

Originalarbeiten: Biotestverfahren

Bakterielle Biotestverfahren zur Bestimmung der Toxizität von Abfällen

Uwe Strotmann, Joachim Roll, Cornelia Gendig, Siegmund Broja, Holger Czycholl

Fachhochschule Gelsenkirchen, Fachbereich Versorgungs- und Entsorgungstechnik,
Neidenburger Str. 10, D-45877 Gelsenkirchen

Korrespondenzautor: Prof. Dr. Uwe Strotmann

Zusammenfassung

Für die Risikobewertung von Abfällen werden schnelle und sensitive Screening-Verfahren benötigt, um mögliche toxische Effekte erfassen zu können. Um wässrige Eluate aus verschiedenen Abfällen herzustellen, wurden in dieser Studie verschiedene Elutionsmethoden (DIN 38414 Teil 4, EPA 1310, EPA 1320) benutzt; diese Eluate wurden dann auf potentielle bakterientoxische Wirkungen geprüft. Als bakterielle Toxizitätstests wurden der Leuchtbakterientest und der Wachstumshemmtest mit Belebtschlamm Bakterien benutzt. Hinsichtlich der verschiedenen Elutionsverfahren zeigten die Testsysteme eine gute Übereinstimmung der erhaltenen Ergebnisse, was die Zuverlässigkeit der Testsysteme unterstreicht. Der Leuchtbakterientest wies eine größere Sensitivität als der Wachstumshemmtest auf, was ebenfalls durch Literaturdaten bestätigt wird. Aus unseren Ergebnissen kann daher gefolgert werden, daß beide Testsysteme für die Toxizitätsabschätzung von wässrigen Abfalleluaten geeignet sind.

Schlagwörter: Abfalleluat; Abfalltoxizität; bakterielle Toxizität; Belebtschlamm Bakterien; Elutionsmethoden; Leuchtbakterientest; ökotoxikologisches Screening; Risikoabschätzung; Toxizitätsabschätzung; Wachstumshemmtest

Abstract

Bacterial Biotest Systems for the Assessment of Waste Toxicity

For a risk assessment of wastes, fast and sensitive screening methods are required to detect possible toxic effects. In this study, different leachability methods (DIN 38414, part 4; EPA 1310; EPA 1320) were used to prepare aqueous leachates from different wastes; these leachates were tested in different bacterial toxicity test systems for possible toxic effects. As bacterial toxicity tests, the luminescent bacteria test and the growth inhibition test with activated sludge bacteria were used. The test systems showed a good agreement of the results from the different leaching methods, thereby indicating the reliability of the test systems used. The luminescent bacteria inhibition test showed a higher sensitivity than the growth inhibition test which is in good accordance with literature data. We conclude that both test systems are well suited to assess the toxic potential of aqueous waste leachates.

Keywords: Activated sludge bacteria; bacterial toxicity; ecotoxicological screening; growth inhibition test; leaching methods; luminescent bacteria test; risk assessment; toxicity assessment; waste leachate; waste toxicity

1 Einleitung

Der Eintrag chemischer Substanzen über Abwässer und Abfälle ist ein wichtiger Belastungspfad für die Biosphäre. Bislang wurde diese Form der Belastung hauptsächlich über die Bestimmung von Summenparametern (CSB, TOC, AOX) und einiger wichtiger Einzelstoffe (z.B. Schwermetalle) verfolgt. Aus dieser analytischen Strategie ergab sich zwangsläufig, daß nicht alle potentiell umweltschädlichen bzw. toxischen Substanzen erfaßt wurden. Biotestverfahren können gerade in diesem Bereich eine wichtige Lücke in der chemischen Analytik schließen, indem sie integral die Toxizität einer zu analysierenden Probe erfassen und so wichtige Informationen für ein risk assessment liefern können. Daher

sind biologische Testverfahren neben der klassischen chemischen Analytik ein essentieller Bestandteil der Umweltanalytik geworden und haben auch Eingang in gesetzliche Vorgaben gefunden (KNE, 1989; NUSCH, 1993).

Unter den Biotestsystemen sind vor allem die Systeme von Interesse, die schnell und reproduzierbar Toxizitätswerte liefern können. Zu solchen Kurzzeit-Testsystemen gehören vor allem die bakteriellen Testsysteme (KANNE, 1989). Hier hat in letzter Zeit vor allem der Leuchtbakterientest eine große Bedeutung gewonnen und ist auch standardisiert worden (DIN 38412 Teil 34). Ein weiteres bakterielles Testsystem, das momentan nach ISO genormt wird (ISO 15522), ist der Wachstumshemmtest mit Belebtschlamm Bakterien (STROT-

MANN et al., 1994; STROTMANN und PAGGA, 1996). Dieses Testsystem bietet den Vorteil, daß es die Eigenschaften eines akuten und eines chronischen Systems vereinigt. Diese beiden Testsysteme liefern gut reproduzierbare Ergebnisse in kurzer Zeit und sind daher ideale Biotests für ein schnelles ökotoxikologisches Screening.

Bakterielle Testsysteme sind bisher vereinzelt zur Bestimmung der Belastung von kontaminierten Böden eingesetzt worden, doch im Bereich der Abfallanalytik wurden diese Biotestsysteme kaum genutzt, obwohl eine potentielle Eignung gegeben erscheint (PRELL-SWAID und SCHWEDT, 1994; REITER und SCHWEDT, 1995; SOMMERFELD und SCHWEDT, 1996). Eine wichtige methodische Voraussetzung für den Einsatz von Biotests zum Monitoring der Toxizität von Abfällen besteht in der Herstellung eines geeigneten wässrigen Eluats, das dann in Biotests auf mögliche toxische Wirkungen geprüft werden kann. Daher wurden in diesem Projekt verschiedene Elutionsverfahren geprüft und die erhaltenen Eluate anschließend sowohl im Leuchtbakterientest als auch im Wachstumshemmtest auf ihre potentielle Toxizität geprüft.

2 Material und Methodik

2.1 Elution der Abfälle

2.1.1 Elutionsverfahren nach DIN 38414 Teil 4

Nach dieser Methode wird der Abfall mit demineralisiertem Wasser ohne pH-Korrektur eluiert. Das Feststoff-Flüssigkeitsverhältnis betrug 1:10 (100 g Abfall wurden mit 1000 ml Wasser eluiert). Die Probe wurde 24 Stunden in einem Überkopfschüttler (Heidolph REAX 20) eluiert. Weitere Angaben finden sich in der DIN 38414 Teil 4 (1984).

2.1.2 Elutionsverfahren nach EPA 1310

Dieses Verfahren sieht eine Elution bei pH 5,0 vor. 50 g Abfall wurden mit 800 ml demineralisiertem Wasser eluiert. Nach 10 Minuten Elution wurde der pH-Wert mit Essigsäure auf pH 5,0 eingestellt und 24 Stunden in einem Überkopfschüttler weitereluiert. Nach der Elution wurde das Flüssigkeitsvolumen mit demineralisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Eine detaillierte Verfahrensbeschreibung findet sich bei EPA (1986) und RUMP und SCHOLZ (1995).

2.1.3 Mehrfachelutionsverfahren nach EPA 1320

Bei diesem Verfahren wird eine mehrfache Elution bei pH 3,0 durchgeführt. Das Feststoff-Flüssigkeitsverhältnis war genauso wie bei dem EPA 1310-Verfahren, die pH-Korrektur erfolgte in diesem Fall mit einem Gemisch aus Schwefelsäure und Salpetersäure. Einzelheiten zu dem Verfahren sind bei EPA (1992) und RUMP und SCHOLZ (1995) beschrieben.

2.2 Analytik der Eluate

Die Eluate wurden auf ihren TOC-Gehalt und CSB-Gehalt untersucht, um die verschiedenen Elutionsverfahren untereinander vergleichen zu können. Die TOC-Analytik wurde mit einem Shimadzu-TOC 5000-Analyzer nach Herstellerangaben durchgeführt. Die CSB-Analytik wurde mit Dr. Lange-Küvettentests durchgeführt. Der TOC- bzw. CSB-Gehalt von zugesetztem pH-Korrekturmittel bei der Elution nach EPA 1310 bzw. EPA 1320 wurde von dem TOC- bzw. CSB-Gehalt der Proben abgezogen.

2.3 Durchführung der bakteriellen Biotestverfahren

2.3.1 Leuchtbakterientest

Der Leuchtbakterientest mit *Photobacterium phosphoreum* wurde in Anlehnung an die DIN-Vorschrift 38412 Teil 34 durchgeführt (DIN, 1991). Der Test beruht darauf, daß die Inhibition der Leuchtintensität der Leuchtbakterien bei unterschiedlichen Eluatkonzentrationen bestimmt wird. Der Inkubationszeitraum von Eluat und Leuchtbakterien betrug 30 Minuten.

2.3.2 Wachstumshemmtest

Der Wachstumshemmtest mit Belebtschlamm Bakterien wurde in Anlehnung an die ISO-Methode 15522 durchgeführt (ISO, 1996; STROTMANN und PAGGA, 1996). Der Test beruht darauf, daß die Wachstumshemmung einer natürlichen Bakterienmischkultur bei unterschiedlichen Eluatkonzentrationen gegenüber einer nicht inhibierten Kontrollkultur bestimmt wird.

2.3.3 Auswertung der Biotestverfahren

Zur quantitativen Charakterisierung der Toxizität wurde die effektive Konzentration (effective concentration; EC) angegeben, bei der eine Hemmung von 20% (EC20), 50% (EC50) oder 80% (EC80) erfolgte.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der Eluate

Für die Untersuchungen wurden fünf verschiedene Abfälle aus dem kommunalen und industriellen Bereich ausgewählt. Eine zusammenfassende Charakterisierung dieser Abfälle findet sich in **Tabelle 1**. Aus diesen Abfällen wurden je drei Eluate gewonnen (Elutionsverfahren nach DIN 38414 Teil 4, EPA 1310, EPA 1320). Die wichtigsten Summenparameter dieser Eluate (TOC, CSB) sind in **Tabelle 2** und **3** zusammengefaßt. Es zeigte sich dabei, daß die TOC- bzw. CSB-Konzentrationen in den Eluaten einiger Abfälle differierten.

Diese Beobachtung wurde auch schon von anderen Autoren beschrieben; es wurde dabei insbesondere eine Abhängigkeit des Elutionsverhaltens vom pH-Wert, Feststoff-Flüssigkeitsverhältnis, der Ionenstärke und des Redoxpotentials des Elutionsmittels festgestellt (NAGLE et al., 1982; HAM et al., 1980; JACKSON et al., 1984; FAULSTICH und TIDDEN, 1990). Ziel der Elutionsversuche war es dabei immer, ein Abbild der realen Verhältnisse z.B. in einem Deponiekörper zu erhalten. Der Einsatz einer Vielzahl solcher synthetischer Elutionsmittel hat jedoch nicht zu einer größeren Sicherheit bei der Abschätzung von Gefährdungen, die von abgelagerten Abfällen potentiell ausgehen, geführt. Eine eingehende Diskussion dieser Problematik findet sich bei RUMP und SCHOLZ (1995).

terientests liegt darin, daß die Ergebnisse aus diesem Testverfahren bereits nach sehr kurzer Zeit (30 Minuten) vorliegen. Dagegen liegen die Ergebnisse des Wachstumshemmtests nach etwa 4 bis 6 Stunden vor. Dabei kann beim Wachstumshemmtest die Inhibition sowohl über die Veränderung der Wachstumsrate als auch der Biomasseproduktion erfaßt werden. In dieser Studie wurde stets die Hemmung der Biomasseproduktion gemessen. Der Vorteil des Wachstumshemmtests als Mehrgenerationentest liegt darin, daß sowohl die akuten als auch chronischen Effekte von Umweltschadstoffen erfaßt werden, da die gesamte Wachstumsentwicklung von Bakterienkulturen von der lag-Phase bis zur stationären Phase erfaßt wird und ausgewertet werden kann (→ Abb. 1). Die Anwendbarkeit dieser beiden Test-

Tabelle 1: Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Abfälle

	Abfall A	Abfall B	Abfall C	Abfall D	Abfall E
Bezeichnung	Galvanikschlamm	Metallschlamm	Sedimentations-schlamm	Faulschlamm	Lackreststoff
ASN*	51107	35506	94801	94502	555111
Herkunft	Galvanik-Industrie	Metall-Industrie	Chloralkalielektrolyse	Kläranlage	Lack-Industrie
Konsistenz	fest, grobkörnig	fest, feinkörnig	fest, feinkörnig	pastös	fest, feinkörnig
Farbe	ocker	schwarz	braun	braun	weiß
Geruch	neutral	neutral	neutral	faulig	neutral

*ASN: Abfallschlüsselnummer

Tabelle 2: TOC-Werte der Abfalleluate, die nach den angegebenen Elutionsmethoden gewonnen wurden

Abfall	Elution nach EPA 1310 TOC [mg/l]	Elution nach EPA 1320 TOC [mg/l]	Elution nach DIN 38414, Teil 4 TOC [mg/l]
A	31	31	65
B	111	146	41
C	5	2	15
D	58	10	19
E	4472	5057	5758

Tabelle 3: CSB-Werte der Abfalleluate, die nach den angegebenen Elutionsmethoden gewonnen wurden

Abfall	Elution nach EPA 1310 CSB [mg/l]	Elution nach EPA 1320 CSB [mg/l]	Elution nach DIN 38414, Teil 4 CSB [mg/l]
A	215	207	195
B	631	559	85
C	22	26	24
D	146	83	89
E	3445	5374	13940

3.2 Toxizität der Eluate im Leuchtbakterientest und Wachstumshemmtest

Die Eignung des Leuchtbakterientests und des Wachstumshemmtests zur Charakterisierung der Toxizität von Chemikalien ist bereits mehrfach beschrieben worden (RIBO und KAISER, 1987; STROTMANN und EGLSÄER, 1995; STROTMANN et al., 1994; ALSOP et al., 1980). Der Vorteil des Leuchtbak-

systeme für Abfalleluate als komplexe wässrige Systeme wurde eingehend untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen der verschiedenen Abfalleluate sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefaßt. Es zeigte sich dabei, daß mit Hilfe dieser Biotestsysteme toxische Eluate schnell detektiert werden konnten. Insbesondere die Abfälle A und E wiesen eine Toxizität in beiden Testsystemen auf, während bei den Eluaten der anderen Abfälle keine oder nur geringe Hinwei-

Tabelle 4: Toxizität der verschiedenen Abfalleluate im Leuchtbakterientest

Toxizität des Eluats	Abfall A	Abfall B	Abfall C	Abfall D	Abfall E
EPA 1310					
EC20 [ml/l]	41	64	63	> 500 ^a	5
EC50 [ml/l]	115	> 500 ^a	> 500 ^a	> 500 ^a	10
EC80 [ml/l]	> 500 ^a	> 500 ^a	> 500 ^a	> 500 ^a	21
EPA 1320					
EC20 [ml/l]	6	58	7500 ^a	> 500 ^a	4
EC50 [ml/l]	15	> 500 ^a	> 500 ^a	> 500 ^a	8
EC80 [ml/l]	58	> 500 ^a	> 500 ^a	> 500 ^a	31
DIN 38414, Teil 4					
EC20 [ml/l]	61	> 500 ^a	> 500 ^a	> 500 ^a	1
EC50 [ml/l]	> 500 ^a	> 500 ^a	> 500 ^a	> 500 ^a	11
EC80 [ml/l]	> 500 ^a	> 500 ^a	> 500 ^a	> 500 ^a	31

^ahöchste getestete Konzentration

Tabelle 5: Toxizität der verschiedenen Abfalleluate im Wachstumshemmtest

Toxizität des Eluats	Abfall A	Abfall B	Abfall C	Abfall D	Abfall E
EPA 1310					
EC20 [ml/l]	40	98	50	> 100 ^a	10
EC50 [ml/l]	87	> 100 ^a	> 100 ^a	> 100 ^a	27
EC80 [ml/l]	> 100 ^a	> 100 ^a	> 100 ^a	> 100 ^a	45
EPA 1320					
EC20 [ml/l]	8	63	> 100 ^a	> 100 ^a	11
EC50 [ml/l]	16	> 100 ^a	> 100 ^a	> 100 ^a	23
EC80 [ml/l]	72	> 100 ^a	> 100 ^a	> 100 ^a	41
DIN 38414, Teil 4					
EC20 [ml/l]	80	> 100 ^a	> 100 ^a	> 100 ^a	8
EC50 [ml/l]	> 100 ^a	> 100 ^a	> 100 ^a	> 100 ^a	23
EC80 [ml/l]	> 100 ^a	> 100 ^a	> 100 ^a	> 100 ^a	40

^ahöchste getestete Konzentration

se auf Toxizität gefunden werden konnten. Diese übereinstimmenden Ergebnisse unterstreichen die Eignung dieser bakteriellen Biotestsysteme für ein schnelles ökotoxikologisches Screening vor allem von komplexen Proben, deren chemische Zusammensetzung weitgehend unbekannt ist.

Darüber hinaus konnten die Testsysteme nicht nur für Screening-Zwecke eingesetzt werden, sondern auch für die Ermittlung von quantitativen Dosis-Wirkungsbeziehungen. Bei Betrachtung der Dosis-Wirkungsbeziehungen insbesondere für den Abfall E (→ *Abb. 2, Tabelle 4 und 5*) konnte festgestellt werden, daß die ermittelten EC-Werte für die verschiedenen Abfalleluate in den einzelnen Testsystemen eine gute Übereinstimmung zeigten. So lagen beispielsweise die EC50-Werte beim Wachstumshemmtest mit den Eluaten von Abfall E in einem Bereich von 23 bis 27 ml/l und beim Leuchtbakterientest in einem Bereich von 8 bis 11 ml/l. Beim Vergleich der beiden Biotestsysteme untereinander fiel auf, daß der Leuchtbakterientest sensitiver reagierte als der Wachstumshemmtest und die entsprechenden EC50-Werte deutlich niedriger lagen. Diese ausgesprochene Sensitivität

des Leuchtbakterientests ist auch in der Literatur beschrieben; so wurde beispielsweise für 2,5-Dichlorphenol im Wachstumshemmtest eine EC50 von 30 bis 53 mg/l ermittelt, während die EC50 im Leuchtbakterientest bei 6 mg/l lag (STROTMANN et al., 1994; STROTMANN und EGLSÄER, 1995).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sowohl der Leuchtbakterientest als auch der Wachstumshemmtest bei den verwendeten komplexen wässrigen Eluaten gut reproduzierbare Ergebnisse liefern, die sowohl für ein ökotoxikologisches Screening als auch für die Ermittlung von quantitativen Dosis-Wirkungsbeziehungen wertvoll sein können. Damit können die erhaltenen Daten auch für die Ermittlung des Gefährdungspotentials von Proben herangezogen werden, deren chemische Zusammensetzung weitgehend unbekannt ist.

Danksagung

Die Autoren danken der Fa. Dr. LANGE, Düsseldorf, für die freundliche Unterstützung des Projektes.

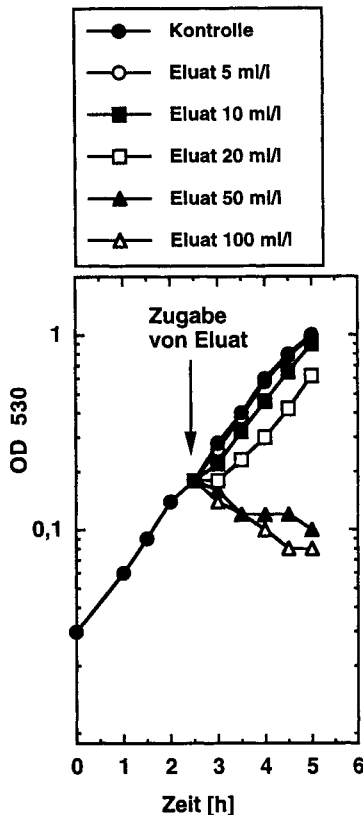


Abb. 1: Wachstumshemmung der eingesetzten Mischkultur bei verschiedenen Eluatkonzentrationen. Das Wachstum wurde als Zunahme der optischen Dichte bei 530 nm (OD 530) dargestellt. Das Eluat wurde aus Abfall E durch die EPA1320-Elutionsmethode gewonnen

4 Literatur

- ALSOP, G.M.; WAGGY, G.T.; CONWAY, R.A. (1980): Bacterial growth inhibition test. *J. Water Poll. Control Fed.* 52, 2452-2456
- DIN 38412 Teil 34 (1991): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*
- DIN 38414 Teil 4 (1984): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Schlamm und Sedimente (Gruppe S); Bestimmung der Eluierbarkeit mit Wasser (S4)
- EPA 1310 (1986): Extraction procedure toxicity test method and structural integrity test
- EPA 1320 (1992): Multiple extraction procedure
- FAULSTICH, M.; TIDDEN, F. (1990): Auslaugverfahren für Rückstände. *Abfallwirtschaftsjournal* 2, 646-657
- HAM, R.K.; ANDERSON, M.A.; STEGMANN, R.; STANFORTH, R. (1980): Die Entwicklung eines Auslaugtests für Industrieabfälle. *Müll und Abfall* 7, 212-220
- ISO 15522 (1996): Water Quality – Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms
- JACKSON, D.R.; GARRET, B.C.; BISHOP, T.A. (1984): Comparison of batch and column methods for assessing leachability of hazardous waste. *Environ. Sci. Technol.* 18, 668-673
- KANNE, R. (1989): Biologische Toxizitätstests. Teil II: Gegenwärtig zur Verfügung stehende Testverfahren. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.* 3, 23-26

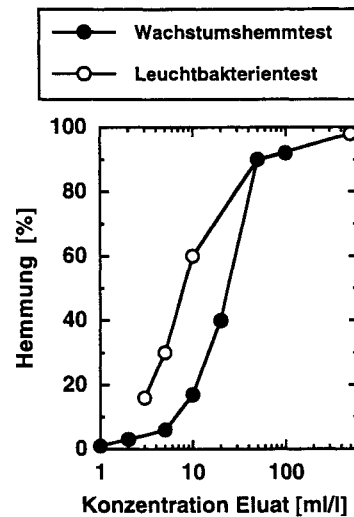


Abb. 2: Dosis-Wirkungsbeziehungen der Inhibition durch ein Eluat von Abfall E (Elutionsmethode 1320) im Leuchtbakterientest und Wachstumshemmtest

- KNIE, J. (1989): Biologische Toxizitätstests. Teil I: Anwendung in der Umweltanalytik. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.* 3, 20-27
- NAGLE, D.; KUNES, T.; STANFORD, R. (1982): Leaching behavior of lead and cadmium at various pH conditions. In: 5th annual Madison conference of applied research and practice on municipal and industrial waste. Sep 22-24, pp. 210-224
- NUSCH, E. (1993): Biologische Testverfahren – Aussagekraft und Grenzen der Übertragbarkeit. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.* 5, 155-161
- PRELL-SWAID, A.; SCHWEDT, G. (1994): A screening procedure for heavy metals in soil extracts by alcohol dehydrogenase and urease inhibition. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 22, 70-75
- REITER, C.; SCHWEDT, G. (1995): Einsatz des Biolumineszenz-Hemmtests zur Untersuchung kontaminierter Böden. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.* 7, 155-163
- RIBO, J.M.; KAISER, K.L.E. (1987): *Photobacterium phosphoreum* toxicity assay. I. Test procedures and applications. *Toxicity Assessment* 2, 305-323
- RUMP, H.; SCHOLZ, B. (1995): Untersuchungen von Abfällen, Reststoffen und Altlasten. VCH-Verlagsgesellschaft, S. 78-85
- SOMMERFELD, F.; SCHWEDT, G. (1996): Wirkungsorientierte Umweltanalytik. Kombination des pHstat-Verfahrens mit dem Biolumineszenz-Hemmtest. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.* 8, 303-306
- STROTMANN, U.J.; EGLSÄER, H.; PAGGA, U. (1994): Development and evaluation of a growth inhibition test with sewage bacteria for assessing bacterial toxicity of chemical compounds. *Chemosphere* 28, 755-766
- STROTMANN, U.J.; EGLSÄER, H. (1995): The toxicity of substituted phenols in the nitrification inhibition test and luminescent bacteria test. *Ecotoxicol. Env. Saf.* 30, 269-273
- STROTMANN, U.J.; PAGGA, U. (1996): A growth inhibition test with sewage bacteria – results of an international ring test 1995. *Chemosphere* 32, 921-933

Eingegangen am: 27.02.1998
Akzeptiert am: 06.04.1998