

Teil II: Gegenwärtig zur Verfügung stehende Testverfahren

R. Kanne

Bayer AG, Werksverwaltung Leverkusen, Umweltschutz/Analytik, D – 5090 Leverkusen, Bayerwerk

Die derzeit zur Verfügung stehenden und somit für den eingangs erwähnten Anwendungszweck zu überarbeitenden Testverfahren sind in → Tabelle 1 zusammengefaßt. Im folgenden wird diskutiert, inwieweit die genannten Anforderungen an analytische Meßmethoden von den einzelnen Verfahren erfüllt werden bzw. Verbesserungen vorzunehmen sind.

Tabelle 1: Standardisierte biologische Testverfahren zur Bestimmung der akuten Schadwirkung von Stoffen, Oberflächengewässern und Abwasser.

Testverfahren (Testorganismus)	Ökologische Aussagekraft	Allgemeine Verfügbarkeit des Testmaterials	Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse	Zeitlicher Prüfaufwand
Fischttest DIN 38412 Teil 20	+	+	+	48 h
Daphnientest DIN 38412 Teil 11	+	+	– (Anzuchtprobleme)	24 h
Algentest DIN 38412 Teil 9 Stand Okt. 86	*	+	zu wenig Erfahrung	72 h
Bakterientests Wachstumshemmung z.B. BRINGMANN, KÜHN	?	+	+	8–24 h
Atmungshemmung ISO 8192		+	+	0,5–3 h
Biolumineszenz		+	+	0,25–0,3 h

1 Fischttest

Fische als die letzten Glieder der Nahrungskette unserer Oberflächengewässer haben eine wichtige *Indikatorfunktion*. Infolgedessen ist der nun schon seit Jahren bewährte **Fischttest** nicht mehr umstritten (→ Abb. 1). Die *ökologische Relevanz* ist anzusetzen, da der *Aland*, das ist die Wildform der für diesen Test eingesetzten Goldorfen, in den stehenden Gewässern Mitteleuropas verbreitet ist. Die *allgemeine Verfügbarkeit* kann ein Problem sein, da, bedingt durch die Laichzeiten der Fische, nicht zu jeder Jahreszeit geeignetes Fischmaterial zur Verfügung steht.



Abb. 1: Goldorfen (*Leuciscus idus melanotus*)
Foto KANNE

Allerdings scheinen diese Schwierigkeiten heute weitgehend ausgeräumt zu sein. Die *Reproduzierbarkeit* der Meßergebnisse ist gut, und mit 48 h liegt die *Versuchsdauer* in einem vertretbaren Rahmen.

Man muß jedoch darauf hinweisen, daß die derzeit diskutierten Änderungen, wie z.B. die **geometrische Verdünnungsfolge**, eine wesentliche Verschärfung des Fischttests darstellt. Aufgrund des Abwasserabgabengesetzes bringt sie für diejenigen Einleiter eine Erhöhung der Abgabe, die einen G_F -Wert (Verdünnungsfaktor) haben, der zwischen der geometrischen Verdünnungsfolge liegt.

Anstelle von z.B. $G_F = 5$ oder $G_F = 6$ gilt dann der G_F -Wert 8. In bezug auf eine Anwendung im Rahmen des Wasserhaushaltsgesetzes (WHG) sollte es ausreichend sein, eine Verdünnungsstufe festzulegen, bei der keine gegenüber der Kontrolle erhöhte Mortalität festgestellt werden darf.

2 Daphnientest

Breit akzeptiert wie der Fischttest ist die *ökologische Aussagekraft* des **Daphnientests** (→ Abb. 2). *Daphnia magna*, der Testorganismus, ist ein typischer Vertreter des Seen-Planktons in Mitteleuropa und als Fischnährtier auch ein wichtiger *Indikatororganismus*. Theoretisch ist auch die *allgemeine Verfügbarkeit* des Testmaterials gegeben, da die Testorganismen in jedem entsprechend ausgestatteten Labor selbst angezogen werden können. Infolge der für *Daphnia magna* charakteristischen Jungfernzeugung liegt kloniertes Tiermaterial vor, das aus genetischen Gründen sehr einheitlich reagieren sollte. – Daß dem nicht so ist, wird durch die relativ starken Schwankungen der Empfindlichkeit (um mehr als den Faktor 3) gegenüber der Referenzchemikalie $K_2Cr_2O_7$ belegt. Diese relativ schlechte *Reproduzierbarkeit* wird auch nicht dadurch verbessert, daß bei der Überarbeitung der Vorschrift die Validierung des Tests mit Hilfe von Referenzchemikalien gestrichen werden soll. Gründe für diese Schwierigkeiten können zum einen bei immer wieder auftretenden epidemieartigen Pilzkrankheiten zu suchen sein, zum anderen gibt es deutliche Hinweise darauf, daß bis heute noch keine optimale Zusammensetzung des für die Anzucht verwendeten Wassers gefunden wurde. So führt beispielsweise der Zusatz von Kläranlagenabläufen zu dem Anzuchtwasser zu deutlich besseren Züchterfolgen. Solange diese bisher noch offenen Fragen nicht grundlegend bearbeitet und abgeklärt worden sind, ist bei einer routinemäßigen Anwendung dieses Tests bei der Überwachungsanalytik immer wieder mit Schwierigkeiten zu rechnen.

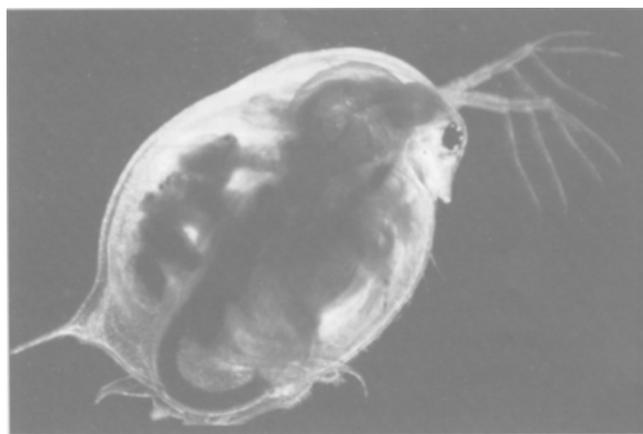


Abb. 2: Wasserfloh (*Daphnia magna*)
Foto KNIE

3 Algen

Als autotrophe Organismen benötigen *Algen* neben Licht und CO_2 im wesentlichen nur N und P um zu wachsen. Übermäßiges Algenwachstum ist deshalb in der Regel ein Hinweis für eine N- und P-Belastung des betreffenden Gewässers und damit auch für eine drohende *Eutrophierung*. Aus diesem Grund ist die *ökologische Aussagekraft* des **Algentests** (→ Abb. 3) nicht unumstritten. Die *Verfügbar-*

keit des Testmaterials ist gegeben, da sich Algen problemlos im Labor anzüchten lassen. Über die *Reproduzierbarkeit* der Meßergebnisse liegen noch keine ausreichenden Erfahrungen vor, doch scheint es in diesem Punkt keine Probleme zu geben.

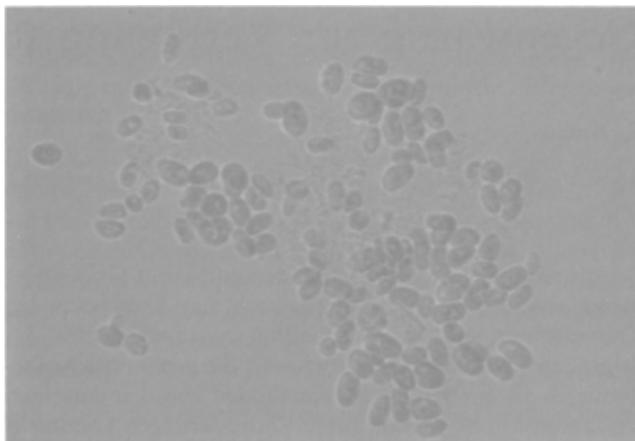


Abb. 3: Algen (*Scenedesmus subspicatus*)
Foto KNIE

4 Bakterien

Von der Handhabung und der Testdurchführung her stellen **Bakterien** ideale Testorganismen für eine biologische Überwachungsanalytik dar. Einerseits, weil Bakterien bereits seit Jahrzehnten in Laboratorien unter definierten Bedingungen gezüchtet werden, und deshalb die *Verfügbarkeit* des Testmaterials jederzeit gewährleistet ist. Vor allem aber deswegen, weil aufgrund der kurzen Generationszeiten und der hohen Stoffwechselaktivität von Bakterien *extrem kurze Ansprechzeiten* für biologische Tests möglich sind; d.h. bereits (15 – 30 min) nach Testbeginn können Anzeichen für akut bakterientoxische Wirkungen gemessen werden.

Insbesondere gilt dies für **Leuchtbakterientests** (→ Abb. 4), die für die Klassifizierung von Abwässern mit gefährlichen

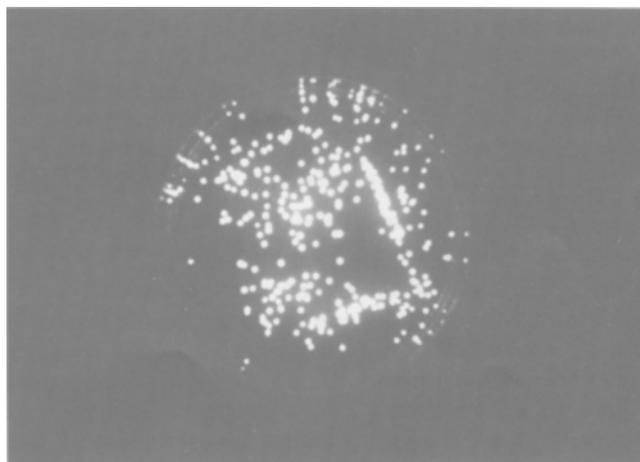


Abb. 4: Leuchtbakterien (*Photobacterium phosphoreum*)
Foto KREBS

Stoffen herangezogen werden sollen. Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, daß bestimmte Bakterienstämme die Fähigkeit besitzen, einen Teil der durch Stoffwechselreaktionen freigesetzten Energie in Licht umzuwandeln. Gemessen wird die Abnahme der Lichtemission dieser Bakterienkulturen unter dem Einfluß der zu untersuchenden Probe. Neben der erwähnten *kurzen Ansprechzeit* besticht dieses elegante Meßprinzip durch seine *gute Reproduzierbarkeit* und auch durch seine *einfache Handhabung*. Gerade diese einfache Handhabung macht diesen Test so attraktiv: die Fa. Microbics bietet Leuchtbakterien in lyophilisierter Form an, so daß der Test auch in Laboratorien durchgeführt werden kann, die für mikrobiologische Arbeiten nicht eingerichtet sind.

Kriterium für die Auswahl eines Testverfahrens für Überwachungszwecke kann allerdings nicht ausschließlich die einfache Handhabung, sondern muß die **Aussagekraft des Testverfahrens** sein, und hier liegt die eigentliche Problematik von Bakterientests.

Als Lebewesen mit dem neben Viren niedrigsten Spezialisierungsgrad haben Bakterien in erstaunlicher Weise die Fähigkeit, sich den *unterschiedlichsten Umweltbedingungen anzupassen*. Das bedeutet aber, daß es innerhalb eines Bakterienstammes eng miteinander verwandte Spezies gibt, die völlig unterschiedliche Eigenschaften haben und auch deshalb *ökotoxikologisch unterschiedlich reagieren*; d.h., es gibt nicht die „Bakterientoxizität“ an sich, sondern nur die Giftwirkung eines Stoffes oder Stoffgemisches auf eine bestimmte Bakterienpopulation unter den gegebenen Milieubedingungen. Dieses Phänomen, das in diesem Ausmaß sonst bei allen anderen Lebewesen nicht zu beobachten ist, macht es zwingend erforderlich, bei der Auswahl des Testorganismus die zu beantwortende Fragestellung zu berücksichtigen.

Am Beispiel der Untersuchung von Abwasserproben aus dem Bayerwerk Leverkusen mit Hilfe von *natürlichen* und *genetisch konstruierten* Leuchtbakterien konnten wir zeigen, wie kraß sich die unterschiedliche Reaktion verschiedener Stämme auf das Meßergebnis auswirken kann (→ Abb. 5, 6).

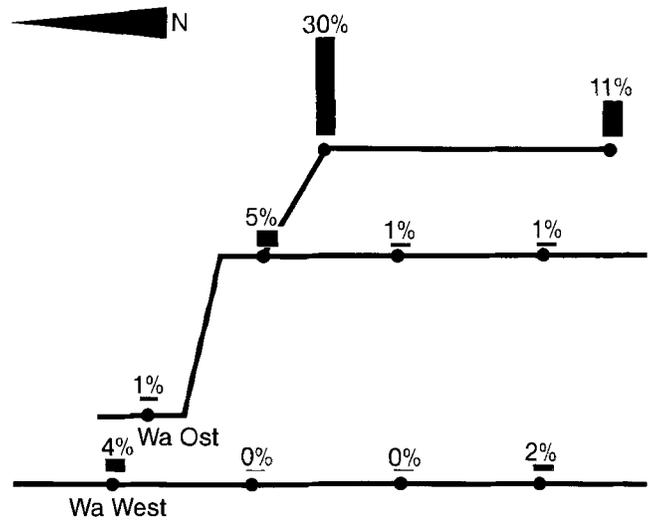


Abb. 6: Bakterientoxizität in Tagesmischproben der Kontrollstationen des Biokanalnetzes (Mittelwerte)

Testorganismus: ATCC 29304

Untersuchungszeitraum: 23. 07. 85 – 24. 10. 85

Die Untersuchungen haben gezeigt, wie wenig hilfreich Messungen mit **nicht adaptierten Bakterien** für die Erkennung von gefährlichen Abwasserströmen sind. Aufgrund der Messungen mit natürlichen Leuchtbakterien wären Abwasserteilströme, unter Umständen mit hohem technischen Aufwand, saniert worden, die sich in keiner Weise negativ auf den Wirkungsgrad der biologischen Kläranlage auswirken, während die evtl. wirklich kritischen Teilströme als relativ harmlos beurteilt worden wären.

Aufgrund dieser Erfahrungen muß die Aussagekraft nicht adaptierter Leuchtbakterien in bezug auf ökotoxikologische Fragestellungen als äußerst fraglich beurteilt werden; auch deshalb, weil zu befürchten ist, daß die im Handel befindlichen Leuchtbakterienlyophilisate durch die Manipulationen des Waschens und Lyophilisierens so unproduzierbar geschädigt werden, daß sie extrem unterschiedlich empfindlich auf Milieuveränderungen beim Einsatz in den zu untersuchenden Proben reagieren; vor allem aber deswegen, weil die derzeit verfügbaren natürlichen Leuchtbakterien, deren Lebensraum das Meer oder der Boden sind, extrem empfindlich auf Abwasserströme reagieren müssen, da sie aufgrund ihrer natürlichen Standorte nicht an derartige komplexe Substrate adaptiert sind.

„Gefährlich“ in bezug auf Bakterientoxizität können sich in der Umwelt nur solche Stoffe auswirken, die sich auch nach erfolgter Adaption noch hemmend auf eine Bakterienpopulation auswirken. Derartige Adaptationsprozesse können aber bei den kurzen Inkubationszeiten – max. 30 min – eines Leuchtbakterientests nicht erfaßt werden. Diese Tat-

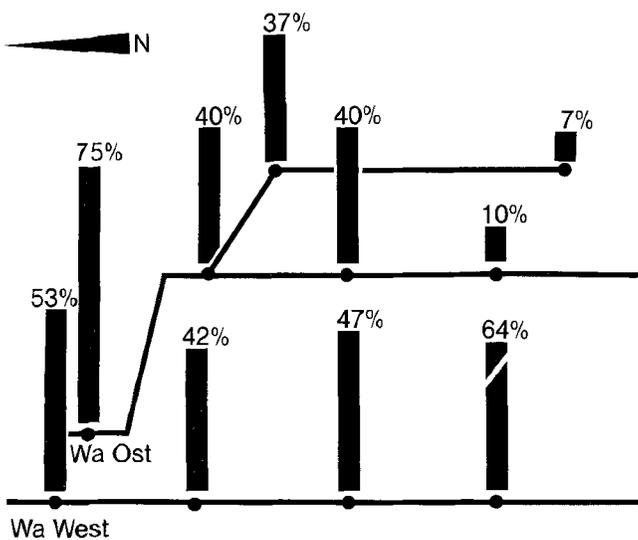


Abb. 5: Bakterientoxizität in Tagesmischproben der Kontrollstationen des Biokanalnetzes (Mittelwerte)

Testorganismus: PDB 101 70 K

Untersuchungszeitraum: 23. 07. 85 – 24. 10. 85

sache zeigt, daß dieser Test nicht zur Bewertung allgemein ökologischer Wirkungen herangezogen werden kann. Ökotoxikologisch sinnvolle Meßergebnisse können deshalb nur erzielt werden, wenn die eingesetzten Testkulturen in ihren Milieuanprüchen bereits auf die zu schützende Bakterienpopulation, z.B. des Vorfluter, abgestimmt sind. Aus diesen Gründen können selbst bei dieser Vorgehensweise „falsch positive“ Ergebnisse nie mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Je **angepaßter allerdings ein System ist, desto geringer wird die Gefahr einer Fehlansage.**

Wenn man keine gentechnologisch konstruierten Leucht-bakterien für die Abwasseruntersuchung einsetzen will, so ist es sinnvoller, auf alternative Testverfahren auszuweichen, als die Prüfung mit „exotischen“ Testorganismen durchzuführen, die keine ökologisch relevanten Meßergebnisse erbringen. Entsprechende Meßverfahren stehen uns in Form der bereits seit Jahren bewährten **Respirationstests**, z.B. des ISO-Tests, zur Verfügung. Solche Testverfahren

können mit ökologisch relevanten *Reinkulturen*, z.B. *Ps. putida*, oder mit *Mischpopulationen* aus den zu schützenden Oberflächengewässern durchgeführt werden, sodaß ökologisch sinnvolle Meßergebnisse erwartet werden können.

Literatur

- KANNE, R.: Der praxisnahe Leuchtbakterientest zur Kläranlagenüberwachung. In: B. BÖHNKE (Hrsg.) Gewässerschutz – Wasser – Abwasser 92: Instrumente und Methoden zur Ermittlung der Parameter im novellierten Abwasserabgabengesetz. RWTH-Aachen (1987)
- KANNE, R.: Überwachung von Kläranlagenzuläufen mit Hilfe natürlicher und genetisch konstruierter Leucht-bakterien. In: Vom Wasser, Band 67. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim (1986)
- KANNE, R.: Analytik bakterientoxischer Effekte mit Hilfe genetisch konstruierter Leucht-bakterien. Fresenius' Z. Anal. Chem. 325, 136 – 139 (1986)

Teil III: Ausgewählte Testverfahren

P.-D. Hansen

Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes, Versuchsfeld Marienfelde, D – 1000Berlin 33

Die Organismen stellen ein empfindliches Detektionssystem bei der summarischen Erfassung von Schadstoffen dar. Während durch die chemisch-physikalischen Meßmethoden niemals alle in der Umwelt auftretenden Chemikalien vollständig zu identifizieren sind, ermöglichen Biotests die summarische Erfassung und Überwachung gefährlicher Stoffe.

1 WaBoLu-Aquatox-Überwachungssystem

Am Beispiel des „WaBoLu-Aquatox“-Überwachungssystems lassen sich die Möglichkeiten eines „wirklichkeitsnahen“ in-situ-Biotestsystems zeigen. In diesem Testsystem werden über längere Versuchszeiträume Organismen (Zooplankton, Fische und Muscheln sowie Makrophyten) in gewässerrelevanten Verdünnungsverhältnissen von Abwasser und Flußwasser im Durchfluß exponiert.

Mit dem „WaBoLu-Aquatox“-Überwachungssystem soll verhindert werden, daß durch unzulängliche Abwassergrenzwerte im Gewässer hinsichtlich der subletalen Effekte an den Organismen ein Schaden entstehen kann. Die Quantifizierung der subletalen Effekte wird am Beispiel von Untersuchungen zur Biotransformation mit biochemischen Meßmethoden (mischfunktionelle Oxidasen) und zur Reduktion der respiratorischen Oberflächen mit einfachen Flächenmessungen an den Primär- und Sekundärlamellen der Kiemen der Fische durchgeführt.

2 WRC-Mk-III-Fischmonitor/Biosensor

Als Frühwarnsystem zur Erkennung eines Schadensfalls am Gewässer (Störfall) werden die Ergebnisse mit dem sog. WRC-Mk-III-Fischmonitor und einem beim WaBoLu eingesetzten Biosensor (Bakterienelektrode mit Cyanobakterien) dargestellt.

2.1 WRC-Mk-III-Fischmonitor

Detektionssystem: Forellen und andere Fischarten

Bewertungskriterien: Änderung der Frequenz des Schlages der Kiemendeckel, jeweils geeicht an einem Gewässerzustand, der um Bruchteile von Sekunden, Minuten oder Stunden zurückliegt.

Testprinzip: Exposition von 8 einzelnen, in Durchflußkammern gehaltenen Fischen. Die Atmungsfrequenz wird über Elektroden abgegriffen, und die Signale in einem Computersystem verarbeitet. Da dieses Frühwarn-, „in-situ“-Durchflußsystem mit dem „WaBoLu-Aquatox“-Überwachungssystem gekoppelt ist, wird im Falle einer Alarmgebung der Zulauf zum „WaBoLu-Aquatox“ geschlossen. Hierdurch wird erreicht, daß eine Rückstellprobe von 2 400 l Wasser zusammen mit den hierin exponierten Organismen (Fische und Muscheln) für weiterführende Untersuchungen gesichert ist.