das Leuchten der Leuchtbakterien im DIN-Leuchtbakterientest und im LCK 486-Test nach 30 min Kontaktzeit	82
Abbildung 43	Chronische Wirkung der Sediment-Eluate der Rossel auf das Leuchten der Leuchtbakterien nach 24 h Kontaktzeit.....	82
Abbildung 44	Verlauf der relativen Bakterienvermehrung innerhalb von 24 h gegenüber der NaCl-Kontrolle zum Zeitpunkt t=0 bei verschiedenen Verdünnungen von Oberflächenwasser und Eluaten der Rossel.....	83
Abbildung 45	Einfluß autochthoner Bakterien aus Sedimenten und Oberflächenwässern auf die optische Dichte im Testansatz.	84
Abbildung 46	Vergleich von Leuchtbakterien mit den isolierten Bakterien.	85
Abbildung 47	Leuchtbakterien-Reinkultur.TEM-Aufnahme, Vergrößerung 16000-fach, Belichtungszeit 1 s.....	86
Abbildung 48	Schleim umhüllte Kokken aus dem Eluat des Saar-Altarmes in Saarlouis. TEM-Aufnahme, Vergrößerung 4500-fach, Belichtungszeit 2 s.	86
Abbildung 49	Stäbchenbakterien aus dem Eluat des Saar-Altarmes in Saarlouis. TEM-Aufnahme, Vergrößerung 6500-fach, Belichtungszeit 1 s.....	86
Abbildung 50	Untersuchung des Einflusses hoher organischer Belastung im LCK 486-Test mit SSWC-Kulturmedium (farbkorrigierte Werte).....	87
Abbildung 51	Einfluß des ASW-Mediums auf das Leuchten und das Wachstum der Leuchtbakterien im 24 h-Leuchtbakterientest (Mittelwert aus 3 Versuchen).	88
Abbildung 52	Zeitlicher Verlauf von Wachstum und Leuchten bei Leuchtbakterien (aus : Meighen 1991).....	107
Abbildung 53	Zeitlicher Verlauf von Wachstum und Leuchten bei Leuchtbakterien (aus : Rase 1969).....	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Lebensformen und Lebensräume von Leuchtbakterien (aus Hastings 1986).....	5
Tabelle 2	Übersicht über die Sediment-Probestellen im Saarland	23
Tabelle 3	Übersicht über die Untersuchungsparameter und verwendeten Bestimmungsmethoden bei Oberflächenwässern und Sediment-Eluaten.....	28
Tabelle 4	Pipettierschema für den Algentest, modifiziert nach DIN 38 412 Teil 33 (DEV 1991 a).....	33
Tabelle 5	Pipettierschema für den Daphnientest nach DIN 38 412 Teil 33 (DEV 1991 a) .	36
Tabelle 6	Zusammensetzung der Testansätze für den Leuchtbakterientest nach DIN 38 412 Teil 34 (DEV 1991 b).....	37
Tabelle 7	Optimierung des Bicarbonatgehaltes im Algentest nach DIN 38 412 Teil 33 (DEV 1991 a).....	46
Tabelle 8	Vergleich der ermittelten EC ₅₀ -Werte mit Literaturwerten im Daphnientest nach DIN 38 412 Teil 30 (DEV 1989 a).....	48
Tabelle 9	Vergleich der im Leuchtbakterientest nach DIN 38 412 Teil 34 (DEV 1991 b) ermittelten EC ₂₀ - und EC ₅₀ -Werte mit Literaturwerten.....	51
Tabelle 10	Vergleich der für die Leuchthemmung auf <i>Vibrio fischeri</i> ermittelten EC ₂₀ - und EC ₅₀ -Werte von Ammoniumacetat und Phenol mit Literaturdaten.....	56
Tabelle 11	Chemisch-physikalische Daten der Filtrate nach der Druckfiltration.....	58
Tabelle 12	Einfluß der Probenvorbereitung auf Leuchten und Vermehrung der Leuchtbakterien im LCK 486-Test nach 30 min und 24 h Kontaktzeit.....	58
Tabelle 13	Ergebnisse der Abwasseruntersuchungen mit Leuchtbakterien-, Daphnien-, Algen- und Fischtests	59
Tabelle 14	Korngrößeneinteilung der Sedimente und Sedimentgesteine nach DIN 4022 (Tucker 1985).....	67
Tabelle 15	Korngrößenbestimmung der Sedimente von Saar-Altarm, Rossel und Heinitzbach.....	68
Tabelle 16	Bestimmung des Wassergehaltes und des Trockenrückstandes der Sedimente von Saar-Altarm, Rossel und Heinitzbach	69
Tabelle 17	Bestimmung des Glührückstandes und des Glühverlustes der Sedimente von Saar Altarm, Rossel und Heinitzbach.....	69
Tabelle 18	Vergleich der Untersuchungswerte der Sedimente mit Zuordnungswerten ausgewählter Parameter aus der TA Siedlungsabfall (aus: Hein und Schwedt 1996).....	71
Tabelle 19	Vergleich der Untersuchungswerte der Sedimente mit Grenzwerten ausgewählter Parameter aus der Klärschlammverordnung) (aus: Hein und Schwedt 1996).....	72
Tabelle 20	Vergleich der Ergebnisse der Sedimentuntersuchungen mit nutzungs- und schutzbezogenen Grenzwerten für (Schad-)Stoffe in Böden (aus: Hösel et al. 1996) mit den Untersuchungsergebnissen der Sediment-Eluate.....	73
Tabelle 21	Vergleich Pestizid-Gehalte der Sediment-Eluate mit B- und C-Werten der „Holländischen Liste“ (aus: Hein und Schwedt 1996)	74
Tabelle 22	Vergleich der CKW-Gehalte der Sedimente von Saar-Altarm, Rossel und Heinitzbach mit Grenzwerten der „Holländischen Liste“ (aus: Hein und Schwedt 1996).....	75
Tabelle 23	Bewertungsschema für den chronischen Leuchtbakterientest (nach Grabert, mündliche Mitteilung)	94

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Oberflächenwasser- und Abwasserproben aus der Routine-Gewässerüberwachung des Saarlandes sowie Sedimentproben mit Biotests untersucht. Ziel war es, anhand ausgewählter Proben herauszufinden, welches Testsystem jeweils am empfindlichsten reagiert und ob gegebenenfalls durch ein Sedimentscreening mit Biotests zusätzliche Informationen über die Schadstoffbelastung saarländischer Fließgewässer zu erhalten sind.

Als Testsysteme dienten der Algentest nach DIN 38 412 Teil 33 (DEV 1991 a), der Daphnientest nach DIN 38 412 Teil 30 (DEV 1989 a), der Kurzzeit-Leuchtbakterientest nach DIN 38 412 Teil 34 (DEV 1991b) und der Langzeit-Leuchtbakterientest LCK 486 (Dr. Lange GmbH, Düsseldorf). Die Ergebnisse von Abwasseruntersuchungen mit dem Fischtest nach DIN 38 412 Teil 31 (DEV 1989 b) wurden vom SIGU Saarbrücken bezogen.

Keine der Oberflächenwasserproben übte einen hemmenden Einfluß auf die Testorganismen aus. Die Untersuchungen mit dem Algentest deuteten auf eine starke Nährstoffbelastung hin, da teilweise massive Wachstumsförderungen auftraten. Bei der Abwasseruntersuchung war der Leuchtbakterientest mit einer Ausnahme das empfindlichste Testsystem. Bei den meisten Abwasserproben zeigten mehrere Testsysteme deutliche Hemmwirkungen an.

Der neue Langzeit-Leuchtbakterientest erbrachte bei Referenzchemikalien und Abwasserproben nach 30 Minuten meist gut mit dem DIN-Test übereinstimmende Ergebnisse. Im 24 Stunden-Versuch trat eine deutliche Steigerung der Empfindlichkeit im Vergleich zum Kurzzeittest auf. Besonders empfindlich reagierte der Langzeit-Test bei der Untersuchung von Deponiesickerwasser und dem Ablauf einer kommunalen Kläranlage.

An 13 ausgewählten Probestellen saarländischer Fließgewässer wurden Sedimente entnommen. Diese Proben wurden sowohl mit Wasser nach der DEV S 4-Methode (SIEVERS 1996) als auch unter Zugabe des organischen Lösemittels Dimethylsulfoxid (1 % v/v, SCHEIBEL et al. 1991) eluiert. Die Untersuchung der Eluate erfolgte mit dem Daphnientest, dem Algentest und den beiden Leuchtbakterientests. Mittels chemischer Analytik wurden sie im Bezug auf ausgewählte Schadstoffgruppen untersucht. Die beiden Elutionsmethoden zeigten keine Unterschiede bei der Anreicherung von Schadstoffen aus der Gruppe der polychlorierten Biphenyle, chlorierten Kohlenwasserstoffe oder Pestizide in den Eluaten. Die Biotestorganismen wurden durch die Eluate nur geringfügig beeinträchtigt. Die Gewässersedimente waren allerdings teilweise stark organisch belastet. Da weder die Untersuchungen mit Biotests noch die Ergebnisse der chemischen Analysen ein Gefährdungspotential aufzeigten, konnten die Sedimente als unbedenklich eingestuft werden.

Das wegen seiner geringen akuten Toxizität gegenüber Leuchtbakterien häufig eingesetzte Elutionsmittel Dimethylsulfoxid wurde durch die autochthonen Bakterienstämme der Sediment-Eluate metabolisiert. Die daraus entstandenen Produkte Dimethylsulfid und Dimethyldisulfid wirkten deutlich toxischer auf die Leuchtbakterien als das Ausgangsprodukt. DMSO war daher für die Untersuchung von Umweltproben mit Leuchtbakterientests nicht geeignet. Ein Einfluß auf die Ergebnisse im Algen- oder Daphnientest konnte hingegen nicht festgestellt werden.

Im Langzeit-Leuchtbakterientest LCK 486 ergaben sich bei der Untersuchung von Sediment-Eluaten erhebliche Schwierigkeiten. Die gleichzeitige Interpretation beider Testsignale (Leuchten und Wachstum/Trübung) führte zu widersprüchlichen Aussagen. So traten in manchen Versuchen Leuchthemmung und Wachstumsförderung oder Wachstumshemmung und Leuchtförderung gleichzeitig auf.

In Detailuntersuchungen zum Langzeit-Leuchtbakterientest konnten verschiedene Ursachen für diese widersprüchlichen Teilergebnisse aufgezeigt werden:

- Hemmung der Lumineszenz durch hohe Nährstoffkonzentration im Testansatz
- Inaktivierung des Autoinduktors durch 2-wertige Kationen
- Einfluß autochthoner Bakterienstämme auf das Wachstum der Leuchtakterien und die optische Dichte
- Hemmung des Leuchtens durch Sauerstoffverknappung innerhalb der Inkubationszeit
- Fehlbestimmung des Leuchtens durch Sedimentation der Leuchtakterien im Verlauf der Inkubationszeit

Die Untersuchungen zeigen, daß dieser neue Test für ein Routinescreening von Sedimenten derzeit noch nicht geeignet ist.

Bei der Untersuchung von Direkteinleiterproben wurde die unterschiedliche Sensitivität der Testorganismen gegenüber verschiedenen Schadstoffgemischen besonders deutlich. Es zeigte sich weiterhin, daß eine zweckmäßige Risikoabschätzung nur durch die Kombination einer möglichst umfangreichen Biotestbatterie mit der chemischen Analytik möglich war.

2. Einleitung

Biotests werden herangezogen, um die Wirkung biologisch schädlicher Stoffe oder Stoffgemische unter standardisierten Bedingungen auf Testorganismen zu prüfen. Sie integrieren die Effekte aller wirksamen Schadstoffe, auch derjenigen, die bei der chemischen Analytik nicht berücksichtigt oder erfaßt werden (DECHEMA 1995).

Eine mögliche toxische Wirkung manifestiert sich in der Regel selektiv auf eine Gruppe von Organismen, da diese spezielle Strukturen, Leistungen oder Organe besitzen, die durch einen Schadstoff beeinträchtigt werden können (GUNKEL 1994). Es gibt vier Organismengruppen unterschiedlicher Entwicklungsstufen, welche als Standard-Testorganismen in Biotests dienen. **Bakterien** befinden sich als Destruenten im Zentrum des C-Kreislaufes, **Grünalgen** führen als Primärproduzenten die Photosynthese durch. **Daphnien** stehen in aquatischen Nahrungsketten als Konsumenten niederer Ordnung zwischen den Destruenten und Primärproduzenten einerseits und den Konsumenten höherer Ordnung andererseits (DEV 1982). **Fische** sind als Wirbeltiere hochgradig differenziert und besitzen Organe.

Physikochemische Untersuchungen können die Toxizität von Umweltproben nicht ausreichend einschätzen, da Interaktionen zwischen den Probeninhaltsstoffen und der komplexen Matrix auftreten können (RUIZ et al. 1997). Biotests stellen somit eine Ergänzung der chemischen Analytik dar. Nach § 7a des Wasserhaushaltsgesetzes (WWV 1998 a) werden Direkteinleiterproben mit Hilfe von Biotests auf Schädwirkungen geprüft. Diese Untersuchungen werden von staatlichen Behörden durchgeführt. Routinemäßig wird die akute Toxizität von Direkteinleiterproben und Oberflächenwässern durch Biotests mit Leuchtbakterien, Daphnien und Fischen bestimmt. Die Erfassung der akuten Toxizität stellt die erste Stufe der Biotestuntersuchungen von Abwässern, Stoffgemischen und Chemikalien dar. Untersuchungen zur chronischen Toxizität und zum Verhalten unter ökosystemalen Verhältnissen werden dann notwendig, wenn sich Hinweise auf akut toxische Wirkungen ergeben (GUNKEL 1994).

Im Laufe der letzten Jahre hat sich die Qualität der Oberflächenwässer und Abwässer aufgrund weitergehender Abwasserreinigung ständig verbessert. In der Routineprüfung werden jedoch immer noch Biotest mit Daphnien, Leuchtbakterien und Fischen angewandt, wobei immer weniger Proben mit diesen Tests als toxisch eingestuft werden können (Datenbank SIGU Saarbrücken). Dies stellt einerseits eine positive Entwicklung dar, es ergibt sich jedoch andererseits auch die Notwendigkeit der Verbesserung bestehender Testsysteme im Hinblick auf eine Steigerung der Empfindlichkeit und der Entwicklung neuer Biotests. Im Jahre 1995 wurde im Staatlichen Institut für Gesundheit und Umwelt in Saarbrücken ein neu entwickelter Test auf Mutagenität mit speziellen Mutanten von Leuchtbakterien, sogenannten Black-Mutanten, erprobt (ZIEHL 1995). Hierbei wurde über deren Rückmutation zu leuchtenden Bakterien eine Gentoxizität manifestiert. Dieser von der Firma Azur Environmental¹ (Carlsbad, CA) unter dem Namen MUTATOX[®] vertriebene Biotest vereint offensichtliche Vorteile wie guter Korrelation mit dem AMES-Test, geringer Materialaufwand und Messung eines definierten Parameters in sich. Es stellte sich jedoch heraus, daß der Test für die routinemäßige Anwendung nicht geeignet war. Die Testanleitung war schlecht verständlich und die Vorbereitung des Tests war sehr zeitintensiv.

Neue Biotests müssen intensiv mit Realproben geprüft werden, um zu standardisierten, reproduzierbaren und aussagekräftigen Ergebnissen zu gelangen. Unzulänglichkeiten und Störeinflüsse auf das Testsystem lassen sich mit Chemikaliestests kaum erkennen, zumal meist nur mit Einkomponenten-Systemen gearbeitet wird. Bisher liegen Untersuchungen zu Kombinationswirkungen von Chemikalien auf das Biotestorganismen nur vereinzelt vor. NAGLER et al. (1997) untersuchten Kombinationswirkungen von Metallen und Pestiziden auf das Wachstum von *Pseudomonas fluorescens* und *Bacillus subtilis*.

¹ chemals Microbics Corporation