

Aus der Bundesanstalt für Wassergüte, Wien-Kaisermühlen

**BAKTERIOLOGISCHE TESTS ZUR BESTIMMUNG DER TOXISCHEN WIRKUNG  
VON WASSERINHALTSSTOFFEN, KOMPLEXEN ABWÄSSERN UND  
SCHADSTOFFHÄLTIGEM OBERFLÄCHENWASSER**

G. KAVKA

**1. Einleitung**

Die Umwelt wird mit einer ständig steigenden Zahl von chemischen Stoffen - derzeit sind mehr als 4 Millionen chemische Verbindungen bekannt - belastet. Es stellt sich daher die dringliche Frage nach der Schadwirkung dieser Substanzen auf die Umwelt und den Menschen. Aufschluß über die toxische Wirkung geben biologische Testverfahren. Chemische Analysen sind vielfach zu aufwendig und lassen keine Aussagen über die Summenwirkung komplexer Schadstoffgemische zu.

Um eine umfassende Einschätzung der potentiellen Toxizität vornehmen zu können, sind Testorganismen aller Organisationsstufen zu verwenden (OECD 1986). Bakterien spielen bei der Reinigung von Abwasser in Kläranlagen und bei der Selbstreinigung von Oberflächengewässern eine hervorragende Rolle. Diesem Umstand wird in der Bundesanstalt für Wassergüte/Abteilung Bakteriologie in Wien durch den Einsatz von zwei bakteriologischen Toxizitätstests dem Lichtemissionshemmtest mit *Photobacterium phosphoreum* und dem Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida* Rechnung getragen.

## 2. Gesetzliche Grundlagen und Richtlinien in Österreich

Nach dem österreichischen Wasserrechtsgesetz 1959 (GRABMAYR u. ROSSMANN, 1978) sind alle Gewässer so reinzuhalten, daß die Gesundheit von Mensch und Tier nicht gefährdet, Grund- und Quellwasser als Trinkwasser verwendet, Tagwässer zum Gemeingebrauch sowie zu gewerblichen Zwecken benutzt, Fischwässer erhalten, Beeinträchtigungen des Landschaftsbildes und sonstige fühlbare Schädigungen vermieden werden können. Einerseits sollen die Gewässer als Ökosysteme nicht beeinträchtigt und andererseits die zahlreichen Nutzungsansprüche des Menschen gewährleistet werden.

Um dieser Zielsetzung gerecht zu werden, sind nach den Richtlinien für die Begrenzung von Abwasseremissionen (BUNDESMINISTERIUM FÜR LAND- UND FORSTWIRTSCHAFT, 1981) die in Gewässer abzuleitenden Schmutzfrachten so gering wie möglich zu halten. Die in den Richtlinien empfohlenen Emissionsrichtwerte bedürfen einer entsprechenden Überwachung nach einheitlichen Untersuchungsverfahren. Toxizitätstests mit Fischen und anderen Testorganismen sind vorzusehen.

In den Immissionsrichtlinien (BUNDESMINISTERIUM FÜR LAND- UND FORSTWIRTSCHAFT, 1987) wird den Schadstoffen besondere Aufmerksamkeit geschenkt, die akut und chronisch toxische Wirkungen haben und deren Gefährlichkeit sich bei schlechter Abbaubarkeit und bioakkumulativem Verhalten erhöht. Als allgemeiner Parameter ist in diesen Richtlinien die Toxizität angeführt. Es soll keine toxische Beeinflussung der aquatischen Lebensgemeinschaften stattfinden. Der Nachweis einer Schädwirkung kann vielfach nur durch den Einsatz von Toxizitätstests, die Organismen aller trophischer Niveaus umfassen, erbracht werden.

Gemäß Österreichischem Chemikaliengesetz (STADLER u.HARTIG, 1988) ist eine Grundprüfung der angemeldeten Stoffe durchzuführen. Die Ergebnisse der Grundprüfung sollen Aufschluß darüber geben, ob der Stoff schädliche Wirkungen auf die Umwelt oder den Menschen ausübt. Die Grundprüfung umfaßt die Prüfung u.a. auch auf Toxizität. In der Verordnung des Bundesministeriums für Umwelt, Jugend und Familie vom 23. Dezember 1988 über Anmeldungsunterlagen und Prüfnachweise nach dem Chemikaliengesetz (BGBl.Nr. 40, 17.Stk., 1989) sind die Testorganismen für die verschiedenen Toxizitätstests angeführt.

### 3. Einteilung biologischer Testverfahren

Biologische Testverfahren können anhand ihrer unterschiedlichen Aufgabenstellung in ökologische und toxikologische Testverfahren untergliedert werden.

Ökologische Testverfahren geben durch Änderungen physikalischer, chemischer, biologischer und bakteriologischer Parameter ein Bild von der Reaktion der Lebensgemeinschaften auf anthropogen veränderte Umweltsituationen. Hierher zählen auch Abbau- und Bioakkumulationstests.

Toxikologische Verfahren zeigen die schädigende Wirkung von Stoffen gegenüber Organismen im Labor oder Freiland. Ziel ist die Abschätzung des von chemischen Verbindungen ausgehenden Risikos für die Umwelt und den Menschen selbst.

Toxikologische Verfahren werden in human- bzw. säugertoxikologische Verfahren, ökotoxikologische Verfahren und gentoxikologische Verfahren (Mutagenitätstests) unterteilt. Die Einteilung ist willkürlich, da die Zielsetzung beider Verfahren nämlich die Indikation schädlicher Wirkungen von Stoffen auf Lebewesen - die gleiche ist.

Bei den säugertoxikologischen Verfahren werden die Prüfsubstanzen den Organismen direkt verabreicht, bei den ökotoxikologischen Verfahren meistens auf einer Matrix (Wasser, Boden, Luft), in der die Testorganismen leben, verteilt. Toxikologische Verfahren werden im Labor und im Freiland durchgeführt. Labortests liefern reproduzierbare Ergebnisse, erlauben jedoch keinen direkten Rückschluß auf die Wirkung der Prüfsubstanz in der Umwelt. Die Ergebnisse liefern aber wertvolle Hinweise auf das Gefährdungspotential eines Stoffes. Freilandtests erfolgen unter natürlichen Bedingungen der Umwelt des untersuchten Standortes. Die Matrix für die Testorganismen ist die Umwelt mit ihren variablen, physikalischen und chemischen Begleitparametern. Das Testergebnis gilt nur für diesen Standort und nur für den Untersuchungszeitpunkt. Es ist häufig nicht reproduzierbar.

Nach der Einwirkungsdauer der toxischen Substanz auf den Testorganismus unterscheidet man eine akute (wenige Minuten 96 Stunden), subakute ( $\leq 28$  Tage), subchronische ( $\leq 90$  Tage) und eine chronische Toxizität ( $\geq 6$  Monate; bei Bakterien mehrere Stunden).

Als Reaktionskriterien (Toxizitätsindikatoren) dienen physiologische Störungen (z.B. Beweglichkeit, Atmung, Energiestoffwechsel, Lumineszenz), Wachstumshemmung (Zellvermehrungshemmung) und die Mortalität.

Es werden sowohl einzelne Spezies als Testorganismen als auch Lebensgemeinschaften als Testbiozöosen eingesetzt. Toxizitätstests mit genau definierten Spezies sind leichter standardisier- und reproduzierbar. Außerdem können sich bei Testbiozöosen während der Testdauer unempfindliche Spezies ausbreiten, so daß nach anfänglicher Hemmwirkung wieder Kontrollwerte erreicht werden.

Eine Spezies allein kann jedoch nicht die Schadwirkung eines Stoffes auf die Umwelt aufzeigen. Um eine umfassende Aussage über das Gefährdungspotential einer Substanz zu erhalten, sind eben Vertreter aller trophischer Niveaus Konsumenten, Produzenten, Destruenten zu testen.

#### 4. Bakteriologische Toxizitätstests

Als wichtige Vertreter der Destruenten sind die Bakterien zu nennen. Bakterien spielen eine hervorragende Rolle im Stoffkreislauf, speziell für die Selbstreinigung der Gewässer und für die Abbauleistung biologischer Kläranlagen. Der mikrobielle Abbau darf keinesfalls durch toxische Substanzen gehemmt werden.

In der Tabelle 1 ist eine Auswahl von Mikroorganismen aufgelistet, die als Testorganismen eingesetzt werden.

**Tab. 1.:** Mikroorganismen als Testorganismen in Toxizitätstests; angegeben sind die Reaktionskriterien, die Meßkriterien und die Testdauer; eine Auswahl;

Testorganismus Testbiozönose	Reaktions- Kriterium	Meß- Kriterium	Test- dauer
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Lumineszenz	Lichtverlust	5-30 min
<i>Vibrio fischeri</i>	Lumineszenz	Lichtverlust	
<i>Vibrio harveyi</i>	Lumineszenz	Lichtverlust	
<i>Pseudomonas putida</i>	Wachstum Atmung	Trübung O <sub>2</sub> -Konsumption	16 h 30 min
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Wachstum Atmung	Trübung O <sub>2</sub> -Konsumption	6 h 30 min
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Atmung	O <sub>2</sub> -Konsumption	30 min
<i>Nitrobacter agilis</i>	Nitritoxidation	NO <sub>2</sub> -Messung	9 d
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Sulfatreduktion	Schwärzung	21 d
<i>Spirillum volutans</i>	Mobilisation	Unbeweglichk.	5-120 min
Aquatische hetero- trophe Bakterien	Atmung Wachstum	O <sub>2</sub> -Konsumption Trübung	24 h 16-20 h
Belebtschlamm- bakterien	Atmung	O <sub>2</sub> -Konsumption	30 min, 2,3,4,24h 5,7,28 d

Derzeit besonders aktuelle Tests, die Bakterienreinkulturen als Testorganismen vorsehen, sind der Leuchtbakterientest mit *Photobacterium phosphoreum* (BULICH, 1979), der Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida* (BRINGMANN u. KÜHN, 1977), der Sauerstoffverbrauchshemmtest nach PLÖTZ (1974) bzw. ROBRA (1976), und der Mobilisationshemmtest mit *Spirillum volutans* nach KRIEG et al. (1967). Als Beispiel für einen Mutagenitätstest ist der besonders häufig angewandte Ames-Test (AMES et al., 1973 u. 1975) zu nennen, bei dem *Salmonella typhimurium* als Testorganismus eingesetzt wird.

Toxizitätstests mit Biozöosen als Testsysteme sind der TTC-Test (DEV L3), der Assimilations-Zehrungstest (DEV L12) und der PEPTONABBAUTEST nach OFFHAUS (1969). Zur kontinuierlichen Schadstofffassung werden der Leuchtbakterientest (LEVI et al., 1989) und ein Bakterientoxizitätstest mit Pseudomonaden (Toxalarm; HERBST et al., 1989) eingesetzt.

Zwei Tests sollen in Zukunft in der Bundesanstalt für Wassergüte in Wien/Abt. Bakteriologie durchgeführt werden: der Leuchtbakterienhemmtest mit *Photobacterium phosphoreum* und der Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida*.

#### 5. Lichtemissionshemmtest mit *Photobacterium phosphoreum* (Microtox Test)

Der Hemmtest mit Leuchtbakterien (Testorganismus *Photobacterium phosphoreum*) wurde von BULICH (1979) für den routinemäßigen Einsatz weiterentwickelt (Microtox System).

##### 5.1. Anwendungsbereich

Der Test wird für die Prüfung von Abwasser, aber auch Oberflächengewässern und Schadstoffen angewandt.

## 5.2. Testprinzip

Leuchtbakterien sind in der Lage, einen Teil der durch Stoffwechselreaktionen freigesetzten Energie als Licht abzugeben. Stoffe und Milieubedingungen, die die Stoffwechselreaktionen dieser Bakterien hemmen, führen zu einer Reduzierung der Lichtemission (KREBS, 1983). Der Leuchtbakterientest zählt zu den akuten Toxizitätstests.

Als Testorganismus dient *Photobacterium phosphoreum*, ein Vertreter der Vibrionaceae. *Photobacterium phosphoreum* kommt im marinen Bereich vor, weshalb das Testgut aufgesalzen werden muß.

Meßkriterium ist der schadstoffbedingte Lichtverlust, der mit Hilfe eines Lumineszenzmeßgerätes erfaßt wird. Die Testdauer beträgt 5, 15 oder 30 Minuten bei 15° C.

## 5.3. Durchführung

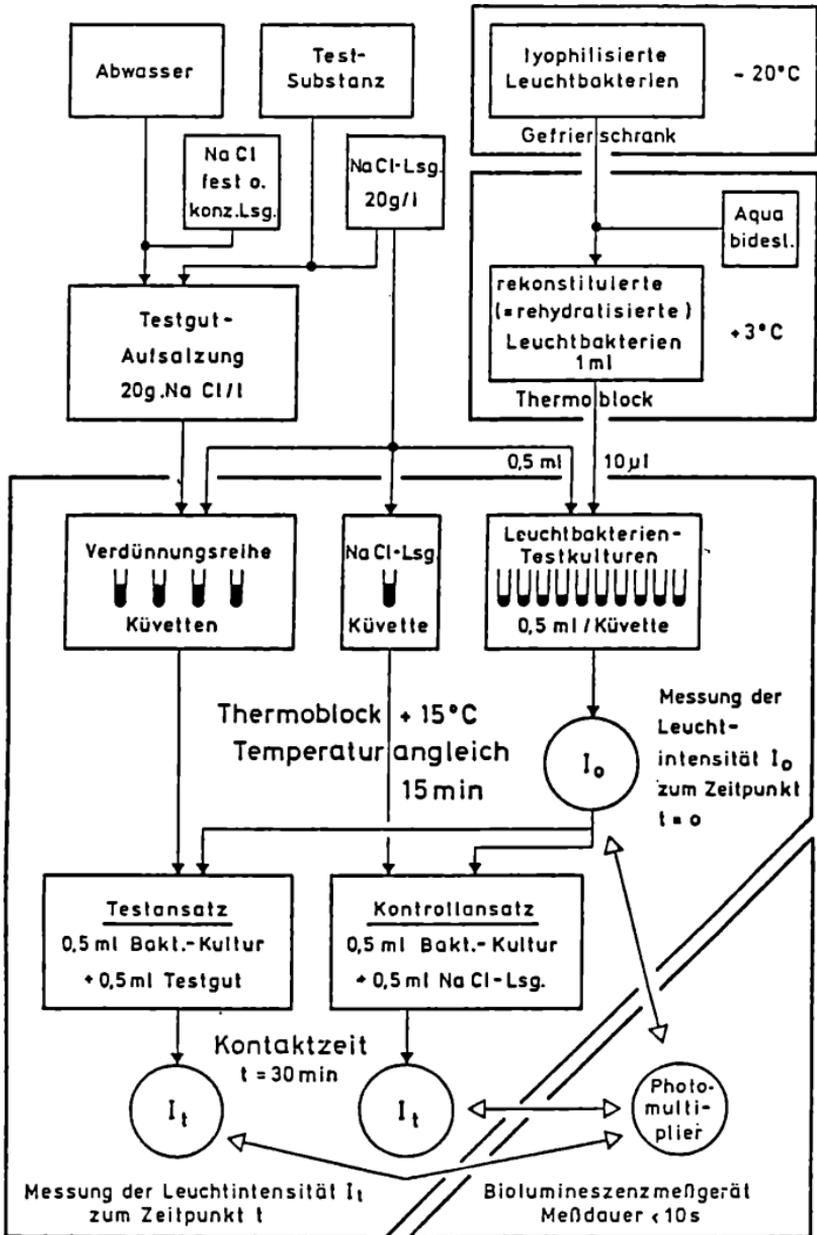
Der Test soll möglichst sofort durchgeführt werden. Eine Lagerung der Wasserproben von 2 Tagen bei 2-4° C oder bis zu 14 Tagen bei minus 18° C ist tolerierbar. Der pH-Wert ist jedenfalls zu bestimmen.

In der Bundesrepublik Deutschland ist eine Normierung des Leuchtbakterientests in Vorbereitung (DIN 38412, Teil 34). Frankreich hat den Microtox Test für die Standardisierung als ISO-Test vorgeschlagen.

Die Durchführung des Tests erfolgt nach BECKMAN INSTRUMENTS INC. (1982). Es können lyophilisierte oder frisch gezüchtete Bakterien verwendet werden. Erstere sind käuflich und können bei -18° C im Gefrierschrank gelagert werden. Damit kann der Test jederzeit "aus dem Stand" gefahren werden.

Die gefriergetrockneten Bakterien werden durch Wasserzugabe rekonstituiert und beginnen sofort wieder zu leuchten. Das Testgut wird aufgesalzen (20 g Natriumchlorid je Liter Probe) und erforderlichenfalls neutralisiert (pH 7,0 0,2). Die toxische Wirkung wird in einem statischen Test erfaßt. Dazu wird eine Verdünnungsreihe des Testgutes in geometrischer Reihe mit dem Verdünnungsfaktor 2 hergestellt. Es erfolgt die Vereinigung definierter Mengen an Testgut mit Bakteriensuspension in Glasküvetten. Von jedem Testansatz sowie einem Kontrollansatz (ohne Testgut) wird die Lichtemission sofort und nach der Kontaktzeit 5,15 oder 30 Minuten bei 15° C - mit Hilfe eines im Handel erhältlichen Meßgerätes (Luminometer) gemessen. Das Testschema ist in Abbildung 1 dargestellt (KREBS, 1983).

**Abb. 1:** Lichtemissionshemmtest mit *Photobacterium phosphoreum*; Testschema (nach KREBS, 1983)



#### 5.4. Auswertung und Einschätzung der toxischen Wirkung

Die schadstoffbedingte prozentuale Hemmung der Leuchtintensität der Testansätze nach der gewählten Kontaktzeit kann rechnerisch ermittelt werden.

Als Maß für die Hemmwirkung von Abwasserproben wird der Verdünnungsfaktor G (=Giftfaktor) verwendet, dessen Hemmwert die Schwelle von 20% unterschreitet (POPP, 1988). Als Kenngröße für die toxische Wirkung, insbesondere von Prüfsubstanzen, wird auch häufig der  $EC_{50}$ -Wert herangezogen (BULICH 1982, VASSEUR et al. 1984). Unter dem  $EC_{50}$ -Wert ist die effektive Konzentration des Testgutes, die eine 50%ige Hemmung der Leuchtintensität verursacht, zu verstehen. Häufig werden auch die  $EC_{10}$ -,  $EC_{20}$ - bzw.  $EC_{90}$ -Werte angegeben. Die Hemmwirkung von schadstoffhaltigem Oberflächenwasser kann durch die Angabe von H, das ist die Hemmung der Leuchtintensität durch die konzentrierte Probe (Vorverdünnung 45,5%) in Prozent, charakterisiert werden.

Zahlreiche Bewertungsmaßstäbe stehen zur Diskussion. Vorläufig kann für Abwasserproben ein G-Wert von  $<4$  toleriert werden. Wenn der G-Wert  $\geq 4$  beträgt, ist mit dem Vorhandensein von gefährlichen Stoffen zu rechnen. Für die Einschätzung der  $EC_{50}$ -Werte kann das Beurteilungsschema nach BULICH (1982) herangezogen werden (Tabelle 2). Die H-Werte können nach dem Schema der Bundesanstalt für Wassergüte, Wien (KOLLER-KREIMEL u. RODINGER, 1987) beurteilt werden (Tabelle 3).

**Tab. 2:** Einschätzung der toxischen Wirkung von Prüfsubstanzen und Abwässern anhand der  $EC_{50}$ -Werte (nach BULICH, 1982)

$EC_{50}$ (15 min.)	Toxizitätsklasse
<25	sehr toxisch
25-75%	toxisch
>75	schwach toxisch
keine Hemmung	nicht toxisch

**Tab. 3:** Einschätzung der toxischen Wirkung von schadstoffhaltigem Oberflächenwasser anhand der maximalen Hemmung ( $H_{MAX}$ ) des konzentrierten Testgutes (nach KOLLER-KREIMEL u. RODINGER, 1987)

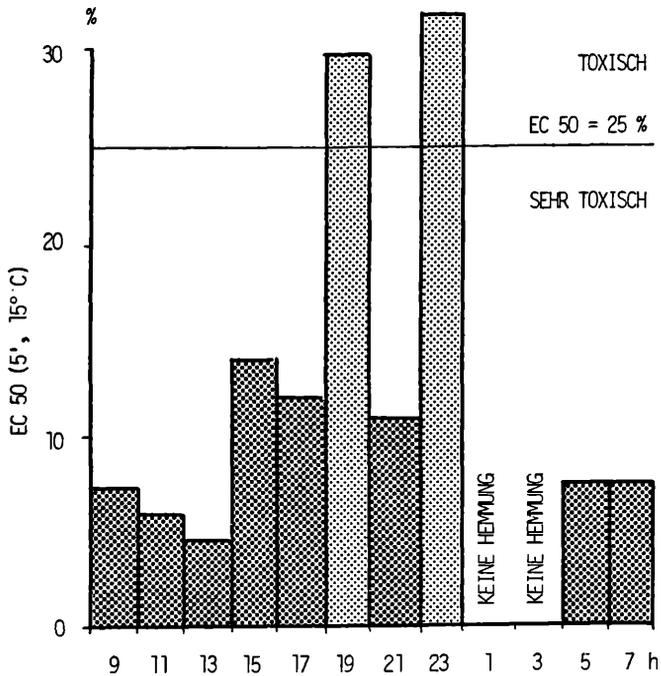
$H_{MAX}$	Bewertung
<10	unbedeutende Hemmung
10-40	mäßig starke Hemmung
40-60	starke Hemmung
60-90	sehr starke Hemmung
>90	Totalschädigung

### 5.5. Literaturdaten und eigene Ergebnisse

Bei KREBS (1983) sind Literaturdaten von  $EC_{50}$ -Werten für verschiedene Testsubstanzen aufgelistet. Daten für komplexe Einleitungen (Papierfabriken, chemische Reinigungsanlagen, Ölraffinerien, biologische Kläranlagen) finden sich bei QURESHI et al. (1982).

In der Abbildung 2 sind die Ergebnisse des Leuchtbakterientests von der Abwassereinleitung der Glanzstoffwerke St. Pölten graphisch dargestellt. Die Proben wurden in 2-stündigem Abstand entnommen. Der überwiegende Anteil der Proben (66,7%) war als sehr toxisch einzustufen; in 16,7% der Proben war keine toxische Hemmwirkung erkennbar. Es ist ersichtlich, daß mit den Ergebnissen von Einzelproben keine oder nur bedingt Aussagen getroffen werden können. Auch die Giftfaktoren (meist  $\geq 4$ ) weisen auf die häufige Präsenz gefährlicher Schadstoffe hin. Chemische Analysen ergaben hohe Konzentrationen an Schwermetallionen ( $Zn^{2+}$  3 - 4 mg/l) und organischen Schadstoffen (chlorierte Lösungsmittel). Nach QURESHI et al. (1982) beträgt der  $EC_{50}$  (5')-Wert für Zinksulfat 55,5 mg/l, der  $EC_{50}$  (15')-Wert 6,08 mg/l.

**Abb. 2:** Leuchtbakterientest; komplexes Abwasser (Glanzstofffabrik); Tagesgang (2stündige Probenentnahmefrequenz); Untersuchung vom 1988 10 24, 9,00 Uhr bis 1988 10 25, 7,00 Uhr; angegeben sind  $EC_{50}$ -Werte und der Bereich der Toxizitätsklassen nach BULICH (vgl. Tab. 2)



In der Abbildung 3 sind die Ergebnisse von Oberflächenwasserproben aus dem österreichischen Donauabschnitt symbolisch dargestellt. An drei von neunzehn Stellen konnten toxische Schadstoffkonzentrationen nachgewiesen werden.

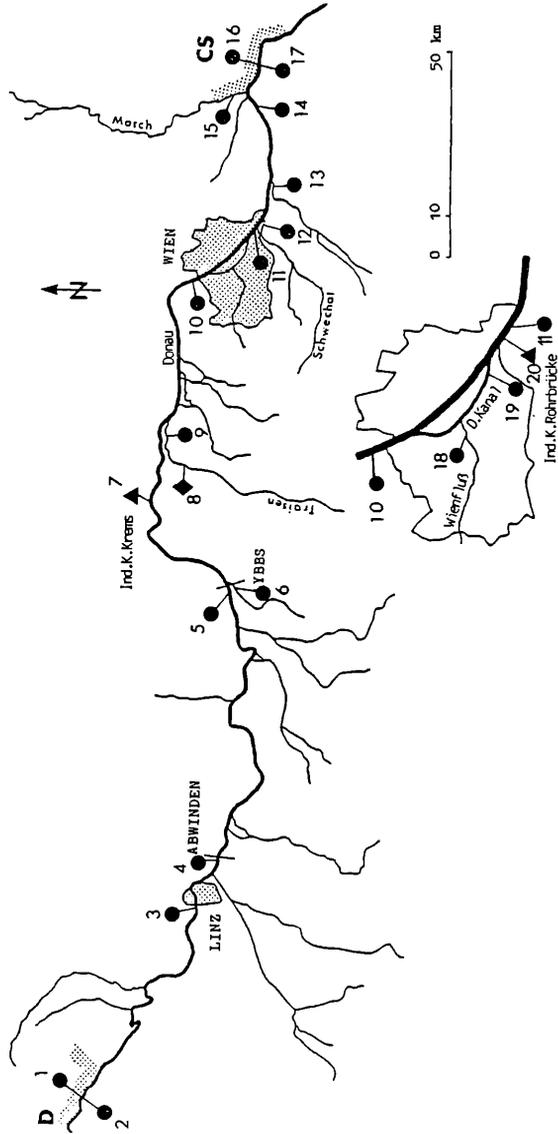
BULICH u. ISENBERG (1981) haben zwanzig verschiedene komplexe Abwässer untersucht und den Leuchtbakterientest mit einem Fischtoxizitätstest verglichen. In 50% der Fälle waren die Fische, in 40% die Bakterien empfindlicher. In 10% der Fälle zeigten beide Testorganismen keine Reaktion. Bei KREBS (1983) sind Literaturdaten bezüglich Empfindlichkeitsvergleich zwischen Leuchtbakterien- und Fischtest (Golddorfe) für 25 Prüfsubstanzen zu finden.

**Abb. 3:** Leuchtbakterientest; Oberflächenwasser, österr. Donau und Zubringer, Donau und Zubringer, Untersuchungszeitraum: Jänner bis April 1988; dargestellt ist H (prozentuelle Hemmung der Leuchtintensität)

Ind.K. Industriekanal

▲ sehr toxisch (H 60-90%) ◆ toxisch (H 40-60%)

● keine Hemmung (H ≤ 20%)



Legende:

- Probenstelle 1: Donau, l.U., Oberzell  
2: Donau, r.U., Felsenhütt  
3: Donau, r.U., Linz-St. Margarethen  
4: Donau, Mitte, oh. Kraftwerk Abwinden-Asten  
5: Donau, Mitte, oh. Kraftwerk Ybbs  
6: Ybbs-Werkskanal, Mitte  
7: Industriekanal Krems  
8: Traisen, Mitte, 4000 m uh. Einleitung Glanzstoffwerke  
9: Traisen, Mitte, oh. Mündung  
10: Donau, r.U., Wien-Nußdorf  
11: Donau, r.U., Wien-Albern  
12: Schwechat, Mitte, oh. Mündung  
13: Fischa, Mitte, oh., Mündung  
14: Donau, r.U., Bad Deutsch Altenburg  
15: March, Mitte, oh. Mündung  
16: Donau, l.U., Karlova Ves  
17: Donau, r.U., Wolfsthal  
18: Wienfluß  
19: Donaukanal, oh. Mündung  
20: Industriekanal bei Rohrbrücke

In der Tabelle 4 werden die Empfindlichkeit von Leuchtbakterien sowie Regenbogenforellen und Daphnien gegenüber Abwässern verglichen. Die Vergleichsuntersuchungen zeigen, daß die Testergebnisse der verschiedenen Testorganismen voneinander abweichen und nicht austauschbar sind.

**Tab.4:** Empfindlichkeitsvergleich zwischen *Photobacterium phosphoreum* (Microtox), Regenbogenforelle und *Daphnia*; verschiedene komplexe Abwässer; Ergebnisse in % v/v; KL keine Letalität; SS schwache Stimulation (nach RIBO und KAISER, 1987)

Abwässer	Microtox EC <sub>50</sub> , 5min	Fisch LC <sub>50</sub> , 96h	Daphnien LC <sub>50</sub> , 48h	Empfindlichkeits- reihung
<b>Papierfabriken</b>				
PM-A	2,5	17	34	M>F>D
PM-B	8,4	37	-	M>F
<b>Chemische Fabriken</b>				
CP-A	50-100	51	-	F>M
CP-B	15	71	23	M>D>F
CP-B-pH angepaßt	100	KL	88	D>M>F
CP-C	40	7,1	-	F>M
CP-D	34	KL	39	F=D>F
<b>Ölraffinerien</b>				
OR-A1	6,5	71	78	M>F=D
OR-A2	50-100	KL	-	M>F
<b>Verpackungsfabriken</b>				
PP-A	1,5	0,9	0,3	D>F>M
<b>Kläranlagen</b>				
STP-A1	SS	KL	KL	
STP-A2	SS	KL	KL	-
STP-A3	30	43	16	D>M>F

## 5.6. Vor- und Nachteile

Der Leuchtbakterientest ist sehr gut für Abwasser- und auch Oberflächenwasserproben einsetzbar. Hervorstechend sind die einfache Handhabung (einfache Lagerhaltung, Anzucht und Testdurchführung), der geringe Platzbedarf und der relativ geringe Zeitaufwand (Test aus dem Stand). Man erhält die mittlere Antwort von etwa  $10^6$  Testorganismen. Der Test ist in einem großen pH- und Salinitätsbereich durchführbar (HINWOOD u. McCORMICK, 1987). Eine Automatisierung des Testsystems wurde von LEVI et al. (1989) durchgeführt (on-stream monitoring system). Als Nachteil sind Störungen durch Trübung und Färbung der Proben sowie förderliche Wirkungen durch Wasserinhaltsstoffe zu nennen. Gegenüber Cyaniden sind Leuchtbakterien relativ unempfindlich. Anpassungsphänomene der natürlichen Flora werden wie bei allen Toxizitätstests nicht erfaßt.

Als Screening-Test ist der Leuchtbakterientest hervorragend einsetzbar, insbesondere für die Abschätzung der Fischgefährdung. Nur das potentiell gefährliche Testgut braucht dem Fischttest zugeführt zu werden. Die Ergebnisse des Bakterientests sind indikativ für das toxische Gefährdungspotential von Abwässern, Oberflächengewässern und Wasserinhaltsstoffen. Das Aufspüren von schadstoffkontaminierten Abschnitten von Gewässern wird erleichtert.

## 6. Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida*

Im Jahre 1977 wurde von BRINGMANN und KÜHN ein Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida* veröffentlicht. In der Bundesrepublik Deutschland wird eine entsprechende DIN-Norm ausgearbeitet (DIN 38412 Teil 8). Der Test soll auch in die ISO-Normen aufgenommen werden. In Österreich ist ebenfalls eine Normierung geplant.

### 6.1. Anwendungsbereich

Dieser Test eignet sich besonders für die Prüfung von wasserlöslichen Schadstoffen, aber auch für die Untersuchung von Abwasser- und Oberflächenwasser.

### 6.2. Testprinzip

Gelöste toxische Wasserinhaltsstoffe hemmen die Zellvermehrung von Bakterien der Spezies *Pseudomonas putida*. In einer toxisch unbeeinflussten Testkultur ist nach der Testzeit die Zunahme der Zellzahl höher als in einer unter gleichen Bedingungen gehaltenen Testkultur, die gelöste toxische Substanzen enthält. Die Bakterienkonzentration wird in einem statischen Test turbidimetrisch gemessen und durch die Extinktion des Primärlichtes der monochromatischen Meßstrahlung Hg 436 nm (Schichtdicke 10 mm) ausgedrückt. Der Zellvermehrungstest mit *Pseudomonas putida* zählt zu den chronischen Toxizitätstests, da während der Testdauer die Reaktion mehrerer Generationen von Testbakterien untersucht wird.

Als Testorganismus wird *Pseudomonas putida* STAMM BERLIN 33/2 (DSM 50026), eine Spezies, die zur Familie Pseudomonadaceae gehört, eingesetzt. *Pseudomonas putida* ist ubiquitär und kommt häufig im limnischen Bereich vor. Meßkriterium ist die Trübung, die durch Wachstumshemmung der Bakterien in einer schadstoffhaltigen Kultur schwächer ist als in einer schadstofffreien Kultur. Die Testdauer beträgt 16 Stunden bei 21°C.

### 6.3. Durchführung

Die Proben werden möglichst sofort aufgearbeitet. Eine Lagerung von 2 Tagen bei 2-4° C bzw. von 14 Tagen bei -18°C ist tolerierbar. Das Probengut wird erforderlichenfalls mit 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und homogenisiert.

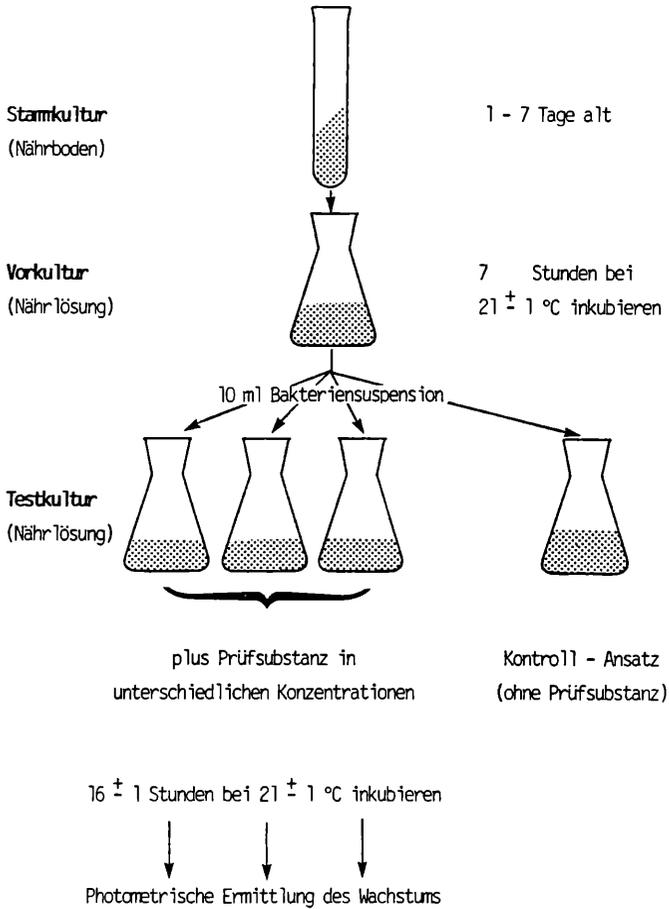
Die Durchführung des Tests erfolgt nach DIN 38412 Teil 8 (in Vorbereitung). Das Testschema ist auf Abbildung 4 dargestellt. Zuerst wird eine Stammkultur auf Schrägagar vorbereitet. Danach wird 7 Stunden vor dem eigentlichen Testansatz die Vorkultur (Flüssig-Schüttelkultur) mit Keimen von der Stammkultur beimpft und nach 7 Stunden die Trübung auf 10 Trübungseinheiten Formazin (TE/F=10) eingestellt. Mit je 10 ml Bakteriensuspension aus der Vorkultur werden die Erlmeyerkolben, die Prüfsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen enthalten, sowie ein Kontrollansatz beimpft und auf 5 Trübungseinheiten Formazin (TE/F=5) eingestellt. Um eine Anlagerung der Bakterien an die Gefäßwände zu verhindern, werden die Kulturen 16 Stunden lang bei 21° C auf einem heizbaren Schüttler in Suspension gehalten. Es sollen 3 Parallelansätze gemacht werden.

Nach der Inkubationszeit werden die Trübungswerte photometrisch bestimmt und die prozentuale Hemmung der Zellvermehrung  $H$  für jede Konzentration des Testgutes nach der Formel  $H = \frac{(B_k - B_n)}{(B_k - B_0)} \times 100$  errechnet,  $B_k$ =Biomasse (Meßwert TE/F) für die Kontrolle nach Ablauf der Testzeit  $B_0$  = Biomasse (Meßwert TE/F) zum Zeitpunkt  $t_0$  (Anfangsmeßwert TE/F=5);  $B_n$ =Biomasse (Meßwert TE/F) für die n-te Konzentration des Testgutes).

#### 6.4. Auswertung und Einschätzung der toxikologischen Wirkung

Als Kenngrößen für die toxische Wirkung von Testsubstanzen werden die  $EC_{10}$  und  $EC_{50}$ -Werte graphisch ermittelt. Die  $EC_{10}$  ( $EC_{50}$ ) ist diejenige "Effektive Konzentration" an Schadstoffen (schadstoffhaltigem Wasser), die eine zehnpromzentige (fünzigpromzentige) Hemmung der Zellvermehrung von *Pseudomonas putida* bewirkt. Nähere Angaben sind in der DIN-Norm zu finden. Als weiteres Maß für Toxizität von

**Abb. 4:** Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida*;  
Testschema (nach BRINGMANN u. KÜHN, 1977)



Schadstoffen wird die toxische Grenzkonzentration (TGK) verwendet (BRINGMANN u. KÜHN 1977). Darunter ist die Konzentration des Testgutes zu verstehen, bei der die Hemmung gerade beginnt. Für Oberflächenwässer kann auch die Hemmung  $H$  der konzentrierten Probe als toxikologische Kenngröße verwendet werden.

Als Beurteilungsgrundlagen für Prüfsubstanzen und Abwässer dienen das Schema nach BULICH (1982; Tabelle 2) und für Oberflächengewässer das Schema der Bundesanstalt für Wassergüte (KOLLER-KREIMEL und RODINGER 1987; Tabelle 3).

#### 6.5. Literaturdaten und eigene Ergebnisse

In BRINGMANN und KÜHN (1977) sind rund 190 wassergefährdende Stoffe und die toxische Grenzkonzentration (TGK) für *Pseudomonas putida* angeführt (Tabelle 5).

Tab.5: Toxische Grenzkonzentration (TGK) wassergefährdender Stoffe für *Pseudomonas putida*; eine Auswahl (nach BRINGMANN und KÜHN, 1977)

Schadstoff gelöst in bidest.Wasser pH 7,0	mg/l
Kaliumcyanid (KCN)	0,001
Silbernitrat (AgNO <sub>3</sub> )	0,006
Quecksilberchlorid (HgCl <sub>2</sub> )	0,01
Kupfersulfat (CuSO <sub>4</sub> )	0,03
o-Nitrophenol	0,9
2-Nitro-p-Kresol	4
2,4-Dichlorphenol	6
Formalin 35%ige Lösung	14
Toluol	29
Tetrachlorkohlenstoff	30
Phenol	64
Trichloräthylen	65
Chloroform	125
Anilin	130
Benzoessäure	480
Aceton	170
Äthanol	6500
Lindan	>5
Atrazin	>10
Xylol	>200
Cyclohexan	>400
Trichloressigsäure, Natriumsalz	>1000
Äthylenglykol	<10000

In der Tabelle 6 sind die Ergebnisse von Abwasser- und Oberflächenwasseruntersuchungen angeführt.

Tab. 6: Abwasserbedingte maximale Hemmung ( $H_{MAX}$ ) der Zellvermehrung von *Pseudomonas putida*;  
 Meßdaten 1: 1988 03 07, 2-4: 1985 05 1986 05

Testgut	$H_{MAX}$ %	Bewertung
1 Abwasser Papierfabrik Hallein	100	totale Hemmung
2 Schwechatfluß, Mündung	59	starke Hemmung
3 Petersbach, Wien	91	totale Hemmung
4 Liesing, Wien	100	totale Hemmung

Die Ergebnisse indizieren ein großes, toxisches Potential der untersuchten Wasserproben.

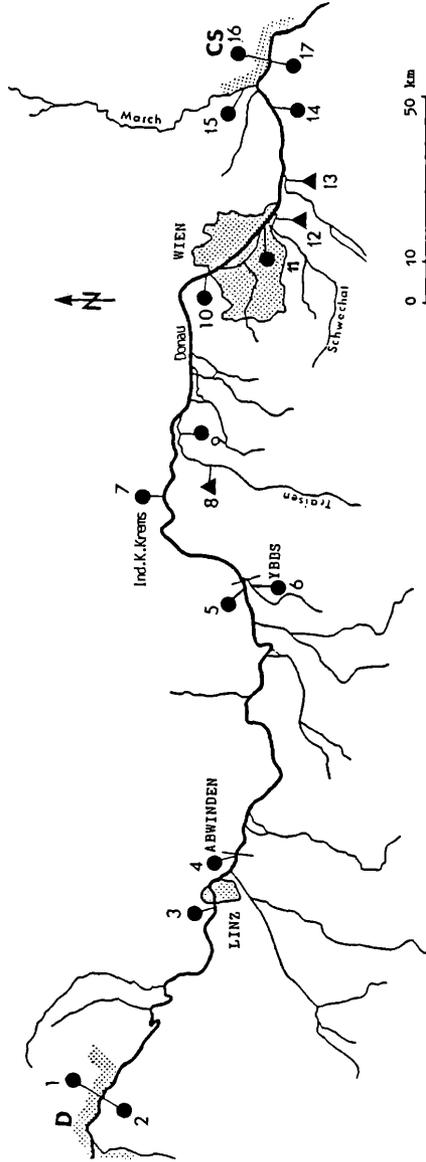
Die Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse des Zellvermehrungshemmtests mit *Pseudomonas putida* an Oberflächenwasserproben der österreichischen Donau und einiger Zubringer. An drei Probenstellen war eine Hemmung des Testorganismus feststellbar.

In der Abbildung 6 werden die Meßdaten des Lichtemissionshemmtests (*Photobacterium phosphoreum*) mit dem Zellvermehrungshemmtest (*Pseudomonas putida*) anhand einer Längsprofilstudie am Fluß Traisen verglichen.

Die gefundenen Daten zeigen im gegenständlichen Fall, daß der erstere gegenüber dem Abwasser der Glanzstoffwerke St.Pölten empfindlicher reagiert als der letztere. Ein direkter Vergleich ist jedoch problematisch, da in den beiden Tests verschiedene Meßkriterien Hemmung der Lichtemission, bzw. Hemmung der Zellvermehrung verwendet werden.

Abb. 5: Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida*; Testgut Oberflächenwasser; österr. Donau und Zubringer, Untersuchungszeitraum April 1989

● keine Hemmung, ▲ = Hemmung H  
 (8:H<sub>max</sub> = 15%; 12:H<sub>max</sub> = 90%; 13:H<sub>max</sub> = 81%)

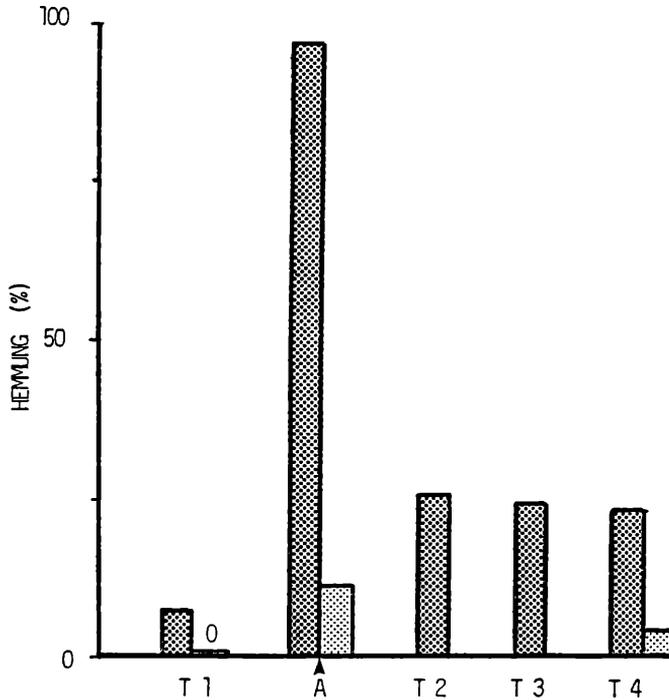


Legende:

- Probenstelle 1: Donau, l.U., Oberzell  
2: Donau, r.U., Felsenhütt  
3: Donau, r.U., Linz-St. Margarethen  
4: Donau, Mitte, oh. Kraftwerk Abwinden-Asten  
5: Donau, Mitte, oh. Kraftwerk Ybbs  
6: Ybbs-Werkskanal, Mitte  
7: Industriekanal Krems  
8: Traisen, Mitte, 4000 m uh. Einleitung Glanzstoffwerke  
9: Traisen, Mitte, oh. Mündung  
10: Donau. r.U., Wien-Nußdorf  
11: Donau, r.U., Wien-Albern  
12: Schwechat, Mitte, oh. Mündung  
13: Fischa, Mitte, oh., Mündung  
14: Donau, r.U., Bad Deutsch Altenburg  
15: March, Mitte, oh. Mündung  
16: Donau, l.U., Karlova Ves  
17: Donau, r.U., Wolfsthal

**Abb. 6:** Vergleich der maximalen Hemmung ( $H_{\max}$  %) der Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum* und der Zellvermehrung von *Pseudomonas putida*; Fluß Traisen, Längsprofil; T Traisen; 1 = 10 m oberhalb, 2 = 180 m, 3 = 250 m, 4 = 4000 m unterhalb Abwassereinleitung A; A Abwassereinleitung Glanzstoffwerke; Untersuchungstermin 1989 04 13.

■ *Photobacterium*, ▨ *Pseudomonas*



SLOOF et al. (1983) haben die Empfindlichkeit von Bakterien (*Pseudomonas putida*, *Microcystis aeruginosa*) mit 4 Algen und 3 Protozoenarten gegenüber 14 wassergefährdenden Stoffen verglichen. Jede Organismengruppe reagierte zumindest einmal am empfindlichsten: Protozoen 3x, Algen 2x, Bakterien 9x (*Pseudomonas* 3x, *Microcystis* 6x). Dieses Ergebnis unterstreicht einmal mehr die Notwendigkeit, daß für die Einschätzung des toxischen Potentials von Testproben Vertreter aller Organismengruppen untersucht werden müssen.

#### 6.6. Vor- und Nachteile

Der Zellvermehrungshemmtest mit *Pseudomonas putida* ist als wichtiger Haupttest für die Einschätzung der toxischen Wirkung von Schadstoffen und schadstoffhaltigem Wasser einsetzbar. Die Testergebnisse sind hochindikativ für das toxische Gefährdungspotential von Testgutproben. Die Testorganismenzahl ist sehr hoch ( $10^3$ - $10^5$  Bakterienzellen). Die Lagerung der Testkeime ist sehr einfach im Kühlschrank möglich. Die Keime sind lyophilisiert im Handel erhältlich. Die Anzucht ist relativ schnell durchführbar. Da der Test trotz kurzer Testdauer (16 Stunden) über mehrere Generationen (etwa 7) läuft, handelt es sich um einen chronischen Toxizitätstest. Die Empfindlichkeit gegenüber toxischen Stoffen ist gut auf Gewässer abgestimmt. Als Zellvermehrungshemmtest erfaßt dieser Test die Hemmwirkung wassergefährdender Stoffe, im Gegensatz zu Hemmtesten, welche physiologische Teilprozesse als Testkriterium heranziehen, allseitig (BRINGMANN u. KÜHN 1977). Die Materialkosten dieses Tests sind gering, der Test ist jedoch sehr platz- und arbeitsaufwendig. Störungen, die durch Trübung und Färbung von Proben verursacht werden, sind zum Teil ausgleichbar.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Toxizitätstests sind unbedingt notwendig, um über die toxische Wirkung von wasserlöslichen Stoffen, komplexen Abwässern und abwasserhaltigen Grund- und Oberflächenwässern Aufschlüsse zu erhalten. Um die Beeinflussung von Ökosystemen umfassend überwachen zu können, ist auch der Einsatz von Vertretern der Destruenten (Bakterien) unumgänglich.

Die Ergebnisse von Toxizitätstests mit Organismen der verschiedenen Organisationsstufen sind nicht austauschbar.

Der Nutzen von Leuchtbakterientests liegt vor allem darin, daß bei einer großen Zahl von Prüfsubstanzen, Abwasser- und Wasserproben ein Screeningtest durchgeführt werden kann, der mit geringem Zeit- und Kostenaufwand verbunden ist.

Der aufwendigere *Pseudomonas putida* Zellvermehrungshemmtest ist als Haupttest neben Tests mit Vertretern der übrigen Organisationsstufen (z.B. Algen, höhere Wasserpflanzen, Daphnien, Fische) einsetzbar. Die Empfindlichkeit von *Pseudomonas putida* ist für Gewässer gut abgestimmt. Die Testergebnisse sind hochindikativ für das Gefährdungspotential, das von schadstoffhaltigem Testgut ausgeht.

Die ansteigende Zahl von toxischen Stoffen, die die Umwelt belasten, zwingt zu einer verstärkten Überwachung auch auf dem Wassersektor. Für die ordnungsgemäße Durchführung von toxikologischen Testverfahren nach GLP (Good Laboratory Practice) sind auch hier dringend die entsprechenden räumlichen, personellen und finanziellen Voraussetzungen weiter zu verbessern.

## SUMMARY

### Bacteriological tests for the assessment of toxic effects of water soluble substances, complex sewage and polluted surface water

Toxicity tests are necessary to obtain information about toxic effects of water soluble substances, complex sewage and polluted ground- and surface water. For a complete monitoring of toxic effects on ecosystems, the use of members of the destruent bacteria as test-organisms is indispensable. The results of tests using organisms of different stages of organization are not exchangeable.

The toxicity test with photobacteria (Microtox Test) is relative simple and very quick. Therefore a screening of a big count of samples is practicable. The *Pseudomonas putida* test is more complicated and can be used as the main test alongside tests with members of all organization stages (e.g. algae, water plants, *Daphnia*, fish). The sensitive *Pseudomonas* is well adapted to surface waters, because this species is a typical member of the flora of water bodies. The test results are indicative of the potential of danger that comes from toxic materials.

The increasing amount of toxic substances that are spread in the environment requires an intensive monitoring of water by toxicity tests.

## Literatur

- AMES, B.N., DURSTON, W.E., YAMASAKI, E., LEE, D.F. (1973): Carcinogens are mutagens: a simple test system combining live homogenates for activation and bacteria for detection.- Proc Nat Acad Sci 70, 2281-2285.
- BECKMAN INSTRUMENTS INC. (1982): Microtox systems operating manual no. 015.555.879, Carlsbad-California.

- BRINGMANN, G., KÜHN, R. (1977): Grenzwerte der Schädigung wassergefährdender Stoffe gegen Bakterien (*Pseudomonas putida*) und Grünalgen (*Scenedesmus quadricauda*) im Zellvermehrungshemmtest.- WAF 10, 87-98.
- BGBI. f.d. Rep.Österreich (1989): ChemG-Anmeldungs- und Prüfnachweisverordnung.- 17.Stück, 40. Verordnung.
- BULICH, A.A. (1979): Use of Luminiscent Bacteria for Determining Toxicity in Aquatic Environments. In: Aquatic Toxicology: Second Conference. (Eds. Marking, L.L., Kinserle, R.A.).- ASTM STP 667, 98-106.
- (1986): Bioluminescence Assays.- In: Toxicity Testing Using Microorganisms. (Eds. BITTON, C., DUTKA, B.J.). Vol.1, 57-74; CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- BULICH, A.A., ISENBERG, D.L. (1981): Use of luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity.- ISA Transactions 20, 29-33.
- BUNDESMINISTERIUM für LAND- u. FORSTWIRTSCHAFT (1981): Richtlinie für die Begrenzung von Abwasseremissionen.- Eigenvlg., Wien.
- (1986): Pflanzenschutzmittelgesetz, Entwurf.- Stand 18.12.1986.
- (1987): Vorläufige Richtlinie für die Begrenzung von Immissionen in Fließgewässern (ImRL).- Eigenvlg., Wien.
- DEV (Deutsche Einheitsverfahren) L 3: Bestimmung der Toxizität von Abwässern und Abwasserinhaltsstoffen nach der Dehydrogenaseaktivität mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC).- Vlg. Chemie, Weinheim.
- L 12: Der Assimilationszehrungstest.- Vlg. Chemie, Weinheim
- DIN 38412, Teil 7A und B: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV) - Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*. A: Test mit frisch gezüchteten Bakterien. B: Test mit lyophilisierten Bakterien.- Entwurf.
- Teil 8: DEV Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Bakterien (*Pseudomonas* Zellvermehrungshemmtest).- Entwurf
- GRABMAYR, P., ROSSMANN, H. (1978): Das österreichische Wasserrecht. 2. Auflg.- Vlg. öst. Staatsdruckerei, Wien.

- HERBST, V., KLEESIEK, W., LÖFFLER, J. (1989): Toximeter Der Einsatz kontinuierlich arbeitender Testsysteme in automatischen Gütemeßstationen.- Mitt. d. Niedersächs. Landesamtes f. Wasserwirtschaft, H. 8, 53-69.
- HINWOOD, A.L., McCORMICK, M.J. (1987): The Effect of Ionic Solutes on  $EC_{50}$ -Values Measured Using the Microtox System.- Toxicity Assessment, Vol.2, 449-461.
- KOLLER-KREIMEL, V., RODINGER, W. (1987): Aquatische Toxizität - ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung von Substanzen und Abwässern (Emissionen) sowie zur Feststellung der toxischen Beeinträchtigung von Oberflächengewässern (Immissionen).- Wasser und Abwasser 31, 413-432.
- KREBS, F. (1983): Toxizitätstest mit gefriergetrockneten Leucht bakterien.- GWA 63, 173-230.
- KRIEG, TOMELTY and WELLS (1967): Inhibition of Flagellar Coordination in *Spirillum volutans*.- J Bact 94, 1431-1436.
- LEVI, Y., HENRIET, C., COUTANT, J.P., LUCAS, M., LEGER, G. (1989): Monitoring acute toxicity in rivers with the help of Microtox Test.- Water Supply 7, 25-31.
- OECD (1986): The Use of Biological Tests for Water Pollution Assessment and Control.- ENV/WAT 86.1.
- OFFHAUS, K. (1969): Abwasserbewertung mit Hilfe von Toxizitäts- und Belebtschlammversuchen.- WAF 2, 171-179.
- PLÖTZ, J. (1974): Ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Gesamttoxizität von Wasser- und Abwasserproben für Bakterien.- DGM 18, 77-79.
- POPP, W. (1988): Testverfahren mit Bakterien zur Bestimmung der Toxizität von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser.- Münchener Beiträge 42, 95-111.
- QURESHI, A.A., FLOOD, K.W., THOMPSON, S.R., SANHURST, S.M., INNIS, C.S., ROKOSH, D.A. (1982): Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents. In: Aquatic Toxicity and Hazard Assessment: 5<sup>th</sup> Conference (eds. PEARSON, J.G., FOSTER, R.B., BISHOP, W.E.).- ASTM STP 766, 179-195.
- RIBO, J.M., KAISER, K.L.E. (1987): *Photobacterium phosphoreum*. Toxicity Bioassay. I. Test Procedures and Applications.- Toxicity Assessment, Vol.2, 305-323.

- ROBRA, K.H. (1976): Inhibitorwirkung auf die Substratoxydation von *Pseudomonas* Stamm Berlin mit Hilfe polarographischer Sauerstoffmessung.- GWF 117, 80-86.
- SLOOF, W., CANTON, J.H., HERMENS, J.L.M. (1983): Comparison of the susceptibility of 22 Freshwater species to 15 chemical compound. I. Subacute toxicity tests.- Aquatic Toxicology 4, 113-128.
- STADLER, G., HARTIG, K.-J. (1988): Chemikaliengesetz.- Manz'sche Verlagsbuchhandlung, Wien, Sonderausgabe Nr. 70.
- VASSEUR, P., FERARD J.F., RAST, C., LARBAIGT, G. (1984): Luminiscent Marine Bacteria in Ecotoxicity Screening Tests.- In: Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems (Eds. LIU, D., DUTKA, B.J.). Marcel Deklar, Inc. N.Y., 23-35.

Anschrift des Verfassers: Ob.Rat Dr. Gerhard KAVKA, Bundesanstalt für Wassergüte, Schiffmühlenstr.120, A-1223 Wien.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Wasser und Abwasser](#)

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: [1989](#)

Autor(en)/Author(s): Kavka G.

Artikel/Article: [Bakteriologische Tests zur Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen, komplexen Abwässern und schadstoffhaltigem Oberflächenwasser 179-214](#)