

DE

ANHANG

Der Anhang der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 wird wie folgt geändert:

- (1) Am Anfang des Anhangs wird vor Teil A folgender Hinweis eingefügt:

„Hinweis:

Wenn eine der folgenden Methoden zur Prüfung eines Gemischs verwendet werden soll und die Anwendbarkeit einer Methode zur Prüfung von Gemischen nicht klar beschrieben wurde, ist vor Verwendung der Methode zu prüfen, ob die Prüfmethode zur Ermittlung von wissenschaftlich fundierten und für den vorgesehenen aufsichtsrechtlichen Zweck maßgeblichen Ergebnissen geeignet ist. Wenn die Methode zur Prüfung eines Gemischs verwendet wird, sind in größtmöglichem Umfang hinreichende Informationen zur Zusammensetzung des Gemischs bereitzustellen (z. B. zur chemischen Zusammensetzung, zu den jeweiligen Mengenanteilen und zu ihren jeweiligen spezifischen Merkmalen).“

- (2) Kapitel A.24 wird angefügt:

**„A.24. Verteilungskoeffizient (n-Octanol/Wasser),
Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC-Methode)**

EINLEITUNG

Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 117 (2004).

1. Als Verteilungskoeffizient (P) bezeichnet man das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen (c_i) eines gelösten Stoffs in einem Zweiphasensystem aus zwei weitgehend unmischbaren Lösungsmitteln. Für n-Octanol und Wasser gilt:

$$P_{ow} = \frac{C_{n-Octanol}}{C_{Wasser}}$$

Der Verteilungskoeffizient (P) ist der Quotient zweier Konzentrationen. Er wird ohne Maßeinheit gewöhnlich in Form seines Zehnerlogarithmus angegeben.

2. Der P_{ow} -Wert ist ein Schlüsselparameter in Studien zur Persistenz chemischer Stoffe in der Umwelt. Eine hoch signifikante Beziehung zwischen dem P_{ow} -Wert nicht ionisierter Stoffe und ihrer Bioakkumulation in Fischen wurde nachgewiesen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der P_{ow} -Wert ein hilfreicher Parameter zur Prognose der Adsorption im Boden und in Sedimenten und zur Feststellung quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei vielfältigen biologischen Wirkungen ist.

3. Der ursprüngliche Vorschlag für diese Prüfmethode beruhte auf einem Artikel von C. V. Eadsforth und P. Moser (1). 1986 hat das deutsche Umweltbundesamt die Entwicklung der Prüfmethode und einen OECD-Ringversuch koordiniert (2).

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

4. $\log-P_{ow}$ -Werte von -2 bis 4 (gelegentlich bis zu 5 und höher)¹ können experimentell mit der Schüttelmethode bestimmt werden (Kapitel A.8 dieses Anhangs, OECD-Prüfrichtlinie 107). Mit der HPLC-Methode können $\log-P_{ow}$ -Werte von 0 bis 6 ermittelt werden (1)(2)(3)(4)(5). Bei dieser Methode muss unter Umständen der P_{ow} -Wert geschätzt werden, um geeignete Referenzstoffe zuzuordnen und Schlussfolgerungen aus den in der Prüfung generierten Daten ziehen zu können. Die Berechnungsmethoden werden in der Anlage zu dieser Prüfmethode kurz erläutert. Die HPLC wird mit isokratischer Elution durchgeführt.
5. Die P_{ow} -Werte hängen von den Umgebungsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Ionenkonzentration usw.) ab und sollten im Versuch definiert werden, damit die P_{ow} -Daten richtig interpretiert werden können. Für ionisierbare Stoffe könnte in Zukunft eine andere Methode zur Verfügung stehen (z. B. der Entwurf der OECD-Prüfrichtlinie zur pH-Messung ionisierter Stoffe (6)), die als alternative Methode angewandt werden sollte. Nach diesem Entwurf der OECD-Richtlinie kann zwar unter Umständen der P_{ow} -Wert dieser ionisierbaren Stoffe ermittelt werden; manchmal ist jedoch eher die HPLC-Methode bei einem für die jeweiligen Umgebungsbedingungen relevanten pH-Wert zu empfehlen (siehe Nummer 9).

PRINZIP DER METHODE

6. Analysen durch Umkehrphasen-HPLC werden mit Analysensäulen mit handelsüblichen Festphasen durchgeführt, die chemisch an Siliciumdioxid gebundene langkettige Kohlenwasserstoffe (z. B. C8 oder C18) enthalten.
7. Eine in eine solche Säule injizierte Chemikalie partitioniert zwischen der mobilen Lösungsmittelphase und der stationären Kohlenwasserstoffphase, während sie mit der mobilen Phase durch die Säule eluiert wird. Die Stoffe werden proportional entsprechend dem jeweiligen Kohlenwasserstoff/Wasser-Verteilungskoeffizienten abgetrennt; dabei werden zunächst die hydrophilen Stoffe und zuletzt die lipophilen

¹ Eine Obergrenze ist durch die Notwendigkeit einer vollständigen Phasentrennung nach Anpassungen des Verteilungsgleichgewichts und vor der Probenahme für analytische Bestimmungen gegeben. Bei entsprechender Sorgfalt kann die Obergrenze auf höhere P_{ow} -Werte ausgedehnt werden.

Stoffe eluiert. Die Retentionszeit wird als Kapazitätsfaktor k ausgedrückt und mit folgender Formel bestimmt:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Dabei ist t_R die Retentionszeit des Prüfstoffs und t_0 die Totzeit, d. h. die Zeit, die ein Lösungsmittelmolekül durchschnittlich zum Wandern durch die Säule benötigt. Quantitative Analysemethoden sind nicht erforderlich, es müssen lediglich die Elutionszeiten bestimmt werden.

8. Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient eines Prüfstoffs kann berechnet werden, indem der Kapazitätsfaktor k des Prüfstoffs bestimmt und der so ermittelte Faktor k in die folgende Gleichung eingesetzt wird:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

Dabei sind:

a, b = lineare Regressionskoeffizienten.

Die vorstehende Gleichung kann durch lineare Regression des Logarithmus der Octanol-/Wasser-Verteilungskoeffizienten von Referenzstoffen gegen den Logarithmus der Kapazitätsfaktoren der Referenzstoffe ermittelt werden.

9. Durch Umkehrphasen-HPLC können Verteilungskoeffizienten im $\log P_{ow}$ -Bereich von 0 bis 6 bestimmt werden; in Ausnahmefällen sind Berechnungen aber auch im $\log P_{ow}$ -Bereich von 6 bis 10 möglich. Dazu muss unter Umständen allerdings die mobile Phase modifiziert werden (3). Für starke Säuren und Basen sowie für Metallkomplexe, Stoffe, die mit dem Elutionsmittel reagieren, und für grenzflächenaktive Stoffe ist diese Methode nicht geeignet. Messungen an ionisierbaren Stoffen können nur an deren nicht ionisierter Form (freie Säure oder freie Base) durch Verwendung eines geeigneten Puffers mit einem pH-Wert unter (freie Säure) bzw. über (freie Base) dem pK_a -Wert durchgeführt werden. Alternativ könnte in Zukunft eine pH-Messmethode zur Prüfung ionisierbarer Stoffe zur Verfügung stehen, die als Alternativmethode (6) angewendet werden könnte. Wenn der $\log P_{ow}$ -Wert für eine Einstufung oder eine Bewertung des Umweltrisikos ermittelt wird, ist die Prüfung bei einem für die jeweilige natürliche Umgebung typischen pH-Bereich vorzunehmen (d. h. im pH-Bereich von 5,0 bis 9).
10. Manchmal können Verunreinigungen die Interpretation der Ergebnisse erschweren, weil die Zuordnung der Peaks nicht eindeutig ist. Für Gemische, die ein nicht aufgelöstes Band ergeben, sollten jeweils die obere und die untere Grenze des $\log P_{ow}$ -Peaks und die prozentuale Fläche jedes $\log P_{ow}$ -Peaks angegeben werden. Für Gemische, die aus einer Gruppe von Homologen bestehen, sollte auch der gewichtete durchschnittliche $\log P_{ow}$ -

Wert angegeben werden (7); dieser ist ausgehend von den einzelnen P_{ow} -Werten und den entsprechenden prozentualen Flächen zu berechnen (8). Alle Peaks, die mit einer Fläche von mindestens 5 % zur gesamten Peak-Fläche beitragen, sind in der Berechnung zu berücksichtigen (9):

$$\text{gew. Durchschn. } \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\text{Fläche } \%)}{\text{Gesamtpeakfläche } \%} = \frac{\sum (\log P_{owi})(\text{Fläche } \%_i)}{\sum_i \text{Fläche } \%}$$

Der gewichtete durchschnittliche $\log P_{ow}$ -Wert gilt nur für aus Homologen (z. B. einer Reihe von Alkanen) bestehende Stoffe oder Gemische (z. B. für Tallöle). Die Messung von Gemischen kann zu aussagekräftigen Ergebnissen führen, wenn die Empfindlichkeit des verwendeten analytischen Detektors bei allen in dem Gemisch enthaltenen Stoffen gleich ist und eine angemessene Auflösung erreicht werden kann.

INFORMATIONEN ZUM PRÜFSTOFF

11. Die Dissoziationskonstante, die Strukturformel und die Löslichkeit in der mobilen Phase sollten bekannt sein, bevor diese Methode verwendet wird. Außerdem sind Informationen zur Hydrolyse hilfreich.

QUALITÄTSKRITERIEN

12. Um die Zuverlässigkeit der Messung zu erhöhen, sind Doppelbestimmungen durchzuführen.
 - Wiederholbarkeit: Der aus wiederholten Messungen unter identischen Bedingungen und mit derselben Gruppe von Referenzstoffen ermittelte $\log P_{ow}$ -Wert sollte im Bereich von $\pm 0,1$ log-Einheiten liegen.
 - Reproduzierbarkeit: Wenn die Messungen mit einer anderen Reihe von Referenzstoffen wiederholt werden, können andere Ergebnisse ermittelt werden. In der Regel liegt der Korrelationskoeffizient R der Beziehung zwischen $\log k$ und $\log P_{ow}$ bei einer Reihe von Prüfstoffen etwa bei 0,9; dies entspricht einem Octanol-/Wasser-Verteilungskoeffizienten von $\log P_{ow} \pm 0,5$ log-Einheiten.
13. Der Ringversuch hat gezeigt, dass mit der HPLC-Methode $\log P_{ow}$ -Werte im Bereich von $\pm 0,5$ Einheiten der mit der Schüttelmethode bestimmten Werte ermittelt werden können (2). Weitere Vergleiche sind der Literatur zu entnehmen (4)(5)(10)(11)(12). Die höchste Genauigkeit wird mit Korrelationsdiagrammen strukturverwandter Referenzstoffe erzielt (13).

REFERENZSTOFFE

14. Um den gemessenen Kapazitätsfaktor k eines Stoffs mit seinem P_{ow} zu korrelieren, muss eine Kalibrierkurve mit mindestens sechs Bezugspunkten erstellt werden (siehe Nummer 24). Die Wahl der geeigneten Referenzstoffe obliegt dem Benutzer. Die $\log P_{ow}$ -Werte der Referenzstoffe sollten in der Regel den $\log P_{ow}$ -Wert des Prüfstoffs einschließen; d. h. mindestens ein Referenzstoff sollte einen P_{ow} -Wert über dem des Prüfstoffs und ein anderer einen P_{ow} -Wert unter dem des Prüfstoffs haben. Extrapolationen sollten nur ausnahmsweise vorgenommen werden. Die Referenzstoffe sollten vorzugsweise mit dem Prüfstoff strukturverwandt sein. Die $\log P_{ow}$ -Werte der für die Kalibrierung verwendeten Referenzstoffe müssen auf zuverlässigen Versuchsdaten beruhen. Bei Stoffen mit hohem $\log P_{ow}$ (normalerweise über 4) können berechnete Werte verwendet werden, wenn keine zuverlässigen experimentellen Daten verfügbar sind. Wenn extrapolierte Werte verwendet werden, ist ein Grenzwert anzugeben.
15. Für viele Gruppen von Chemikalien liegen umfangreiche Listen mit $\log P_{ow}$ -Werten vor (14)(15). Wenn keine Daten zu den Verteilungskoeffizienten strukturverwandter Stoffe verfügbar sind, kann eine mit sonstigen Referenzstoffen ermittelte allgemeinere Kalibrierung verwendet werden. In Tabelle 1 sind empfohlene Referenzstoffe und die jeweiligen P_{ow} -Werte zusammengestellt. Bei ionisierbaren Stoffen beziehen sich die angegebenen Werte auf die nicht ionisierte Form. Im Ringversuch wurden die Werte einer Plausibilitäts- und Qualitätsprüfung unterzogen.

Tabelle 1: Empfohlene Referenzstoffe

	CAS- Nummer	Referenzstoff	$\log P_{ow}$	pKa
1	78-93-3	2-Butanon (Methylethylketon)	0,3	
2	1122-54-9	4-Acetylpyridin	0,5	
3	62-53-3	Anilin	0,9	
4	103-84-4	Acetanilid	1,0	
5	100-51-6	Benzylalkohol	1,1	
6	150-76-5	4-Methoxyphenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Phenoxyessigsäure	1,4	pKa = 3,12
8	108-95-2	Phenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-Dinitrophenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitril	1,6	
11	140-29-4	Phenylacetonitril	1,6	

12	589-18-4	4-Methylbenzylalkohol	1,6	
13	98-86-2	Acetophenon	1,7	
14	88-75-5	2-Nitrophenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-Nitrobenzoesäure	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-Chloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzol	1,9	
18	104-54-1	Zinnamylalkohol (Zimtalkohol)	1,9	
19	65-85-0	Benzoessäure	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-Cresol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Zimtsäure	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anisol	2,1	
23	93-58-3	Methylbenzoat	2,1	
24	71-43-2	Benzol	2,1	
25	99-04-7	3-Methylbenzoesäure	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-Chlorphenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trichlorethylen	2,4	
28	1912-24-9	Atrazin	2,6	
29	93-89-0	Ethylbenzoat	2,6	
30	1194-65-6	2,6-Dichlorbenzonnitril	2,6	
31	535-80-8	3-Chlorbenzoesäure	2,7	pKa = 3,82
32	108-88-3	Toluol	2,7	
33	90-15-3	1-Naphthol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Dichloranilin	2,8	
35	108-90-7	Chlorbenzol	2,8	
36	1746-13-0	Allyl-Phenylether	2,9	
37	108-86-1	Brombenzol	3,0	
38	100-41-4	Ethylbenzol	3,2	
39	119-61-9	Benzophenon	3,2	
40	92-69-3	4-Phenylphenol	3,2	pKa = 9,54

41	89-83-8	Thymol	3,3	
42	106-46-7	1,4-Dichlorbenzol	3,4	
43	122-39-4	Diphenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naphthalin	3,6	
45	93-99-2	Phenylbenzoat	3,6	
46	98-82-8	Isopropylbenzol	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-Trichlorphenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Biphenyl	4,0	
49	120-51-4	Benzylbenzoat	4,0	
50	88-85-7	2,4-Dinitro-6-sec-butylphenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-Trichlorbenzol	4,2	
52	143-07-7	Dodecansäure	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Diphenylether	4,2	
54	85-01-8	Phenanthren	4,5	
55	104-51-8	n-Butylbenzol	4,6	
56	103-29-7	Dibenzyl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-Diphenylpyridin	4,9	
58	206-44-0	Fluoranthren	5,1	
59	603-34-9	Triphenylamin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

BESCHREIBUNG DER METHODE

Vorabschätzung des Verteilungskoeffizienten

16. Erforderlichenfalls kann der Verteilungskoeffizient des Prüfstoﬀs geschätzt werden; die Schätzung sollte vorzugsweise mit einer Berechnungsmethode (siehe Anlage) bzw. gegebenenfalls auch aufgrund des Verhältnisses der Löslichkeit des Prüfstoﬀs in den reinen Lösungsmitteln erfolgen.

Gerät

17. Benötigt werden ein Flüssigphasenchromatograph mit einer Pumpe mit niedriger Förderleistung und ein geeignetes Detektionssystem. Angesichts der Vielzahl

chemischer Gruppen kommen ein UV-Detektor mit einer Wellenlänge von 210 nm oder ein RI-Detektor in Betracht. Die Leistung der HPLC-Säule kann durch polare Gruppen in der stationären Phase erheblich beeinträchtigt werden. Deshalb sollten die stationären Phasen so wenig polare Gruppen wie möglich enthalten (16). Es können handelsübliche Mikroteilchenfüllungen für die Umkehrphasenchromatografie oder Fertigsäulen verwendet werden. Zwischen das Dosiersystem und die Analysensäule kann eine Vorsäule gesetzt werden.

Mobile Phase

18. Zur Zubereitung des Elutionsmittels werden für die HPLC-Methode ausreichend reines Methanol und destilliertes oder entionisiertes Wasser verwendet; das Elutionsmittel wird vor seiner Verwendung entgast. Es ist das Verfahren der isokratischen Elution anzuwenden. Dabei werden Methanol-Wasser-Verhältnisse mit einem Wassergehalt von mindestens 25 % empfohlen. Im Normalfall ist eine Methanol-Wasser-Mischung im Volumenverhältnis 3:1 für die Eluierung von Verbindungen mit einem log-P-Wert von 6 bei einer Elutionszeit von einer Stunde und einer Durchflussrate von 1 ml/min ausreichend. Für Verbindungen mit einem log-P-Wert von über 6 kann eine Verkürzung der Elutionszeit (auch der der Referenzstoffe) durch Senkung der Polarität der mobilen Phase oder Kürzung der Säulenlänge erforderlich sein.
19. Der Prüfstoff und die Referenzstoffe müssen in der mobilen Phase in ausreichender Konzentration lösbar sein, um nachgewiesen werden zu können. Nur in Ausnahmefällen dürfen in der Methanol-Wasser-Mischung Zusatzstoffe verwendet werden, da diese die Eigenschaften der Säule verändern. In diesen Fällen muss sichergestellt werden, dass keine Auswirkungen auf die Retentionszeit der Prüfstoffe und der Referenzstoffe gegeben sind. Wenn die Methanol-Wasser-Mischung ungeeignet ist, können andere Mischungen aus einem organischen Lösungsmittel und Wasser verwendet werden, beispielsweise Ethanol-Wasser, Acetonitril-Wasser oder 2-Propanol-Wasser.
20. Der pH-Wert des Lösungsmittels ist für ionisierbare Stoffe kritisch. Er sollte innerhalb des pH-Bereichs der Säule liegen, der sich im Allgemeinen zwischen 2 und 8 bewegt. Die Anwendung eines Puffers ist zu empfehlen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass kein Salz ausfällt und es nicht zur Beschädigung der Säule kommt, was bei einer Reihe von Mischungen von organischer Phase und Puffer möglich ist. HPLC-Messungen mit einer an Siliciumdioxid gebundenen stationären Phase und einem pH-Wert über 8 sind nicht empfehlenswert, da die Leistung der Säule bei Verwendung einer alkalischen mobilen Phase rapide nachlassen kann.

Gelöste Stoffe

21. Der Prüfstoff und die Referenzstoffe müssen ausreichend rein sein, um die Peaks der Chromatogramme den jeweiligen Stoffen zuordnen zu können. Die für Prüf- oder Kalibrierungszwecke verwendeten Stoffe werden möglichst in der mobilen Phase gelöst. Wird für die Lösung des Prüfstoffs und der Referenzstoffe ein anderes Lösungsmittel als

die mobile Phase verwendet, so ist die mobile Phase für die letzte Verdünnung vor der Injektion zu verwenden.

Prüfbedingungen

22. Die Temperatur darf während der Messungen um höchstens ± 1 °C schwanken.

Bestimmung der Totzeit t_0

23. Die Totzeit t_0 lässt sich durch Verwendung nicht chromatografisch verzögerter organischer Verbindungen (z. B. Thioharnstoff oder Formamid) bestimmen. Ein genauerer Wert für die Totzeit ergibt sich aus den gemessenen Retentionszeiten oder aus etwa sieben Komponenten einer homologen Reihe (z. B. n-Alkyl-Methyl-Ketone) (17). Die Retentionszeiten $t_R(n_C+1)$ werden gegen $t_R(n_C)$ aufgetragen; n_C ist die Anzahl der Kohlenstoffatome. Es ergibt sich eine Gerade, $t_R(n_C+1) = A t_R(n_C) + (1-A)t_0$; A ergibt sich aus $k(n_C+1)/k(n_C)$ und ist konstant. Die Totzeit t_0 wird aus dem Schnittpunkt $(1-A)t_0$ und der Steigung A bestimmt.

Regressionsgleichung

24. Der nächste Schritt besteht in der Erstellung einer Korrelationskurve $\log k/\log P$ für geeignete Referenzstoffe mit $\log P$ -Werten etwa im Bereich des für den Prüfstoff zu erwartenden Wertes. In der Praxis werden dazu 6 bis 10 Referenzstoffe gleichzeitig eingespritzt. Die Retentionszeiten werden am besten mithilfe eines mit dem Detektionssystem gekoppelten registrierenden Integrators bestimmt. Die Logarithmen der entsprechenden Kapazitätsfaktoren ($\log k$) werden als Funktion von $\log P$ aufgezeichnet. Die Regressionsgleichung wird in regelmäßigen Abständen (mindestens einmal täglich) vorgenommen, damit eventuelle Leistungsveränderungen der Säule berücksichtigt werden können.

BESTIMMUNG DES P_{ow} -WERTES DES PRÜFSTOFFS

25. Der Prüfstoff wird in den geringsten noch nachweisbaren Mengen eingespritzt. Die Retentionszeit wird doppelt bestimmt. Der Verteilungskoeffizient des Prüfstoffs kann aus dem berechneten Kapazitätsfaktor auf der Kalibrierkurve interpoliert werden. Bei sehr niedrigen und sehr hohen Verteilungskoeffizienten ist eine Extrapolation erforderlich. In diesen Fällen ist besonders auf die Vertrauensgrenzen der Regressionsgeraden zu achten. Wenn die Retentionszeit der Probe außerhalb des Bereichs der für die Standards ermittelten Retentionszeiten liegt, ist ein Grenzwert anzugeben.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Prüfbericht

26. Der Bericht muss folgende Angaben enthalten:

- wenn bestimmt, die Vorabschätzung des Verteilungskoeffizienten, die geschätzten Werte und die verwendete Methode; wenn eine Berechnungsmethode verwendet wurde, die vollständige Beschreibung der Methode einschließlich der Datenbasis und detaillierter Informationen zur Auswahl von Substrukturen;
- Prüf- und Referenzstoffe: Reinheit, Strukturformel und CAS-Nummer,
- Beschreibung der Ausrüstung und der Betriebsbedingungen: Analysensäule, Vorsäule
- mobile Phase, Detektionsverfahren, Temperaturbereich, pH-Wert;
- Elutionsprofile (Chromatogramme);
- Totzeit und entsprechendes Messverfahren;
- Retentionswerte und P_{ow} -Werte aus der Literatur für zur Kalibrierung verwendete Referenzstoffe;
- nähere Angaben zur Anpassung der Regressionsgeraden ($\log k/\log P_{ow}$) und zum Korrelationskoeffizienten der Geraden einschließlich Konfidenzintervallen;
- durchschnittliche Retentionswerte und interpolierter $\log-P_{ow}$ -Wert für den Prüfstoff;
- bei Mischungen: Elutionsprofil-Chromatogramm mit Abgrenzungswerten;
- $\log-P_{ow}$ -Werte im Verhältnis zur prozentualen Fläche des $\log-P_{ow}$ -Peaks;
- Berechnung mit einer Regressionsgeraden;
- gegebenenfalls berechnete durchschnittliche $\log-P_{ow}$ -Werte.

LITERATUR

- (1) C.V. Eadsforth und P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.
- (2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss und H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. *Chemosphere*. 17, 361.
- (3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. *Pesticide Science*. 17, 311.
- (4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt und R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. *Pesticide Science*. 12, 219.
- (5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. *Chemosphere*. 10, 73.
- (6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals – Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.
- (7) OSPAR (1995). “Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995”, Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20.-24. Februar 1995.
- (8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez und C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.
- (9) E. A. Vik, S. Bakke und K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. *Environmental Modelling & Software* Vol. 13, S. 529-537.
- (10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem und K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. *Chemosphere*. 9, 683.

- (11) W.E. Hammers, G.J. Meurs und C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. *J. Chromatography* 247, 1.
- (12) J.E. Haky und A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. *J. Liq. Chromatography*. 7, 675.
- (13) S. Fujisawa und E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Biomedical Materials Research*. 15, 787.
- (14) C. Hansch und A. J. Leo. (1979). *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. John Willey, New York.
- (15) C. Hansch, Vorsitz; A. J. Leo, Dir. (1982). *Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity* - Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.
- (16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther.* 14, 479.
- (17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, und J. Inczedy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromato.* 3, 1669.

Anlage

METHODEN ZUR BERECHNUNG VON P_{ow} -WERTEN

EINLEITUNG

1. Diese Anlage enthält eine kurze Einführung in die Berechnung von P_{ow}-Werten. Weitere Informationen sind der Literatur zu entnehmen (1)(2).
2. Die berechneten P_{ow}-Werte werden zu folgenden Zwecken verwendet:
 - Auswahl der anzuwendenden Versuchsmethode: Schüttelmethode bei log P_{ow} zwischen -2 und 4 und HPLC-Methode bei log P_{ow} zwischen 0 und 6;
 - Festlegung der Bedingungen der HPLC (Referenzstoffe, Methanol-Wasser-Verhältnis);
 - Plausibilitätsprüfung der durch Versuchsverfahren ermittelten Werte;
 - Abgabe einer Einschätzung, wenn Versuchsverfahren nicht verwendet werden können.

Prinzip der Berechnungsverfahren

3. Die hier vorgeschlagenen Berechnungsverfahren beruhen auf der theoretischen Aufspaltung des Moleküls in geeignete Substrukturen, für die zuverlässige log-P_{ow}-Inkrementen bekannt sind. Der log-P_{ow}-Wert wird als Summe seiner entsprechenden Teilwerte und der Korrekturglieder für intramolekulare Wechselwirkungen berechnet. Aufstellungen über Konstanten von Substrukturen und Korrekturglieder liegen vor (1)(2)(3)(4)(5)(6). Einige davon werden regelmäßig aktualisiert (3).

Zuverlässigkeit berechneter Werte

4. Im Allgemeinen nimmt die Zuverlässigkeit der Berechnungsverfahren in dem Maße ab, in dem die Komplexität des Prüfstoffs zunimmt. Bei einfachen Stoffen mit niedrigem Molekulargewicht und einer oder zwei funktionellen Gruppen ist mit einer Abweichung von 0,1 bis 0,3 log-P_{ow}-Einheiten von den Ergebnissen der verschiedenen Fragmentmethoden gegenüber den Messwerten zu rechnen. Die Fehlerspanne hängt von der Zuverlässigkeit der verwendeten Konstanten für die Substrukturen, der Fähigkeit der Erkennung intramolekularer Wechselwirkungen (z. B. Wasserstoffbindungen) und der richtigen Anwendung der Korrekturglieder ab. Bei ionisierbaren Stoffen ist die richtige Berücksichtigung der Ladung und des Ionisierungsgrades wichtig (10).

Fujita-Hansch'sche π -Methode

5. Die ursprünglich von Fujita et al. (7) für hydrophobe Substituenten eingeführte Konstante π wird wie folgt definiert:

$$\pi_X = \log P_{ow}(\text{PhX}) - \log P_{ow}(\text{PhH})$$

wobei PhX ein aromatischer Abkömmling und PhH der Ausgangsstoff ist.

$$\begin{aligned}\pi\text{Cl} &= \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_6) \\ &= 2,84 - 2,13 \\ &= 0,71\end{aligned}$$

Die π -Methode ist vorwiegend bei aromatischen Stoffen von Bedeutung. π -Werte liegen für zahlreiche Substituenten vor (4)(5).

Rekker-Methode

6. Mit der Rekker-Methode (8) wird $\log P_{ow}$ wie folgt berechnet:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{Glieder f. d. Wechselwirkungen})$$

wobei a_i für die Häufigkeit steht, mit der eine bestimmte Substruktur im Molekül vorkommt, und f_i das $\log P_{ow}$ -Inkrement der Substruktur ist. Die Glieder für die Wechselwirkungen lassen sich als ein ganzes Vielfaches einer einzigen Konstante C_m (der so genannten magischen Konstante) angeben. Die Substrukturkonstanten f_i und C_m wurden aus einer Liste von 1054 experimentell ermittelten P_{ow} -Werten (825 Verbindungen) mithilfe der mehrfachen Regressionsanalyse bestimmt (6)(8). Die Bestimmung der Glieder für die Wechselwirkungen erfolgt nach den in der Literatur angegebenen Regeln (6)(8)(9).

Hansch-Leo-Methode

7. Nach Hansch und Leo (4) wird der $\log P_{ow}$ -Wert wie folgt berechnet:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

wobei f_i eine Substrukturkonstante und F_j ein Korrekturglied („Faktor“) ist und a_i und b_j für die entsprechende Häufigkeit des Vorkommens stehen. Listen der Substrukturwerte für einzelne Atome und Gruppen und für Korrekturglieder F_j wurden durch die Trial-and-Error-Methode aus experimentell bestimmten P_{ow} -Werten abgeleitet. Die Korrekturglieder sind in unterschiedliche Kategorien eingeordnet worden (1)(4). Um sämtliche Regeln und Korrekturglieder zu berücksichtigen, wurden geeignete Software-Pakete entwickelt (3).

KOMBINIERTE METHODE

8. Die Berechnung der $\log P_{ow}$ -Werte komplexer Moleküle kann beträchtlich verbessert werden, wenn das Molekül in größere Substrukturen zerlegt wird, für die zuverlässige $\log P_{ow}$ -Werte vorliegen, sei es aus Tabellen (3) (4), sei es aus eigenen

Messungen. Solche Substrukturen (z. B. Heterocyclen, Anthrachinon, Azobenzol) können dann mit den Hansch'schen π -Werten oder mit den Substrukturkonstanten nach Rekker oder Leo kombiniert werden.

Bemerkungen

- i) Die Berechnungsmethoden können auf teilweise oder vollständig ionisierte Stoffe nur dann angewendet werden, wenn die erforderlichen Korrekturfaktoren berücksichtigt werden.
- ii) Wenn von intramolekularen Wasserstoffbindungen ausgegangen werden kann, müssen die entsprechenden Korrekturglieder (etwa +0,6 bis +1,0 log- P_{ow} -Einheiten) addiert werden (1). Hinweise auf das Vorliegen solcher Bindungen sind Stereo-Modellen oder spektroskopischen Daten des Stoffs zu entnehmen.
- iii) Wenn mehrere tautomere Formen möglich sind, ist die wahrscheinlichste Form als Berechnungsgrundlage anzunehmen.
- iv) Die Überarbeitungen der Listen der Substrukturkonstanten sind sorgfältig zu verfolgen.

LITERATUR ZU BERECHNUNGSMETHODEN

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl und D.H. Rosenblatt (Hrsg.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).
- (2) W.J. Dunn, J.H. Block und R.S. Pearlman (Hrsg.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) und Oxford (1986).
- (3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (4) C. Hansch und A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).
- (5) Leo, C. Hansch und D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews*. 71, 525.
- (6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther.* 14, 479.
- (7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5175.
- (8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochimistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).
- (9) C.V. Eadsforth und P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.
- (10) R.A. Scherrer. ACS - Symposium Series 255, S. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).“

(3) Kapitel C.3 erhält folgende Fassung:

„C.3. Süßwasseralgen und Cyanobakterien: Wachstumsinhibitionstest

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 201 (2006, Anhang korrigiert im Jahr 2011). Es wurde festgestellt, dass die Prüfmethode auf weitere Arten ausgeweitet und an die Anforderungen an die Risikobewertung und die Klassifizierung chemischer Stoffe angepasst werden muss. Die Überarbeitung wurde auf der Grundlage umfassender praktischer Erfahrungen sowie des wissenschaftlichen Fortschritts im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Algentoxizität und der weit reichenden Anwendung entsprechender Rechtsvorschriften seit Annahme der ursprünglichen Fassung vorgenommen.
2. Definitionen der verwendeten Begriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

3. Mit dieser Prüfung soll die Wirkung einer Chemikalie auf das Wachstum von Süßwasser-Mikroalgen und/oder Cyanobakterien bestimmt werden. Exponentiell wachsende Testorganismen werden in Batch-Kulturen über einen Zeitraum von im Allgemeinen 72 Stunden der Prüfchemikalie ausgesetzt. Trotz der verhältnismäßig kurzen Testdauer können Auswirkungen über mehrere Generationen beurteilt werden.
4. Die Systemreaktion besteht in der Verringerung des Wachstums einer Reihe von Algenkulturen (Versuchseinheiten), die einer Prüfchemikalie in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt wurden. Diese Reaktion wird in Abhängigkeit von der Expositionskonzentration gegenüber dem durchschnittlichen Wachstum in der Chemikalie nicht ausgesetzten Replikatkontrollkulturen bewertet. Um die Systemreaktion auf toxische Auswirkungen (optimale Empfindlichkeit) umfassend beschreiben zu können, wird ein unbegrenztes exponentielles Wachstum der Kulturen bei hinreichender Ernährung und kontinuierlicher Beleuchtung über einen ausreichenden Zeitraum ermöglicht, damit anschließend die Verringerung der spezifischen Wachstumsrate gemessen werden kann.
5. Wachstum und Wachstumshemmung werden durch zeitabhängige Messung der Biomasse der Algen bestimmt. Die Biomasse der Algen wird als Trockenmasse pro Volumen ausgedrückt (z. B. in mg Algen/Liter Testlösung). Die Trockenmasse ist jedoch schwer zu messen; daher werden Surrogatparameter verwendet. Häufigster Surrogatparameter ist der Zellgehalt. Weitere Surrogatparameter sind das Zellvolumen, die Fluoreszenz, die optische Dichte usw. Ein Faktor für die Umrechnung zwischen dem gemessenen Surrogatparameter und der Biomasse sollte bekannt sein.
6. Der Endpunkt des Tests ist die Wachstumshemmung, ausgedrückt als

logarithmische Zunahme der Biomasse (durchschnittliche spezifische Wachstumsrate) während der Expositionsdauer. Aus den in einer Reihe von Testlösungen erfassten durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten wird die Konzentration bestimmt, bei der sich eine spezifizierte Hemmung der Wachstumsrate von x % (z. B. 50 %) ergibt; diese Konzentration wird als E_rC_x bezeichnet (z. B. E_rC_{50}).

7. Eine weitere Reaktionsvariable bei dieser Prüfmethode ist der Zellertrag. Diese Variable kann erforderlich sein, damit länderspezifische Regulierungsanforderungen erfüllt werden. Der Zellertrag wird definiert als Biomasse am Ende der Expositionsdauer abzüglich der Biomasse zu Beginn der Expositionsdauer. Aus dem in einer Reihe von Testlösungen erfassten Zellertrag wird die Konzentration berechnet, die eine spezifizierte Hemmung des Zellertrags (z. B. um 50 %) hervorruft; diese Konzentration wird als E_yC_x angegeben (z. B. E_yC_{50}).
8. Außerdem können die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC) und die höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete Wirkung (NOEC) statistisch bestimmt werden.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

9. Informationen zur Prüfchemikalie, die bei der Bestimmung der Prüfbedingungen hilfreich sein könnten, sind z. B. die Strukturformel, die Reinheit, die Lichtbeständigkeit, die Beständigkeit unter den Prüfbedingungen, das Lichtabsorptionsverhalten, pKa und die Ergebnisse von Transformationsstudien (u. a. die Ergebnisse von Studien zur biologischen Abbaubarkeit in Wasser).
10. Die Wasserlöslichkeit, der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (P_{ow}) und der Dampfdruck der Prüfchemikalie sollten bekannt sein, und eine validierte Methode zur Quantifizierung der Chemikalie in den Testlösungen mit bekannten Wiederfindungsraten und mit bekannter Nachweisgrenze sollte verfügbar sein.

VALIDITÄT DES TESTS

11. Damit ein Test als gültig gewertet werden kann, müssen die folgenden Kriterien erfüllt sein:
 - Die Biomasse der Kontrollkulturen muss binnen der 72-stündigen-Testdauer exponentiell um einen Faktor von mindestens 16 gewachsen sein. Dieses Wachstum entspricht einer spezifischen Wachstumsrate von $0,92 \text{ d}^{-1}$. Bei den am häufigsten verwendeten Arten ist die Wachstumsrate im Allgemeinen erheblich größer (siehe Anlage 2). Dieses Kriterium wird unter Umständen nicht erfüllt, wenn Arten verwendet werden, die langsamer wachsen als die in Anlage 2 genannten Arten. In diesem Fall sollte die Testdauer so verlängert werden, dass ein mindestens 16faches Wachstum der Kontrollkulturen gewährleistet ist; dabei muss das Wachstum während der gesamten Testdauer exponentiell erfolgen. Die

Testdauer kann bis auf eine Mindestdauer von 48 Stunden verkürzt werden, um während des Tests ein unbegrenztes exponentielles Wachstum aufrechtzuerhalten; Voraussetzung ist jedoch, dass ein Mindestmultiplikationsfaktor von 16 erreicht wird.

- Der mittlere Variationskoeffizient der abschnittsbezogenen spezifischen Wachstumsraten (Tage 0-1, 1-2 und 2-3 bei 72-stündigen Tests) der Kontrollkulturen (siehe Anlage 1 unter „Variationskoeffizient“) darf maximal 35 % betragen. Zur Berechnung der abschnittsbezogenen spezifischen Wachstumsrate sind die Hinweise unter Nummer 49 zu beachten. Dieses Kriterium gilt für den Mittelwert des Variationskoeffizienten, der für Replikatkontrollkulturen berechnet wurde.
- Der Variationskoeffizient der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten während der gesamten Testdauer darf bei den Replikatkontrollkulturen in Tests mit *Pseudokirchneriella subcapitata* und *Desmodesmus subspicatus* höchstens 7 % betragen. Bei weniger häufig in Tests verwendeten Arten sollte der Wert höchstens 10 % betragen.

REFERENZCHEMIKALIEN

12. Um das Prüfverfahren zu testen, können Referenzchemikalien wie z. B. das im internationalen Ringtest (1) verwendete 3,5-Dichlorphenol geprüft werden. Für Grünalgen kann auch Kaliumdichromat als Referenzchemikalie verwendet werden. Nach Möglichkeit sollten Referenzchemikalien mindestens zweimal jährlich getestet werden.

ANWENDBARKEIT DES TESTS

13. Diese Prüfmethode ist am einfachsten bei wasserlöslichen Chemikalien anzuwenden, die unter den Prüfbedingungen voraussichtlich im Wasser gelöst bleiben. Zum Prüfen von flüchtigen, stark adsorbierenden, farbigen und schlecht in Wasser löslichen Chemikalien sowie von Chemikalien, die sich auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen oder Mineralien im Prüfmedium auswirken können, sind am beschriebenen Verfahren unter Umständen gewisse Änderungen vorzunehmen (z. B. die Herstellung eines geschlossenen Systems oder eine besondere Vorbereitung der Prüfgefäße). Hinweise zu verschiedenen Änderungen sind den Quellen (2), (3) und (4) zu entnehmen.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Apparatur

14. Prüfgefäße und sonstige Apparaturen, die mit den Testlösungen in Berührung kommen, müssen vollständig aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Material bestehen. Die Komponenten sollten gründlich gespült werden, um sicherzustellen, dass keine organischen oder anorganischen Verunreinigungen das Algenwachstum oder die Zusammensetzung der Testlösungen beeinträchtigen

können.

15. Als Prüfgefäße kommen im Allgemeinen Glaskolben mit Abmessungen in Betracht, die während des Tests ein hinreichendes Kulturvolumen und einen hinreichenden CO₂-Transfer aus der Umgebungsluft gewährleisten (siehe Nummer 30). Das Flüssigkeitsvolumen muss für analytische Bestimmungen hinreichend sein (siehe Nummer 37).
16. Außerdem werden unter Umständen die folgenden Geräte benötigt.
 - Kulturapparatur: Empfohlen werden ein Schrank oder eine Kammer, in dem bzw. in der die gewählte Inkubationstemperatur mit einer Toleranz von ± 2 °C aufrechterhalten werden kann.
 - Lichtmessgeräte: Bei den Tests ist die Methode zur Messung der Lichtintensität zu protokollieren; insbesondere ist der für den Messwert maßgebliche Messkopftyp (Sensor) anzugeben. Die Messungen sollten vorzugsweise mit einem kugelförmigen (4- π)-Messkopf (der unmittelbar reagiert und Licht aus allen Winkeln über und unter der Messebene reflektiert) oder mit einem (2- π)-Messkopf gemessen werden (der auf Licht aus beliebigen Winkeln oberhalb der Geräteebene reagiert).
 - Apparatur zur Bestimmung der Biomasse der Algen: Der Zellgehalt als am häufigsten verwendeter Surrogatparameter für die Biomasse von Algen kann mit einem elektronischen Teilchenzähler, mit einem Mikroskop mit Zählkammer und mit einem Durchflusszytometer ermittelt werden. Weitere Surrogate für Biomassen können mit einem Durchflusszytometer, einem Fluorimeter, einem Spektrophotometer oder einem Farbmessgerät gemessen werden. Ein Umrechnungsfaktor, mit dem der Zellgehalt zur Trockenmasse in Beziehung gesetzt wird, kann Berechnungen erleichtern. Um mit einem Spektrophotometer verwertbare Messungen bei geringen Biomassekonzentrationen durchführen zu können, müssen unter Umständen Küvetten mit einem Strahlengang von mindestens 4 cm verwendet werden.

Testorganismen

17. Für die Tests können mehrere Arten frei treibender Mikroalgen und Cyanobakterien verwendet werden. Die in Anlage 2 genannten Stämme haben sich für das in dieser Prüfmethode beschriebene Verfahren als geeignet erwiesen.
18. Wenn andere Arten verwendet werden, sollten der betreffende Stamm und/oder die Herkunft angegeben werden. Außerdem ist sicherzustellen, dass das exponentielle Wachstum der ausgewählten Testalgen während der gesamten Testdauer unter den jeweiligen Bedingungen aufrechterhalten werden kann.

Nährmedium

19. Als Nährmedien werden wahlweise das OECD-Medium oder das AAP-Medium empfohlen. Die Zusammensetzungen dieser Medien sind Anlage 3 zu entnehmen. Beide Medien haben unterschiedliche pH-Ausgangswerte und unterschiedliche Pufferkapazitäten (zur Regulierung des pH-Anstiegs). Daher können die

Testergebnisse je nach verwendetem Medium unterschiedlich ausfallen; dies gilt insbesondere für die Prüfung ionisierender Chemikalien.

20. Für bestimmte Zwecke muss unter Umständen das Nährmedium modifiziert werden (z. B. für die Prüfung von Metallen und Chelatbildnern oder für Prüfungen bei unterschiedlichen pH-Werten). Die Verwendung modifizierter Nährmedien ist im Einzelnen zu erläutern und zu begründen (3)(4).

Biomasse-Ausgangskonzentration

21. Die Ausgangsbiomasse der Prüfkulturen muss bei allen Prüfkulturen identisch und so gering sein, dass während der Inkubationsdauer ein exponentielles Wachstum erzielt werden kann, ohne eine Erschöpfung des Nährmediums befürchten zu müssen. Die Ausgangsbiomasse sollte höchstens 0,5 mg/l Trockenmasse betragen. Folgende Ausgangs-Zellkonzentrationen werden empfohlen:

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> :	$5 \times 10^3 - 10^4$ Zellen/ml
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	$2-5 \times 10^3$ Zellen/ml
<i>Navicula pelliculosa</i>	10^4 Zellen/ml
<i>Anabaena flos-aquae</i>	10^4 Zellen/ml
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	$5 \times 10^4 - 10^5$ Zellen/ml

Konzentrationen der Prüfchemikalie

22. Der Konzentrationsbereich, in dem wahrscheinlich Auswirkungen auftreten, kann durch Tests zur Bestimmung des Konzentrationsbereichs ermittelt werden. Für den definitiven Test sind mindestens fünf Konzentrationen in einer geometrischen Reihe mit einem Faktor von höchstens 3,2 auszuwählen. Bei Prüfchemikalien mit einer flacheren Konzentrations-Wirkungskurve kann ein höherer Faktor gerechtfertigt sein. Die Konzentrationsreihen sollten vorzugsweise einen Bereich abdecken, in dem das Algenwachstum um 5-75 % gehemmt wird.

Replikate und Kontrollen

23. Das Prüfprotokoll muss für jede Testkonzentration drei Replikate vorsehen. Wenn die NOEC nicht bestimmt werden muss, kann das Prüfprotokoll dahingehend geändert werden, dass die Anzahl der Konzentrationen erhöht und die Anzahl der Replikate verringert wird. Es müssen mindestens drei Kontrollreplikate durchgeführt werden, im Idealfall die doppelte Anzahl der Replikate für jede Testkonzentration.
24. Für analytische Bestimmungen der Prüfchemikalienkonzentrationen kann eine eigene Reihe von Testlösungen hergestellt werden (siehe Nummern 36 und 38).
25. Wenn zur Auflösung der Prüfchemikalie ein Lösungsmittel verwendet wird, sind in das Prüfprotokoll weitere Kontrollen mit dem Lösungsmittel in der Konzentration einzubeziehen, die auch in den Prüfkulturen verwendet wird.

Herstellung der Impfkultur

26. Um eine Anpassung der Testalgen an die Testbedingungen zu ermöglichen und um sicherzustellen, dass sich die Algen in der Phase des exponentiellen Wachstums befinden, wenn sie zur Impfung der Testlösungen verwendet werden, wird 2-4 Tage vor Testbeginn im Prüfmedium eine Impfkultur hergestellt. Die Algenbiomasse ist so anzupassen, dass die Impfkultur bis zum Testbeginn exponentiell wachsen kann. Die Impfkultur ist unter den gleichen Bedingungen wie die Prüfkulturen zu inkubieren. Die Zunahme der Biomasse der Impfkultur ist zu messen, um sicherzustellen, dass das Wachstum unter den gegebenen Kulturbedingungen für den jeweiligen Teststamm im normalen Bereich liegt. In Anlage 4 wird ein Beispiel für ein Verfahren zur Herstellung einer Algenkultur beschrieben. Um gleichzeitige Zellteilungen während des Tests zu vermeiden, kann unter Umständen ein zweiter Schritt zur Vermehrung der Impfkultur erforderlich sein.

Herstellung der Testlösungen

27. Alle Testlösungen müssen das Nährmedium und die Ausgangsbiomasse der Testalgen in denselben Konzentrationen enthalten. Die Testlösungen in den ausgewählten Konzentrationen werden gewöhnlich durch Mischen einer Stammlösung der Prüfchemikalie mit dem Nährmedium und der Impfkultur hergestellt. Stammlösungen werden im Allgemeinen durch Auflösung der betreffenden Chemikalie im Prüfmedium hergestellt.
28. Wenn Chemikalien mit geringer Wasserlöslichkeit zum Prüfmedium hinzugegeben werden sollen, können Lösungsmittel (z. B. Aceton, t-Butyl-Alkohol und Dimethylformamid) als Träger verwendet werden (2)(3). Die Lösungsmittelkonzentration sollte höchstens 100 µl/l betragen, und für alle Kulturen der Testreihen (einschließlich der Kontrollkulturen) ist die gleiche Konzentration zu verwenden.

Inkubation

29. Die Prüfgefäße sind mit luftdurchlässigen Stopfen zu versehen. Anschließend werden die Gefäße geschüttelt und in die Kulturapparatur gebracht. Während des Tests müssen die Algen suspendiert bleiben, und der CO₂-Transfer muss unterstützt werden. Dazu sollten die Gefäße ständig geschüttelt oder umgerührt werden. Die Temperatur der Kulturen wird bei einer Toleranz von ± 2 °C ständig auf 21 bis 24 °C geregelt. Bei anderen als den in Anlage 2 genannten Arten (z. B. bei tropischen Arten) sind unter Umständen höhere Temperaturen angemessen, wenn die Validitätskriterien erfüllt sind. Es wird empfohlen, die Gefäße zufällig verteilt und täglich neu in den Inkubator einzusetzen.
30. Der pH-Wert des Kontrollmediums darf während des Tests höchstens um 1,5 Einheiten steigen. Bei Metallen und Chemikalien, die bei pH-Werten etwa im Bereich der im Test verwendeten pH-Werte teilweise ionisieren, muss die pH-Verschiebung möglicherweise begrenzt werden, um reproduzierbare und gut definierte Ergebnisse zu erhalten. Es ist technisch möglich, die Verschiebung auf < 0,5 pH-Einheiten zu begrenzen, indem ein angemessener CO₂-Transfer aus der

Umgebungsluft in die Testlösung sichergestellt wird (z. B. durch stärkeres Schütteln). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verringerung des CO₂-Bedarfs durch Verringerung der Ausgangsbiomasse oder in einer Verkürzung der Testdauer.

31. Die Oberfläche, auf der die Kulturen inkubiert werden, sollte kontinuierlich und gleichförmig fluoreszierend beleuchtet werden (z. B. mit den Lichtfarben kaltweiß („cool-white“) oder mit Tageslicht („daylight“). Algen- und Cyanobakterienstämme stellen unterschiedliche Anforderungen an die Lichtverhältnisse. Die Lichtintensität sollte entsprechend den verwendeten Testorganismen gewählt werden. Bei den empfohlenen Grünalgenarten ist für die Testlösungen eine Lichtintensität von 60-120 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zu wählen (bei Messung im photosynthetisch wirksamen Spektralbereich von 400-700 nm mit einem geeigneten Rezeptor). Einige Arten, insbesondere *Anabaena flos-aquae*, wachsen bei geringeren Lichtintensitäten und können durch größere Lichtintensitäten beschädigt werden. Bei diesen Arten sollte die durchschnittliche Lichtintensität im Bereich 40-60 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ liegen. (Bei in Lux kalibrierten Lichtmessgeräten entspricht der Bereich 4440-8880 lx für die Lichtfarbe „cool-white“ etwa der empfohlenen Lichtintensität von 60-120 $\mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die Lichtintensität darf um höchstens $\pm 15\%$ von der durchschnittlichen Lichtintensität über dem Inkubationsbereich abweichen.

Testdauer

32. Im Allgemeinen dauert der Test 72 Stunden. Allerdings sind auch kürzere oder längere Testzeiten möglich, sofern alle unter Nummer 11 genannten Validitätskriterien eingehalten werden.

Messungen und analytische Bestimmungen

33. Die Algenbiomasse in den einzelnen Kolben wird während der Testdauer mindestens einmal täglich überprüft. Wenn die Messungen an kleinen Volumina vorgenommen werden, die aus der Testlösung pipettiert wurden, sollten die betreffenden Volumina nicht ersetzt werden.
34. Die Biomasse wird durch manuelle Zählung der Zellen unter dem Mikroskop oder mit einem elektronischen Teilchenzähler (Einstellung auf Zellgehalt und/oder Biovolumen) ermittelt. Alternative Verfahren wie z. B. die Messung mit einem Durchflusszytometer, in vitro und/oder in vivo durchgeführte Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen (5)(6) oder Messungen der optischen Dichte kommen in Betracht, wenn in dem für den jeweiligen Test maßgeblichen Biomassebereich eine befriedigende Korrelation mit der Biomasse nachgewiesen werden kann.
35. Der pH-Wert der Lösungen wird am Anfang und am Ende des Tests bestimmt.
36. Wenn ein Analyseverfahren zur Bestimmung der Prüfchemikalie im maßgeblichen Konzentrationsbereich verfügbar ist, werden die Testlösungen analysiert, um die Ausgangskonzentrationen und die Aufrechterhaltung der Expositionskonzentrationen während der Tests zu prüfen bzw. sicherzustellen.
37. Die Analyse der Prüfchemikalienkonzentration am Anfang und am Ende des Tests

bei einer niedrigen und einer hohen Testkonzentration sowie bei einer Konzentration im zu erwartenden EC₅₀-Bereich kann hinreichend sein, wenn anzunehmen ist, dass die Expositionskonzentrationen während des Tests um weniger als 20 % von den Nennwerten abweichen. Wenn die Konzentrationen eher nicht im Bereich von 80-120 % der nominellen Konzentrationen bleiben werden, wird die Analyse sämtlicher Testkonzentrationen am Anfang und am Ende der Tests empfohlen. Bei flüchtigen, instabilen oder stark adsorbierenden Prüfchemikalien werden während der Expositionsdauer weitere Probenahmen zur Durchführung von Analysen in Abständen von jeweils 24 Stunden empfohlen, um den Verlust der Prüfchemikalie besser bestimmen zu können. Bei diesen Chemikalien werden zusätzliche Replikate benötigt. In jedem Fall müssen die Prüfchemikalienkonzentrationen für alle Testkonzentrationen bei den Replikaten jeweils nur für ein Gefäß (bzw. für den Inhalt der gepoolten Gefäße der jeweiligen Replikate) bestimmt werden.

38. Ausdrücklich für die Analyse von Expositionskonzentrationen während der Testdauer hergestellte Prüfmedien werden auf die gleiche Weise behandelt wie die für die Tests verwendeten Medien, d. h. die Medien müssen mit Algen geimpft und unter identischen Bedingungen inkubiert werden. Wenn eine Analyse der gelösten Prüfchemikalie erforderlich ist, müssen die Algen unter Umständen vom Medium getrennt werden. Die Trennung sollte vorzugsweise durch Zentrifugierung mit einer so geringen Beschleunigung erfolgen, die gerade ausreicht, damit die Algen sich absetzen.
39. Wenn nachgewiesen wird, dass die Konzentration der Prüfchemikalie während der gesamten Testdauer zufriedenstellend im Bereich von $\pm 20\%$ der Nennkonzentration oder der gemessenen Ausgangskonzentration aufrechterhalten werden konnte, können die Ergebnisse auch ausgehend von den Nennwerten bzw. von den gemessenen Ausgangswerten analysiert werden. Wenn die Abweichung von der Nennkonzentration oder von der gemessenen Ausgangskonzentration mehr als $\pm 20\%$ beträgt, sollte bei der Analyse der Ergebnisse von der geometrischen mittleren Konzentration während der Expositionsdauer oder von Modellen ausgegangen werden, welche den Rückgang der Prüfchemikalienkonzentration beschreiben (3)(7).
40. Der Test zur Hemmung des Algenwachstums ist ein dynamischeres Prüfsystem als die meisten sonstigen aquatischen Toxizitätstests mit kürzerer Testdauer. Entsprechend sind die tatsächlichen Expositionskonzentrationen unter Umständen schwer zu bestimmen; dies gilt besonders für adsorbierende Chemikalien, die bei niedrigen Konzentrationen getestet werden. In diesen Fällen bedeutet das Verschwinden der Prüfchemikalie aus der Lösung infolge der Adsorption in die zunehmende Algenbiomasse nicht, dass das Prüfsystem die Chemikalie „verliert“. Bei der Analyse des Testergebnisses ist zu prüfen, ob ein Rückgang der Prüfchemikalienkonzentration im Laufe des Tests mit einer Abnahme der Wachstumshemmung einhergeht. Wenn dies der Fall ist, kann der Einsatz eines geeigneten Modells zur Beschreibung des Rückgangs der Prüfchemikalienkonzentration (7) in Betracht gezogen werden. Ansonsten empfiehlt es sich unter Umständen, bei der Analyse der Ergebnisse von den

Ausgangskonzentrationen (Nennkonzentrationen oder gemessenen Konzentrationen) auszugehen.

Sonstige Beobachtungen

41. Durch Beobachtung unter dem Mikroskop wird sichergestellt, dass die Impfkultur normal und gesund wirkt; außerdem können unter dem Mikroskop am Ende des Tests gegebenenfalls Auffälligkeiten an den Algen festgestellt werden (die z. B. auf die Exposition gegenüber der Prüfchemikalie zurückzuführen sein könnten).

Limit-Test

42. Unter gewissen Umständen, z. B. wenn ein vorläufiger Test darauf hindeutet, dass die Prüfchemikalie bei Konzentrationen bis zu 100 mg/l bzw. bis zur Löslichkeitsgrenze im Prüfmedium (maßgeblich ist die jeweils niedrigere Konzentration) keine toxische Wirkung hat, kann ein Limit-Test durchgeführt werden, in dem die Reaktionen einer Kontrollgruppe und einer Behandlungsgruppe (100 mg/l bzw. eine der Löslichkeitsgrenze entsprechende Konzentration) verglichen werden. Es wird nachdrücklich empfohlen, diese Tests durch Analysen der Expositionskonzentration zu verifizieren. Alle oben beschriebenen Testbedingungen und Validitätskriterien gelten für Limit-Tests; allerdings sollten mindestens sechs Replikate mit behandelten Proben durchgeführt werden. Die Reaktionsvariablen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe können mit einem statistischen Test zum Vergleich der Mittelwerte analysiert werden (z. B. mit einem Student-t-Test). Wenn die Varianzen der beiden Gruppen nicht übereinstimmen, wird ein für nicht identische Varianzen angepasster t-Test durchgeführt.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Grafische Darstellung der Wachstumskurven

43. Die Biomasse in den Prüfgefäßen kann in Einheiten des für die Messung verwendeten Surrogatparameters ausgedrückt werden (z. B. als Zellgehalt oder Fluoreszenz).
44. Die geschätzte Biomassekonzentration der Prüfkulturen und der Kontrollkulturen ist zusammen mit den mindestens zu jeder vollen Stunde zu erfassenden Konzentrationen der Prüfchemikalie und den Messzeitpunkten in Tabellen zusammenzustellen und für die Erstellung von Wachstumskurven zu verwenden. In diesem ersten Stadium können sowohl logarithmische Skalen als auch lineare Skalen angebracht sein; während der Testdauer sind jedoch logarithmische Skalen zu verwenden, die im Allgemeinen eine bessere Darstellung von Abweichungen der Wachstumsstrukturen ermöglichen. Exponentielles Wachstum ergibt auf einer logarithmischen Skala aufgetragen eine Gerade, und die Steigung der Geraden gibt die Wachstumsrate an.
45. Mithilfe der Kurven ist zu untersuchen, ob die Kontrollkulturen während der

gesamten Testdauer mit der erwarteten Geschwindigkeit exponentiell wachsen. Alle Datenpunkte sowie der Verlauf der Kurven sind kritisch zu prüfen, und Ausgangsdaten und Verfahren sind auf mögliche Fehler zu kontrollieren. Insbesondere sind alle Datenpunkte zu prüfen, die aufgrund eines systematischen Fehlers abzuweichen scheinen. Wenn Verfahrensfehler zweifelsfrei festgestellt und/oder als sehr wahrscheinlich betrachtet werden können, wird der betreffende Datenpunkt als Ausreißer gekennzeichnet und nicht in die anschließende statistische Analyse einbezogen. (Eine Algenkonzentration von null in einem von zwei drei Replikatgefäßen kann darauf hindeuten, dass das Gefäß nicht ordnungsgemäß geimpft oder nicht angemessen gereinigt wurde.) Die Gründe für den Ausschluss eines als Ausreißer eingestuften Datenpunkts sind im Prüfbericht genau anzugeben. Als Begründungen werden ausschließlich (seltene) Verfahrensfehler, nicht aber einfach ungenaue Messungen anerkannt. Statistische Verfahren zur Bestimmung von Ausreißern sind bei dieser Art von Problemen von begrenztem Nutzen und können die Beurteilung durch Fachleute nicht ersetzen. Die Ausreißer sollten (als solche gekennzeichnet) vorzugsweise in den später in grafischen oder tabellarischen Darstellungen von Datenpunkten enthalten sein.

Reaktionsvariablen

46. Mit der Prüfung sollen die Auswirkungen der Prüfchemikalie auf das Algenwachstum bestimmt werden. Da in unterschiedlichen Rechtsordnungen unterschiedliche Präferenzen und rechtliche Anforderungen bestehen, werden in dieser Prüfmethode zwei Reaktionsvariablen beschrieben. Damit die Testergebnisse in allen Rechtsordnungen anerkannt werden können, sollten die Auswirkungen mit Hilfe der beiden im Folgenden beschriebenen Reaktionsvariablen a und b beurteilt werden:
- a) Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate: Diese Reaktionsvariable wird ausgehend von der täglichen logarithmischen Zunahme der Biomasse während der Testdauer berechnet.
 - b) Zellertrag: Diese Reaktionsvariable ergibt sich aus der Biomasse am Ende des Tests abzüglich der Biomasse zu Beginn des Tests.
47. Es wird darauf hingewiesen, dass die mit diesen beiden Reaktionsvariablen berechneten Toxizitätswerte nicht vergleichbar sind; der entsprechende Unterschied muss bei der Verwendung der Testergebnisse berücksichtigt werden. Die aufgrund der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate ($E_r C_x$) berechneten Werte für EC_x werden im Allgemeinen höher sein als die anhand des Zellertrags ($E_y C_x$) ermittelten Werte, wenn die für diese Testmethode vorgesehenen Bedingungen eingehalten werden; dies ist auf die unterschiedliche mathematische Grundlage der beiden Verfahren zurückzuführen. Die auftretenden Unterschiede sollten jedoch nicht als Anzeichen für eine unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Reaktionsvariablen betrachtet werden; beide Werte sind einfach mathematisch verschieden. Das Konzept der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate beruht auf dem im Allgemeinen exponentiellen Verlauf des Algenwachstums bei nicht begrenzten Kulturen, bei denen die Toxizität aufgrund der Auswirkungen auf die Wachstumsrate geschätzt wird, ohne jedoch von der absoluten Höhe der

jeweiligen Wachstumsrate der Kontrollprobe, von der Steigung der Konzentrations-Wirkungskurve oder von der Testdauer abhängig zu sein. Auf der Reaktionsvariable „Zellertrag“ beruhende Ergebnisse hingegen hängen von allen übrigen genannten Variablen ab. $E_y C_x$ ist von der spezifischen Wachstumsrate der in den einzelnen Tests verwendeten Algenarten sowie von der maximalen spezifischen Wachstumsrate abhängig, die je nach Art sowie sogar zwischen den einzelnen Algenstämmen unterschiedlich sein kann. Diese Reaktionsvariable sollte nicht verwendet werden, um die Empfindlichkeit von Algenarten oder auch nur verschiedener Algenstämme gegenüber Giftstoffen zu vergleichen. Die Verwendung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate zur Schätzung der Toxizität wird in der Wissenschaft bevorzugt; bei dieser Prüfmethode werden jedoch auch Toxizitätsschätzungen aufgrund des Zellertrags berücksichtigt, um den derzeitigen Regulierungsanforderungen in einigen Ländern Rechnung zu tragen.

Durchschnittliche Wachstumsrate

48. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate in einem bestimmten Zeitraum wird mit Hilfe der folgenden Formel als logarithmische Zunahme der Biomasse für die Gefäße mit den verschiedenen Kontrollproben und mit den behandelten Proben berechnet [1]:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (Tag}^{-1}\text{) [1],}$$

Dabei sind:

- μ_{i-j} : durchschnittliche spezifische Wachstumsrate zwischen Zeitpunkt i und Zeitpunkt j ;
- X_i : Biomasse zum Zeitpunkt i
- X_j : Biomasse zum Zeitpunkt j

Für jede Behandlungsgruppe und für jede Kontrollgruppe sind die mittlere Wachstumsrate sowie die Varianzschätzungen zu berechnen.

49. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate wird über die gesamte Testdauer (im Allgemeinen Tage 0-3) berechnet; dabei ist eher von der geimpften Nennbiomasse als von einem gemessenen Ausgangswert auszugehen, da auf diese Weise gewöhnlich eine höhere Genauigkeit erzielt wird. Wenn die zur Messung der Biomasse verwendete Ausrüstung eine hinreichend genaue Bestimmung der Biomasse mit der geringen Masse des Inokulums zulässt (z. B. ein Durchflusszytometer), kann die gemessene Konzentration der Ausgangsbiomasse angenommen werden. Außerdem ist während der gesamten Testdauer (Tage 0-1, 1-2 und 2-3) die abschnittsbezogene Wachstumsrate als tägliche spezifische Wachstumsrate zu ermitteln und zu prüfen, ob das Wachstum der Kontrollgruppe konstant bleibt (siehe Gültigkeitskriterien, Nummer 11). Eine spezifische Wachstumsrate, die an einem bestimmten Tag signifikant niedriger ist als die durchschnittliche spezifische Gesamtwachstumsrate, kann Anzeichen für eine „Lag“-Phase sein. Bei den Kontrollkulturen kann eine „Lag“-Phase minimiert und praktisch ausgeschlossen werden, wenn die Vorkultur in geeigneter Weise vermehrt wird; bei den behandelten Kulturen hingegen kann eine „Lag“-Phase Anzeichen für

eine Erholung nach anfänglicher toxischer Belastung oder Anzeichen für eine geringere Belastung infolge eines Verlustes der Prüfchemikalie (u. a. durch Sorption in die Algenbiomasse) nach der anfänglichen Behandlung sein. Entsprechend kann die abschnittsbezogene Wachstumsrate bewertet werden, um die Auswirkungen der Prüfchemikalie während der Expositionsdauer zu beurteilen. Erhebliche Unterschiede zwischen der abschnittsbezogenen Wachstumsrate und der durchschnittlichen Wachstumsrate deuten auf Abweichungen vom konstanten exponentiellen Wachstum hin und erfordern eine genaue Überprüfung der Wachstumskurve.

50. Die prozentuale Hemmung der Wachstumsrate jedes Behandlungsreplikats ist mit folgender Formel zu berechnen:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \quad [2],$$

Dabei sind:

- $\%I_r$ = Hemmung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate in Prozent;
- μ_C = mittlere durchschnittliche spezifische Wachstumsrate (μ) der Kontrollgruppe;
- μ_T = durchschnittliche spezifische Wachstumsrate des Behandlungsreplikats.

51. Wenn die Testlösungen mit Lösungsmitteln hergestellt werden, sollten zur Berechnung der prozentualen Hemmung eher die Kontrolllösungen mit dem Lösungsmittel als die Kontrolllösungen ohne das Lösungsmittel verwendet werden.

Zellertrag

52. Der Zellertrag wird für alle Gefäße mit Kontrolllösungen und mit behandelten Lösungen als Biomasse bei Ende des Tests abzüglich der Biomasse am Anfang des Tests berechnet. Für die Testkonzentrationen und für die Kontrolllösungen ist jeweils ein mittlerer Zellertrag zu berechnen; die Varianzen sind jeweils zu schätzen. Die prozentuale Hemmung des Zellertrags ($\%I_y$) kann für jedes Behandlungsreplikat wie folgt berechnet werden:

$$\% I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \quad [3]$$

Dabei sind:

- $\% I_y$ = prozentuale Hemmung des Zellertrags
- Y_C = mittlerer Zellertrag der Kontrollgruppe
- Y_T = Zellertrag des Behandlungsreplikats.

Grafische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve

53. Die prozentuale Hemmung ist bezogen auf den Logarithmus der Prüfchemikalienkonzentration grafisch darzustellen und sorgfältig zu überprüfen; dabei sind alle Datenpunkte zu verwerfen, die in der ersten Phase als Ausreißer identifiziert wurden. Die Datenpunkte sind nach visueller oder rechnergestützter Interpolation zu einer gleichmäßigen Kurve zu verbinden, um einen ersten Eindruck

von der Beziehung zwischen den verschiedenen Konzentrationen und Wirkungen zu erhalten. Anschließend ist mit einer differenzierteren Methode (vorzugsweise mit einer rechnergestützten statistischen Methode) fortzufahren. Je nach der beabsichtigten Verwendung der Daten, der Qualität (Genauigkeit) und dem Umfang der Daten sowie nach der Verfügbarkeit von Werkzeugen zur Analyse der Daten kann (gelegentlich durchaus berechtigt) entschieden werden, die Datenanalyse in diesem Stadium zu beenden und einfach die wesentlichen Werte für EC_{50} und EC_{10} (und/oder EC_{20}) aus der nach visueller Interpolation erstellten Kurve zu entnehmen (siehe auch folgender Abschnitt zu stimulierenden Auswirkungen). Die folgenden Gründe können dafür sprechen, von der Anwendung einer statistischen Methode abzusehen:

- Die Daten sind nicht geeignet, durch rechnergestützte Methoden zuverlässigere Ergebnisse zu liefern als durch die Beurteilung von Fachleuten. In diesen Fällen werden mit manchen Computer-Programmen unter Umständen keinerlei zuverlässige Ergebnisse erzielt (Replikate stimmen nicht überein usw.).
- Das Wachstum stimulierende Wirkungen können mit verfügbarer Software nicht angemessen verarbeitet werden (siehe folgender Abschnitt).

Statistische Verfahren

54. Ziel ist die Ermittlung einer quantitativen Konzentrations-Wirkungsbeziehung durch Regressionsanalyse. Im Anschluss an eine linearisierte Transformation der Reaktionsdaten (z. B. in Einheiten nach dem Probit-, Logit- oder Weibull-Modell) (8) kann eine gewichtete lineare Regression vorgenommen werden; nicht-lineare Regressionsverfahren, mit denen die unvermeidlichen Unregelmäßigkeiten der Daten und Abweichungen von gleichförmigen Verteilungen besser verarbeitet werden können, werden jedoch bevorzugt. Gegen null bzw. gegen die vollständige Hemmung können diese Unregelmäßigkeiten durch die Transformation vergrößert werden und die Analyse beeinträchtigen (8). Es wird darauf hingewiesen, dass Standard-Analysemethoden mit Probit-, Logit- oder Weibull-Transformationen für quantale Daten (z. B. Mortalität oder Überlebensraten) vorgesehen sind und zur Anwendung in Verbindung mit Wachstums- oder Biomassedaten modifiziert werden müssen. Spezifische Verfahren zur Bestimmung von EC_x -Werten aus kontinuierlichen Daten sind den Quellen (9), (10) und (11) zu entnehmen. In Anlage 5 wird der Einsatz nicht-linearer Regressionsanalysen näher erläutert.
55. Für jede zu analysierende Reaktionsvariable sind aufgrund der Konzentrations-Wirkungsbeziehung Punktschätzungen der EC_x -Werte zu ermitteln. Nach Möglichkeit sollten für jede Schätzung die 95-%-Konfidenzintervalle bestimmt werden. Die Qualität der Übereinstimmung der Reaktionsdaten mit dem Regressionsmodell wird grafisch oder statistisch bewertet. Die Regressionsanalyse muss mit den Reaktionen der einzelnen Replikate (und nicht mit den Mittelwerten der Behandlungsgruppe) durchgeführt werden. Wenn eine nicht-lineare Kurvenanpassung jedoch schwierig oder wegen zu großer Streuung der Daten nicht möglich ist, kann die Regression auch bezogen auf die Mittelwerte der Gruppe vorgenommen werden, um so auf einfache Weise die Auswirkungen erwarteter Ausreißer zu reduzieren. Wenn von dieser Möglichkeit Gebrauch gemacht wird, sollte dies im Prüfbericht als Abweichung vom normalen Verfahren vermerkt und

darauf hingewiesen werden, dass mit Kurvenanpassungen der einzelnen Replikate kein befriedigendes Ergebnis erzielt wurde.

56. Schätzwerte für EC_{50} und für die Konfidenzintervalle können auch durch lineare Interpolation mit einem Bootstrapping-Algorithmus (13) erzielt werden, wenn die verfügbaren Regressionsmodelle/-methoden für die betreffenden Daten nicht geeignet sind.
57. Um die LOEC und entsprechend die NOEC zu schätzen sowie um die Auswirkungen der Prüfchemikalie auf die Wachstumsrate zu ermitteln, müssen die Mittelwerte der behandelten Proben mit Verfahren zur Varianzanalyse (ANOVA) verglichen werden. Der Mittelwert der einzelnen Konzentrationen ist dann mit einer geeigneten Methode zur Durchführung von Mehrfachvergleichen bzw. zur Durchführung von Trendtests mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe zu vergleichen. Dunnett- und Williams-Tests können hilfreich sein (12)(14)(15)(16)(17). Die ANOVA-Annahme der Varianzhomogenität muss einer Überprüfung unterzogen werden. Die entsprechende Bewertung kann anhand einer grafischen Darstellung oder aufgrund eines formalen Tests vorgenommen werden (17). Geeignet sind Levene- und Bartlett-Tests. Wenn die Annahme der Varianzhomogenität nicht erfüllt ist, kann gelegentlich eine Korrektur durch logarithmische Datentransformation erfolgen. Bei außerordentlicher Varianzheterogenität, die durch Transformation nicht korrigiert werden kann, sollten Analysemethoden wie z. B. Jonckheere-Trendtests (Step-down) erwogen werden. Weitere Hinweise zur Bestimmung von NOEC-Werten sind Quelle (11) zu entnehmen.
58. Aufgrund neuer Forschungsergebnisse wird empfohlen, das Konzept der NOEC aufzugeben und durch Punktschätzungen von EC_x -Werten zu ersetzen, die durch Regression ermittelt wurden. Für diesen Algentest wurde noch kein geeigneter Wert für x definiert. Ein Bereich von 10 bis 20 % scheint geeignet (je nach ausgewählter Reaktionsvariable); vorzugsweise sollten sowohl EC_{10} als auch EC_{20} protokolliert werden.

Wachstumsstimulation

59. Gelegentlich wird bei niedrigen Konzentrationen eine Wachstumsstimulation (negative Hemmung) beobachtet. Diese Wachstumsstimulation kann entweder auf eine Hormesis („toxische Stimulation“) oder darauf zurückzuführen sein, dass im verwendeten Minimalmedium mit dem zu prüfenden Material zusätzliche das Wachstum stimulierende Faktoren zum Tragen kommen. Die Zugabe anorganischer Nährstoffe sollte keine unmittelbaren Auswirkungen haben, weil das Prüfmedium während der gesamten Testdauer ohnehin überschüssige Nährstoffe enthalten sollte. Eine Stimulation mit niedriger Dosierung kann bei Berechnungen von EC_{50} gewöhnlich übergangen werden, wenn die Stimulation nicht ungewöhnlich stark ist. Bei ungewöhnlich starker Stimulation oder wenn ein EC_x -Wert für einen niedrigen x-Wert berechnet werden soll, sind möglicherweise jedoch besondere Verfahrenswesen erforderlich. Die Löschung von Stimulationsreaktionen aus der Datenanalyse sollte nach Möglichkeit vermieden werden, und wenn die verfügbare Software zur Kurvenanpassung nicht in der Lage ist, geringere Stimulationen zu

verarbeiten, kann eine lineare Interpolation mit einem Bootstrapping-Algorithmus vorgenommen werden. Bei ungewöhnlich starker Stimulation kann der Einsatz eines Hormesis-Modells erwogen werden (18).

Nicht toxische Wachstumshemmung

60. Licht absorbierende Prüfmaterialien können zu einer Verringerung der Wachstumsrate führen, weil die Abdunklung den Anteil des verfügbaren Lichts verringert. Diese physikalischen Auswirkungen sollten durch geeignete Modifikation der Testbedingungen von toxischen Auswirkungen unterschieden und getrennt protokolliert werden. Entsprechende Hinweise sind den Quellen (2) und (3) zu entnehmen.

PRÜFBERICHT

61. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfchemikalie:

- physikalische Beschaffenheit und maßgebliche physikalisch-chemische Eigenschaften einschließlich der Wasserlöslichkeitsgrenze;
- chemische Kenndaten (z. B. CAS-Nummer) einschließlich der Reinheit (Verunreinigungen).

Im Test verwendete Art:

- Stamm, Lieferant oder Herkunft und Kulturbedingungen.

Prüfbedingungen:

- Datum des Testbeginns und Dauer des Tests;
- Beschreibung des Prüfprotokolls: Prüfgefäße, Kulturvolumina, Biomassedichte zu Beginn des Tests;
- Zusammensetzung des Mediums;
- Testkonzentrationen und Replikate (z. B. Anzahl der Replikate, Anzahl der Testkonzentrationen und verwendete geometrische Progression);
- Beschreibung der Herstellung der Testlösungen, einschließlich Verwendung von Lösungsmitteln usw.;
- Kulturapparatur;
- Lichtintensität und Qualität (Herkunft, Homogenität);
- Temperatur;
- getestete Konzentrationen: nominale Testkonzentrationen sowie alle Ergebnisse der Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfchemikalie in den Prüfgefäßen; außerdem sind die mit der Methode erzielte Wiederfindungsrate und die Quantifizierungsgrenze der Testmatrix anzugeben;
- sämtliche Abweichungen von dieser Prüfmethode;
- Methode zur Bestimmung der Biomasse und Anzeichen für eine Korrelation zwischen

dem gemessenen Parameter und der Trockenmasse.

Ergebnisse:

- pH-Werte zu Beginn und am Ende des Tests bei allen behandelten Proben;
- Biomasse in jedem Gefäß an allen Messpunkten und Methode zur Messung der Biomasse;
- Wachstumskurven (grafische Darstellung der Entwicklung Biomasse über einem bestimmten Zeitraum);
- berechnete Reaktionsvariablen für alle Behandlungsreplikate mit Mittelwerten und dem Variationskoeffizienten für Replikate;
- grafische Darstellung der Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung;
- Schätzungen der Toxizität für die Reaktionsvariablen (z. B. EC_{50} , EC_{10} , EC_{20}) sowie entsprechende Konfidenzintervalle; wenn berechnet, sind die LOEC und die NOEC sowie die zur jeweiligen Berechnung angewendeten statistischen Methoden anzugeben;
- bei Durchführung von Varianzanalysen (ANOVA) der Umfang der nachzuweisenden Auswirkungen (z. B. geringster signifikanter Unterschied);
- jede in behandelten Proben festgestellte Wachstumsstimulation;
- alle sonstigen beobachteten Auswirkungen (z. B. morphologische Veränderungen der Algen);
- Diskussion der Ergebnisse einschließlich aller Auswirkungen auf das Testergebnis, die auf Abweichungen von dieser Prüfmethode zurückzuführen sind.

LITERATUR

- (1) ISO (1993). ISO 8692 Wasserbeschaffenheit - Süßwasseralgen-Wachstumshemmtest mit einzelligen Grünalgen.
- (2) ISO (1998). ISO/DIS 14442. Wasserbeschaffenheit - Anleitung für Algenwachstumshemmtests in Gegenwart schwer löslicher Materialien, flüchtigen Verbindungen, Metallen und Abwasser.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (4) ISO (1998). ISO 5667-16 Wasserbeschaffenheit - Probenahme - Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren.
- (5) Mayer, P., Cuhel, R., und Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.
- (6) Slovacey, R.E., und Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22: 919-925
- (7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L., und Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.
- (8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19: 713-718.
- (9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O., und Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157-167.
- (10) Bruce, R.D., und Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485-1494.
- (11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

- (12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
- (13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
- (17) Draper, N.R., und Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.
- (18) Brain, P., und Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Bei dieser Prüfmethode werden die folgenden Begriffsbestimmungen zugrunde gelegt und folgende Abkürzungen verwendet:

Biomasse: Trockenmasse lebenden Materials einer Population bezogen auf ein gegebenes Volumen (z. B. mg Algen/Liter Testlösung). Gewöhnlich bezeichnet der Begriff „Biomasse“ eine Masse; in Rahmen dieser Prüfung wird er allerdings zur Bezeichnung einer Masse pro Volumen verwendet. Typischerweise werden Surrogate für die betreffende Biomasse (z. B. Zellgehalt oder Fluoreszenz) gemessen; entsprechend bezieht sich der Begriff „Biomasse“ auch auf diese Surrogatparameter.

Chemikalie: ein Stoff oder eine Mischung.

Variationskoeffizient: ein dimensionsloses Maß für die Veränderlichkeit eines Parameters, definiert als Verhältnis der Standardabweichung zum Mittelwert. Der Variationskoeffizient kann auch als Prozentwert ausgedrückt werden. Der mittlere Variationskoeffizient der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate bei Replikatkontrollkulturen wird wie folgt berechnet:

- Der Variationskoeffizient in Prozent (VK %) der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate wird aus den täglichen bzw. abschnittsbezogenen Wachstumsraten der jeweiligen Replikate berechnet.
- Der Mittelwert aller gemäß dem ersten Gedankenstrich berechneten Werte ist zu berechnen, um den mittleren Variationskoeffizienten der täglichen/abschnittsbezogenen spezifischen Wachstumsrate in Replikatkontrollkulturen zu bestimmen.

EC_x: Konzentration der im Prüfmedium aufgelösten Prüfchemikalie, bei der das Wachstum des Testorganismus binnen einer bestimmten Expositionsdauer (die ausdrücklich anzugeben ist, wenn die Expositionsdauer nicht mit der vollständigen oder gewöhnlichen Dauer der Prüfung übereinstimmt) um x % (z. B. 50 %) abnimmt. Um eindeutig anzugeben, ob ein EC-Wert aus der Wachstumsrate (*growth rate*) oder aus dem Zellertrag (*yield*) abgeleitet wurde, werden die Kurzbezeichnungen „E_rC“ für die Wachstumsrate und „E_yC“ für den Zellertrag verwendet.

Nährmedium: gesamtes synthetisches Kulturmedium, in dem die zu prüfenden Algen wachsen, wenn sie der Prüfchemikalie ausgesetzt werden. Die Prüfchemikalie wird im Allgemeinen im Prüfmedium aufgelöst.

Wachstumsrate (durchschnittliche spezifische Wachstumsrate): logarithmische Zunahme der Biomasse während der Expositionsdauer.

Niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC): niedrigste geprüfte Konzentration, bei der beobachtet wurde, dass die Chemikalie binnen einer bestimmten Expositionsdauer gegenüber der Kontrollprobe eine statistisch signifikante

Wachstumsreduzierung bewirkt (bei $p < 0,05$). Sämtliche Testkonzentrationen über der LOEC müssen schädliche Folgen haben, die mindestens den bei der LOEC beobachteten schädlichen Folgen gleichwertig sind. Wenn diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden können, ist umfassend darzulegen, warum die LOEC (und entsprechend die NOEC) gewählt wurde.

Höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete Wirkung (NOEC): Testkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC.

Reaktionsvariable: Variable für die geschätzte Toxizität, abgeleitet aus beliebigen gemessenen Parametern zur Beschreibung der Biomasse durch verschiedene Berechnungsmethoden. Bei dieser Methode sind Wachstumsrate und Zellertrag Reaktionsvariablen, die aus der direkten Messung der Biomasse oder einer Messung eines der genannten Surrogate abgeleitet werden.

Spezifische Wachstumsrate: Reaktionsvariable, die sich aus dem Quotienten der Differenz der natürlichen Logarithmen eines beobachteten Parameters (bei dieser Prüfmethode die Biomasse) und dem betreffenden Zeitraum ergibt.

Prüfchemikalie: ein beliebiger Stoff oder eine Mischung, der bzw. die nach dieser Methode geprüft wird.

Zellertrag: Wert einer Messvariablen am Ende der Expositionsdauer abzüglich des Wertes der Messvariablen zu Beginn der Expositionsdauer als Maß für die Zunahme der Biomasse während der Prüfung.

Anlage 2

STÄMME, DIE SICH FÜR DEN TEST ALS GEEIGNET ERWIESEN HABEN

Grünalgen

Pseudokirchneriella subcapitata (früher auch als *Selenastrum capricornutum* bezeichnet), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

Desmodesmus subspicatus (früher auch als *Scenedesmus subspicatus* bezeichnet), 86.81 SAG

Kieselalgen

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cyanobakterien

Anabaena flos-aquae, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Herkunft der Stämme

Die empfohlenen Stämme sind als artenreine Algenkulturen aus folgenden Sammlungen verfügbar (in alphabetischer Reihenfolge):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
VEREINIGTES KÖNIGREICH

SAG: Sammlung Algenkulturen
Pflanzenphysiologisches Institut
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
DEUTSCHLAND

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

Aussehen und Merkmale der empfohlenen Arten

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Aussehen	Gekrümmte und gedrehte einzelne Zellen	Oval, meist einzelne Zellen	Stäbchen	Ketten ovaler Zellen	Stäbchen
Größe (L × B) µm	8-14 x 2-3	7-15 x 3-12	7,1 x 3,7	4,5 x 3	6 x 1
Zellvolumen (µm ³ /Zelle)	40-60 ¹	60-80 ¹	40-50 ¹	30-40 ¹	2,5 ²
Zelltrockenmasse (mg/Zelle)	2-3 x 10 ⁻⁸	3-4 x 10 ⁻⁸	3-4 x 10 ⁻⁸	1-2 x 10 ⁻⁸	2-3 x 10 ⁻⁹
Wachstumsrate ³ (Tag ⁻¹)	1,5 -1,7	1,2-1,5	1,4	1,1-1,4	2,0 - 2,4

¹ Gemessen mit einem elektronischen Teilchenzähler.

² Aus der Größe berechnet.

³ Am häufigsten beobachtete Wachstumsrate im OECD-Medium bei einer Lichtintensität von ca. 70 µE · m⁻² · s⁻¹ und einer Temperatur von 21 °C.

Spezifische Empfehlungen zur Kultivierung und zur Handhabung der für den Test empfohlenen Arten

Pseudokirchneriella subcapitata und *Desmodesmus subspicatus*

Diese Grünalgen sind in unterschiedlichen Kulturmedien im Allgemeinen leicht zu kultivieren. Informationen zu geeigneten Medien sind von den Einrichtungen zu beziehen, welche die Sammlungen unterhalten. Die Zellen liegen gewöhnlich als Einzelzellen vor; mit einem elektronischen Teilchenzähler oder unter einem Mikroskop kann die Zelldichte problemlos bestimmt werden.

Anabaena flos-aquae

Für Stammkulturen können verschiedene Nährmedien verwendet werden. Insbesondere muss vermieden werden, dass die Batch-Kultur bei der Erneuerung das Stadium des exponentiellen Wachstums überschreitet; ansonsten wäre die Wiederfindung schwierig.

Anabaena flos-aquae bildet Ansammlungen verschachtelter Zellketten. Die Größe dieser Ansammlungen kann je nach Kulturbedingungen unterschiedlich sein. Unter

Umständen müssen diese Ansammlungen getrennt werden, wenn die Biomasse unter dem Mikroskop bzw. mit einem elektronischen Teilchenzähler bestimmt werden soll.

Zum Trennen der Ketten mit dem Ziel, Schwankungen der Zählergebnisse zu verringern, können Teilproben einer Ultraschallbehandlung unterzogen werden. Eine unnötig lange Ultraschallbehandlung zum Trennen der Ketten in kürzere Stücke kann die Zellen zerstören. Intensität und Dauer der Ultraschallbehandlung müssen bei allen Behandlungen identisch sein.

Mit dem Hämozytometer sind hinreichend Zellen zu zählen (mindestens 400), um auftretende Schwankungen korrigieren zu können und die Zuverlässigkeit der mikroskopischen Dichtebestimmungen zu erhöhen.

Zur Bestimmung des Gesamtvolumens der *Anabaena*-Zellen nach dem Trennen der Zellketten durch vorsichtige Ultraschallbehandlung kann ein elektronischer Teilchenzähler verwendet werden. Die Ultraschallenergie ist so anzupassen, dass die Zellen nicht beschädigt werden.

Mit einem Wirbelmischer oder durch ein ähnliches geeignetes Verfahren ist sicherzustellen, dass die zur Impfung der Prüfgefäße verwendete Algensuspension gut durchgemischt und homogen beschaffen ist.

Die Prüfgefäße werden auf einen Schütteltisch (mit kreisförmiger oder gerader Schüttelbewegung) gestellt, der mit etwa 150 Umdrehungen pro Minute bewegt wird. Alternativ kann bei *Anabaena* die Verklumpungstendenz auch durch intermittierendes Schütteln verringert werden. Wenn eine Verklumpung auftritt, ist darauf zu achten, dass repräsentative Proben für Messungen der Biomasse vorliegen. Unter Umständen müssen die Gefäße vor der Probenahme kräftig geschüttelt werden, um die Algenklumpen aufzulösen.

Synechococcus leopoliensis

Für Stammkulturen können verschiedene Nährmedien verwendet werden. Informationen zu geeigneten Medien sind von den Stellen zu beziehen, welche die Sammlungen unterhalten.

Synechococcus leopoliensis wächst in einzelnen stäbchenförmigen Zellen. Die Zellen sind sehr klein; dies erschwert Messungen der Biomasse durch Zählungen unter dem Mikroskop. Elektronische Teilchenzähler, die für die Zählung von Teilchen mit einer Größe von bis zu etwa 1 µm ausgelegt sind, können hilfreich sein. In-vitro-Fluoreszenzmessungen kommen ebenfalls in Betracht.

Navicula pelliculosa

Für Stammkulturen können verschiedene Nährmedien verwendet werden. Informationen zu geeigneten Medien sind von den Einrichtungen zu beziehen, welche die Sammlungen unterhalten. Das Medium muss Silicat enthalten.

Navicula pelliculosa kann unter bestimmten Wachstumsbedingungen Ansammlungen

bilden. Wegen der Bildung von Lipiden neigen die Algenzellen gelegentlich zur Akkumulierung im Oberflächenfilm. In diesem Fall sind besondere Verfahrensweisen erforderlich, wenn repräsentative Unterproben zur Bestimmung der Biomasse genommen werden sollen. Unter Umständen ist ein kräftiges Schütteln z. B. mit einem Wirbelmischer erforderlich.

Anlage 3

NÄHRMEDIEN

Für die Tests kann eines der beiden folgenden Nährmedien verwendet werden:

- OECD-Medium: Originalmedium gemäß OECD TG 201 sowie gemäß ISO 8692;
- US. EPA-Medium AAP, auch gemäß ASTM.

Bei der Herstellung dieser Medien sind chemische Stoffe in Reagenzien- oder Analysequalität und entionisiertes Wasser zu verwenden.

Zusammensetzung des AAP-Mediums (US. EPA) und des Mediums gemäß OECD TG 201:

Bestandteil	EPA		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
NaHCO ₃	15,0	0,179	50,0	0,595
NaNO ₃	25,5	0,300		
NH ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ ·6(H ₂ O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ ·2(H ₂ O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ ·6(H ₂ O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA·2(H ₂ O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269*
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ ·4(H ₂ O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ ·2(H ₂ O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH-Wert	7,5		8,1	

Das Molverhältnis von EDTA zu Eisen ist geringfügig größer als eins. Daher kann das Eisen nicht ausfallen, und die Chelatbildung von Schwermetallionen wird minimiert.

Im Test mit der Kieselalge *Navicula pelliculosa* sind beide Medien mit $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ aufzufüllen, bis eine Konzentration von 1,4 mg Si/l erreicht ist.

Der pH-Wert des Mediums wird ermittelt, wenn sich das Carbonatsystem des Mediums und der Partialdruck des CO_2 in der Umgebungsluft im Gleichgewicht befinden. Die ungefähre Beziehung zwischen dem pH-Wert bei 25 °C und der molaren Bicarbonat-Konzentration lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\text{pH}_{\text{eq}} = 11,30 + \log[\text{HCO}_3^-]$$

Bei 15 mg NaHCO_3/l , $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$ (U.S. EPA-Medium) und bei 50 mg NaHCO_3/l , $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$ (OECD-Medium).

Elementzusammensetzung der Prüfmedien

Element	EPA	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
k	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Herstellung des OECD-Mediums

Nährstoff	Konzentration in der Stammlösung
Stammlösung 1: Makronährstoffe	
NH ₄ Cl	1,5 g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g/l
KH ₂ PO ₄	0,16 g/l
Stammlösung 2: Eisen	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg/l
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg/l
Stammlösung 3: Spurenelemente	
H ₃ BO ₃	185 mg/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/l
ZnCl ₂	3 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg/l
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/l
Stammlösung 4: Bicarbonat	
NaHCO ₃	50 g/l
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	

Die Stammlösungen sind durch Membranfiltration (mittlerer Porendurchmesser 0,2 µm) oder durch Autoklavieren (120 °C, 15 min) zu sterilisieren. Anschließend werden die Lösungen bei einer Temperatur von 4 °C dunkel gelagert.

Die Stammlösungen 2 und 4 dürfen nicht autoklaviert werden, sondern sind durch Membranfiltration zu sterilisieren.

Zum Herstellen des Nährmediums wird eine geeignete Menge der Stammlösungen 1 bis 4 wie folgt zu Wasser hinzugegeben:

Zu 500 ml sterilisiertem Wasser werden folgende Mengen hinzugegeben:

10 ml Stammlösung 1

1 ml Stammlösung 2

1 ml Stammlösung 3

1 ml Stammlösung 4

Anschließend wird mit sterilisiertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Danach muss hinreichend Zeit zur Herstellung eines Gleichgewichts zwischen dem Medium und dem CO₂-Gehalt der Umgebungsluft gelassen werden; wenn erforderlich, ist das Nährmedium einige Stunden mit steriler gefilterter Luft zu sprudeln.

Herstellung des AAP-Mediums

1. Von den Stammlösungen 2.1 bis 2.7 ist jeweils 1 ml zu etwa 900 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser hinzugeben; anschließend wird auf 1 Liter aufgefüllt.

2. Stammlösungen mit Makronährstoffen werden hergestellt, indem die folgenden Stoffmengen jeweils zu 500 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser hinzugegeben werden. Die Reagenzien 2.1, 2.2, 2.3 und 2.4 können zu einer einzigen Stammlösung kombiniert werden.

2.1	NaNO ₃	12,750 g
2.2	MgCl ₂ ·6H ₂ O	6,082 g
2.3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,205 g
2.4	Mikronährstoff-Stammlösung (siehe 3)	
2.5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,350 g
2.6	K ₂ HPO ₄	0,522 g
2.7	NaHCO ₃	7,500 g
2.8	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	Siehe Hinweis 1

HINWEIS 1: Ausschließlich für im Test eingesetzte Kieselalgen-Arten zu verwenden; kann unmittelbar (202,4 mg) hinzugegeben oder mittelbar durch Auffüllen mit einer Stammlösung bis zum Erreichen einer Endkonzentration von 20 mg Si/l im Medium hinzugegeben werden.

3. Die Mikronährstoff-Lösung wird hergestellt, indem folgende Mengen in 500 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser aufgelöst werden:

3.1	H ₃ BO ₃	92,760 mg
3.2	MnCl ₂ ·4H ₂ O	207,690 mg
3.3	ZnCl ₂	1,635 mg
3.4	FeCl ₃ ·6H ₂ O	79,880 mg
3.5	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,714 mg
3.6	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3,630 mg
3.7	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,006 mg
3.8	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	150,000 mg. [Dinatrium(ethylendinitril)tetraacetat]
3.9	Na ₂ SeO ₄ ·5H ₂ O	0,005 mg; siehe Hinweis 2.

HINWEIS 2: Darf ausschließlich im Medium für Stammkulturen mit Kieselalgen-Arten verwendet werden.

4. Der pH-Wert ist auf 7,5± 0,1 einzustellen (mit 0,1 N oder 1,0 N NaOH oder HCl).

5. Wenn ein Teilchenzähler verwendet werden soll, wird das Medium durch einen 0,22-µm-Membranfilter in ein steriles Gefäß gefiltert; ansonsten erfolgt die Filtration in ein steriles Gefäß durch ein 0,45-µm-Filter.

6. Das Medium ist bis zur Verwendung bei einer Temperatur von etwa 4 °C dunkel zu lagern.

Anlage 4

BEISPIEL EINES VERFAHRENS ZUR KULTIVIERUNG DER ALGEN

Allgemeine Bemerkungen

Durch die Kultivierung nach dem folgenden Verfahren sollen Algenkulturen für Toxizitätstests hergestellt werden.

Um sicherzustellen, dass die Algenkulturen nicht mit Bakterien verunreinigt sind, sind geeignete Methoden anzuwenden. Wenn gleich u. U. axenische Kulturen erwünscht sein mögen, sind Algenkulturen doch mit einer einzigen Alge herzustellen und zu verwenden.

Sämtliche Schritte sind unter sterilen Bedingungen auszuführen, um Verunreinigungen mit Bakterien und anderen Algen zu vermeiden.

Ausrüstung und Materialien

Siehe Prüfmethode: Apparatur.

Verfahren zur Herstellung von Algenkulturen

Herstellung von Nährlösungen (Medien)

Alle Nährsalze des Mediums werden als konzentrierte Stammlösungen hergestellt und dunkel und kühl gelagert. Die Lösungen werden durch Filtration oder Autoklavieren sterilisiert.

Das Medium wird durch Zugabe der jeweils erforderlichen Menge der Stammlösung zu sterilem destilliertem Wasser hergestellt; dabei ist darauf zu achten, dass keine Verunreinigungen entstehen können. Bei festen Medien ist 0,8 % Agar hinzuzugeben.

Stammkultur

Die Stammkulturen bestehen aus kleinen Algenkulturen, die regelmäßig in frische Medien übertragen werden und als Ausgangs-Prüfmaterial fungieren. Wenn die Kulturen nicht regelmäßig verwendet werden, sind die Kulturen auf Agarröhrchen (Slopes) abzustreichen. Diese werden anschließend mindestens einmal alle zwei Monate in frische Medien gebracht.

Die Stammkulturen werden in Erlenmeyerkolben mit dem jeweils geeigneten Medium kultiviert (Volumen etwa 100 ml). Wenn die Algen bei 20 °C unter ständiger Beleuchtung inkubiert werden, ist eine wöchentliche Überimpfung erforderlich.

Dabei ist von der „alten“ Kultur mit sterilen Pipetten so viel in einen Kolben mit frischem Medium zu geben, dass bei schnell wachsenden Arten die Ausgangskonzentration etwa 100-mal geringer ist als die Konzentration der alten

Kultur.

Die Wachstumsrate einer Art kann anhand der Wachstumskurve bestimmt werden. Wenn diese bekannt ist, kann die Dichte geschätzt werden, bei der die Kultur in das neue Medium gegeben werden sollte. Die Dichteschätzung muss erfolgen, bevor die betreffende Kultur in die Absterbephase gelangt.

Vorkultur

Mit der Vorkultur sollen Algen zur Impfung der Prüfkulturen hergestellt werden. Die Vorkultur wird unter den Prüfbedingungen inkubiert und noch während der Phase des exponentiellen Wachstums verwendet (in der Regel nach einer Inkubationsdauer von 2 bis 4 Tagen). Algenkulturen mit deformierten oder anomalen Zellen sind zu verwerfen.

Anlage 5

DATENANALYSE DURCH NICHT-LINEARE REGRESSION

Allgemeine Bemerkungen

In den Algentests und in sonstigen Tests zur Ermittlung des mikrobiologischen Wachstums – des Wachstums einer Biomasse – stellt die Reaktion naturgemäß eine kontinuierliche oder metrische Variable dar: eine Prozessrate, wenn von einer Wachstumsrate ausgegangen wird, und ein zeitbezogenes Integral, wenn die Biomasse zugrunde gelegt wird. Diese beide Variablen werden zu der mittleren Wirkung in Beziehung gesetzt, die bei nicht exponierten Replikatkontrollen beobachtet wird, die unter den gegebenen Bedingungen am stärksten reagieren, wobei Licht und Temperatur bei Algentests die wichtigsten Determinanten sind. Das System kann verteilt oder homogen sein, und die Biomasse kann als kontinuierlicher Parameter betrachtet werden; einzelne Zellen brauchen nicht berücksichtigt zu werden. Die Varianzverteilung des Reaktionstyps dieser Systeme hängt ausschließlich von den Versuchsbedingungen ab (die in der Regel durch logarithmisch-normale oder normale Fehlerverteilungen gekennzeichnet sind). In dieser Hinsicht besteht ein Unterschied gegenüber typischen Reaktionen in Bioassays mit quantalen Daten, bei denen die Toleranz (typischerweise mit Binomialverteilung) der einzelnen Organismen häufig als maßgebliche Varianzkomponente betrachtet wird. Kontrollreaktionen liegen hier bei null oder im Bereich des Hintergrundwerts.

Im einfachsten Fall nimmt die normalisierte oder relative Reaktion r gleichmäßig von 1 (Hemmung null) bis 0 (vollständige Hemmung) ab. Alle Reaktionen sind mit einem Fehler verbunden, und scheinbare negative Hemmungen können rechnerisch ausschließlich das Ergebnis zufälliger Fehler sein.

Regressionsanalyse

Modelle

Durch eine Regressionsanalyse soll die Konzentrations-Wirkungskurve als mathematische Regressionsfunktion $Y = f(C)$ bzw. häufiger als $F(Z)$ beschrieben werden; dabei ist $Z = \log C$. Umgekehrt ermöglicht $C = f^{-1}(Y)$ die Berechnung von EC_x -Werten einschließlich EC_{50} , EC_{10} und EC_{20} sowie der jeweiligen 95-%-Konfidenzintervalle. Verschiedene einfache mathematische Funktionen haben sich als geeignet zur Beschreibung von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen in Tests zur Ermittlung der Hemmung des Algenwachstums erwiesen. Zu diesen Formeln zählen die logistische Gleichung, die nicht symmetrische Weibull-Verteilung und die logarithmische Normalverteilung als sigmoide Kurven, bei denen sich jeweils ein asymptotischer Verlauf gegen 0 bei $C \rightarrow 0$ bzw. gegen 1 bei $C \rightarrow$ unendlich ergibt.

Der Einsatz kontinuierlicher Schwellenwert-Funktionsmodelle (z. B. des Kooijman-Modells der „Hemmung des Populationswachstums“ – Kooijman u. a. 1996) wurde kürzlich als Alternative zu asymptotischen Modellen vorgeschlagen. Dieses Modell

geht davon aus, dass bei Konzentrationen unter einem bestimmten Schwellenwert EC_{0+} keine Auswirkungen mehr gegeben sind; dieser Schwellenwert wird mit Hilfe einer einfachen kontinuierlichen Funktion mit undifferenziertem Ausgangspunkt durch Extrapolation der Konzentrations-Wirkungsbeziehung so geschätzt, dass die Konzentrationsachse geschnitten wird.

Die Analyse kann in einer einfachen Minimierung der Restquadratsummen (bei Annahme einer konstanten Varianz) oder der Summe der gewichteten Quadrate (bei Ausgleich einer Varianzheterogenität) bestehen.

Verfahren

Das Verfahren kann wie folgt beschrieben werden: Eine geeignete Funktionsgleichung $Y = f(C)$ wird gewählt und durch nicht-lineare Regression an die Daten angepasst. Vorzugsweise sind die Messungen der einzelnen Kolben und nicht die Mittelwerte der Replikate zu verwenden, um möglichst viele Informationen aus den Daten zu gewinnen. Bei einer hohen Varianz haben praktische Erfahrungen hingegen gezeigt, dass die Mittelwerte der Replikate eine sicherere mathematische Schätzung ermöglichen, die weniger von systematischen Fehlern bei den Daten als von den einzelnen ermittelten Datenpunkten abhängt.

Die angepasste Kurve und die gemessenen Daten werden grafisch dargestellt; anschließend ist zu prüfen, ob die Kurve in angemessener Weise angepasst wurde. Eine Analyse der Restwerte könnte für diesen Zweck besonders hilfreich sein. Wenn die gewählte Funktionsbeziehung zur Anpassung der Konzentrations-Wirkungskurve die Kurve nicht vollständig beschreibt oder einen wesentlichen Teil der Kurve wie z. B. die Reaktion bei niedrigen Konzentrationen nicht gut beschreibt, ist eine andere Kurvenanpassung zu wählen (z. B. eine nicht symmetrische Kurve wie etwa die Weibull-Funktion anstelle einer symmetrischen Kurve). Negative Hemmungen können z. B. in Verbindung mit der logarithmischen Normalverteilung problematisch sein und ebenfalls den Einsatz einer alternativen Regressionsfunktion erfordern. Es wird nicht empfohlen, diesen negativen Werten einen Wert von null oder einen kleinen positiven Wert zuzuweisen, weil ansonsten die Fehlerverteilung beeinträchtigt werden könnte. Angemessen sind unter Umständen getrennte Kurvenanpassungen für bestimmte Bereiche der Kurve (z. B. für den Bereich mit der niedrigen Hemmung, wenn $EC_{low\ x}$ -Werte geschätzt werden sollen). Aus der angepassten Formel sind (mit der Umkehrfunktion $C = f^{-1}(Y)$) charakteristische Schätzwerte für EC_x zu ermitteln und mindestens für EC_{50} sowie für einen oder zwei Werte von $EC_{low\ x}$ zu protokollieren. Praktische Erfahrungen haben gezeigt, dass die Genauigkeit der Algentests im Allgemeinen eine angemessen exakte Schätzung der Konzentration bei einer Hemmung von etwa 10 % ermöglicht, wenn hinreichende Datenpunkte verfügbar sind (sofern nicht eine Unregelmäßigkeit in Form einer Stimulation auch bei niedrigen Konzentrationen gegeben ist). Die Genauigkeit einer EC_{20} -Schätzung ist häufig beträchtlich größer als die Genauigkeit geschätzter EC_{10} -Werte, weil die EC_{20} -Werte gewöhnlich im annähernd linearen Bereich der zentralen Konzentrations-Wirkungskurve vorgenommen werden. Gelegentlich ist die Beurteilung von EC_{10} -Werten wegen der Wachstumsstimulation problematisch. Werte für EC_{10} sind also im Allgemeinen mit hinreichender Genauigkeit zu erhalten; in jedem Fall empfiehlt sich

jedoch, auch die EC₂₀-Werte zu erfassen.

Gewichtungsfaktoren

Die Versuchsvarianz ist nicht grundsätzlich konstant und beinhaltet typischerweise eine proportionale Komponente; daher wird vorzugsweise regelmäßig auch eine gewichtete Regression vorgenommen. Die Gewichtungsfaktoren für diese Analysen werden im Allgemeinen als umgekehrt proportional zur Varianz angenommen:

$$W_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

Viele Regressionsprogramme beinhalten die Option zur Durchführung gewichteter Regressionsanalysen mit Gewichtungsfaktoren, die aus einer Tabelle ausgewählt werden können. Die Normalisierung der Gewichtungsfaktoren kann auf bequeme Weise erfolgen, indem die Gewichtungsfaktoren so mit $n/\sum w_i$ (n = Anzahl der Datenpunkte) multipliziert werden, dass sich die Summe 1 ergibt.

Normalisierung der Reaktionen

Die Normalisierung durch die mittlere Kontrollreaktion bringt einige grundsätzliche Probleme mit sich und bedingt eine eher komplizierte Varianzstruktur. Mit der Division der Reaktionen durch die mittlere Kontrollreaktion zur Ermittlung der prozentualen Hemmung wird ein weiterer Fehler eingeführt, der auf den in den Mittelwerten der Kontrollen enthaltenen Fehler zurückzuführen ist. Wenn dieser Fehler nicht vernachlässigbar gering ist, sind Gewichtungsfaktoren in Verbindung mit der Regression und mit den Konfidenzintervallen bezogen auf die Kovarianz der Kontrollen zu korrigieren (Draper und Smith, 1981). Eine hohe Genauigkeit der geschätzten Mittelwerte der Kontrollreaktionen ist wichtig, um die Gesamtvarianz der relativen Reaktion zu minimieren. Diese Varianz lässt sich wie folgt beschreiben:

(Dabei steht das tiefgestellte i für die Konzentration i und die tiefgestellte 0 für die Kontrollen.)

$$Y_i = \text{relative Reaktion} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

$$\text{bei gegebener Varianz } \text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + ((\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0))$$

$$\text{entsprechend gilt } (\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0 \text{ und } (\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$$

$$\text{bei normal verteilten Daten und } m_i \text{ und } m_0 \text{ Replikaten: } \text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i;$$

für die Gesamtvarianz der relativen Reaktion Y_i gilt somit:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0.$$

Der Fehler im Mittelwert der Kontrollen ist umgekehrt proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der in den Durchschnitt einbezogenen Kontrollreplikate; gelegentlich ist die Einbeziehung historischer Daten gerechtfertigt, um den Fehler auf diese Weise

erheblich zu reduzieren. Ein alternatives Verfahren besteht darin, die Daten nicht zu normalisieren und die absoluten Reaktionen einschließlich der Daten der Kontrollreaktionen nicht anzupassen, sondern den Kontroll-Reaktionswert als zusätzlichen Parameter einzuführen, der durch nicht-lineare Regression anzupassen ist. In Verbindung mit einer normalen Regressionsgleichung mit zwei Parametern erfordert diese Methode die Anpassung von drei Parametern; daher sind mehr Datenpunkte erforderlich als bei der nicht-linearen Regression von Daten, die mit einer vordefinierten Kontrollreaktion normalisiert werden.

Umkehrung der Konfidenzintervalle

Die Berechnung nicht-linearer Konfidenzintervalle durch Schätzung mit der Umkehrfunktion gestaltet sich eher komplex und ist in den üblichen statistischen Computer-Programmen als reguläre Option nicht enthalten. Ungefähre Konfidenzintervalle können mit Standardprogrammen zur Berechnung nicht-linearer Regressionen durch Neu-Parametrisierung ermittelt werden (Bruce und Versteeg, 1992); dabei wird die mathematische Formel mit den angestrebten Punktschätzungen (z. B. EC_{10} und EC_{50}) als zu schätzenden Parametern neu entwickelt. Vorausgesetzt wird, dass $I = f(\alpha, \beta, \text{Konzentration})$; die Definitionsbeziehungen $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ und $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$ werden verwendet, um $f(\alpha, \beta, \text{Konzentration})$ durch eine äquivalente Funktion $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{Konzentration})$ zu ersetzen.

Für eine direktere Berechnung (Andersen u. a. 1998) kann die ursprüngliche Formel verwendet und eine Taylor-Expansion um die Mittelwerte für r_i und r_0 angenommen werden.

In letzter Zeit werden zunehmend auch Methoden mit Bootstrapping-Algorithmen verwendet. Diese Methoden beruhen auf Schätzungen einer empirischen Varianzverteilung ausgehend von den gemessenen Daten und von häufigen Stichproben unter Einsatz eines Zufalls-Nummerngenerators.

LITERATUR

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R., und Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

Bruce, R..D., und Versteeg,, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A., und Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.“

(4) Kapitel C.11 erhält folgende Fassung:

„C.11. Belebtschlamm, Prüfung der Atmungshemmung (Kohlenstoff- und Ammoniumoxidation)“

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 209 (2010). Sie beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Auswirkungen einer Chemikalie auf Mikroorganismen (im Wesentlichen Bakterien) in Belebtschlamm durch Messung der Respirationsrate (Kohlenstoff- und/oder Ammoniumoxidation) unter definierten Bedingungen und bei unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfchemikalie. Die Prüfmethode beruht auf dem ETAD-Test (ETAD = *Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing industry*) (1)(2), auf der vorherigen OECD-Prüfrichtlinie 209 (3) und auf der geänderten ISO-Norm 8192 (4). Zweck dieser Methode ist die Schaffung eines schnellen Auswahlverfahrens, mit dem sich die Auswirkungen von Chemikalien auf die im Belebtschlamm der biologischen (aeroben) Phase von Kläranlagen enthaltenen Mikroorganismen feststellen lassen. Die Testergebnisse können auch als Indikator für geeignete Konzentrationen der in Tests zur biologischen Abbaubarkeit (siehe z. B. Kapitel C.4 A-F, C.9, C.10, C.12 und C.29 sowie OECD TG 302C) zu verwendenden Prüfchemikalien ohne Inhibitionswirkung dienen. In diesem Fall kann der Test als Auswahltest etwa wie ein Vorversuch oder ein Limit-Test (siehe Nummer 39) durchgeführt werden, bei dem nur die Gesamtrespiration berücksichtigt wird. Bei Prüfungen auf leichte biologische Abbaubarkeit (Kapitel C.4 A-F und Kapitel C.29), bei denen die Konzentration des Inokulums erheblich geringer ist als bei der vorliegenden Prüfmethode, sind diese Informationen allerdings mit Vorsicht zu bewerten. Wenn in diesem Respirationstest keine Hemmung festgestellt wird, bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass auch bei der Prüfung auf leichte biologische Abbaubarkeit gemäß den Kapiteln C.4 A-F oder C.29 keine Hemmung gegeben wäre.
2. Insgesamt wird die Prüfung der Atmungshemmung seit ihrer erstmaligen Veröffentlichung offenbar erfolgreich durchgeführt; gelegentlich wurde allerdings auch von falschen Ergebnissen berichtet (siehe z. B. (2)(4)(5)). Kurven, die die Respiration in Abhängigkeit von der Konzentration aufzeigen, verlaufen manchmal biphasisch, Darstellungen der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden verzerrt, und EC₅₀-Werte waren außergewöhnlich niedrig (5). In Untersuchungen wurde festgestellt, dass diese Ergebnisse dann ermittelt wurden, wenn der in der Prüfung verwendete Belebtschlamm stark nitrifiziert und wenn die Prüfchemikalie sich stärker auf die Ammoniumoxidation auswirkt als auf die allgemeine heterotrophe Oxidation. Bei diesen falschen Ergebnissen können zusätzliche Prüfungen mit einem spezifischen Nitrifikationshemmer durchgeführt werden. Durch die Messung der Sauerstoffverbrauchsraten mit und ohne diese Hemmstoffe (z. B. N-Allylthioharnstoff (ATU)) können die gesamte und die heterotrophe Sauerstoffverbrauchsraten und die Sauerstoffverbrauchsraten durch Nitrifikation berechnet werden (4)(7)(8). Bei beiden Prozessen kann also die Hemmung durch eine Prüfchemikalie ermittelt werden, und die EC₅₀-Werte können sowohl für die

Oxidation von organischem Kohlenstoff (heterotroph) als auch für die Ammoniumoxidation (Nitrifikation) wie gewohnt berechnet werden. In seltenen Fällen kann die hemmende Wirkung von N-Allylthioharnstoff durch die Komplexbildung mit Prüfchemikalien oder Mediumzusätzen, z. B. Cu^{++} -Ionen (6), teilweise oder vollständig aufgehoben werden. Cu^{++} -Ionen sind für *Nitrosomonas* von entscheidender Bedeutung; in höheren Konzentrationen sind sie allerdings giftig.

3. Die Nitrifikation bei der aeroben Behandlung von Abwässern als unumgänglicher Schritt bei der Abtrennung von Stickstoffverbindungen aus Abwässern durch Denitrifikation in gasförmige Produkte hat in europäischen Ländern besondere Bedeutung erlangt. Inzwischen hat die EU niedrigere Grenzwerte für die Stickstoffkonzentration in behandelten Abwässern festgesetzt, die in aufnehmende Gewässer eingeleitet werden¹.
4. Für die meisten Zwecke reicht es aus, nur die Auswirkungen auf die Mechanismen der Oxidation organischen Kohlenstoffs zu bewerten. Manchmal müssen jedoch die Auswirkungen auf die Nitrifikation allein oder auf die Nitrifikation und die Oxidation organischen Kohlenstoffs getrennt geprüft werden, um die Ergebnisse angemessen interpretieren und die Auswirkungen richtig verstehen zu können.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

5. Die Respirationsraten von mit synthetischem Abwasser beschickten Belebtschlammproben werden nach einer Kontaktzeit von drei Stunden in einer geschlossenen Zelle mit einer Sauerstoffelektrode gemessen. Wenn ein realistisches Expositionsszenarium zugrunde gelegt wird, können auch längere Kontaktzeiten angemessen sein. Wenn die Prüfchemikalie rasch abgebaut wird (z. B. abiotisch durch Hydrolyse) oder flüchtig ist und sich keine angemessene Konzentration aufrechterhalten lässt, kann die Expositionsdauer auch reduziert werden (auf beispielsweise 30 Minuten). Die Empfindlichkeit der einzelnen Belebtschlammproben ist am Tag der Exposition anhand einer geeigneten Referenzchemikalie zu prüfen. Mit der Prüfung wird gewöhnlich der EC_x -Wert (z. B. EC_{50}) der Prüfchemikalie und/oder die höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete Wirkung (NOEC) ermittelt.
6. Die Hemmung der Sauerstoffaufnahme durch Mikroorganismen, die organischen Kohlenstoff oxidieren, kann getrennt von derjenigen durch Ammonium oxidierende Mikroorganismen bestimmt werden; dazu ist die Sauerstoffverbrauchsrate mit und ohne N-Allylthioharnstoff zu messen; N-Allylthioharnstoff ist ein spezifischer Hemmstoff, der der Oxidation von Ammonium zu Nitrit durch Nitritbakterien (Stufe 1) entgegenwirkt. In diesem Fall wird die prozentuale Hemmung der

¹ Richtlinie 91/271/EWG des Rates vom 21. Mai 1991 über die Behandlung von kommunalem Abwasser; ABl. L 135 vom 30.5.1991, S. 40–52.

Sauerstoffverbrauchsrate durch einen Vergleich der Sauerstoffverbrauchsrate in Gegenwart der Prüfchemikalie mit der mittleren Sauerstoffverbrauchsrate der entsprechenden Kontrollen ohne Prüfchemikalie berechnet, beides jeweils mit und ohne den spezifischen Inhibitor N-Allylthioharnstoff.

7. Ein etwaiger Sauerstoffverbrauch aufgrund abiotischer Prozesse kann nachgewiesen werden, indem die jeweilige Verbrauchsrate in Mischungen aus Prüfchemikalie, synthetischem Abwassermedium und Wasser, aber ohne Belebtschlamm, ermittelt wird.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

8. Die Kenndaten (vorzugsweise die CAS-Nummer), die Bezeichnung (IUPAC), die Reinheit, die Wasserlöslichkeit, der Dampfdruck, die Flüchtigkeit und das Adsorptionsverhalten der Prüfchemikalie müssen bekannt sein, damit die Ergebnisse richtig interpretiert werden können. Im Allgemeinen können flüchtige Chemikalien nur dann angemessen geprüft werden, wenn spezielle Vorkehrungen getroffen wurden (siehe Nummer 21).

ANWENDBARKEIT DER PRÜFMETHODE

9. Die Prüfmethode kann bei wasserlöslichen, schlecht löslichen und flüchtigen Chemikalien angewendet werden. Bei Chemikalien mit eingeschränkter Löslichkeit ist es jedoch unter Umständen nicht immer möglich, EC_{50} -Werte zu ermitteln. Gültige Ergebnisse für flüchtige Chemikalien lassen sich manchmal nur dann erzielen, wenn die Prüfchemikalie am Ende der Expositionsdauer immer noch größtenteils (d. h. $> 80\%$) im Reaktionsgemisch enthalten ist. Bei Unsicherheiten hinsichtlich der Stabilität oder der Flüchtigkeit der Prüfchemikalie sollten zusätzliche Analysedaten vorgelegt werden, um die EC_x -Konzentration genauer zu bestimmen.

REFERENZCHEMIKALIEN

10. Referenzchemikalien müssen regelmäßig geprüft werden, um die Zuverlässigkeit der Prüfmethode und der Prüfbedingungen sicherzustellen und um die Empfindlichkeit der einzelnen Belebtschlammproben zu prüfen, die am Expositionstag als Inokulum verwendet werden. Als Referenz-Hemmstoff wird 3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP) empfohlen; diese Chemikalie ist ein bekannter Inhibitor der Respiration und wird in zahlreichen Inhibitions- und Toxizitätstests verwendet (4). In Verbindung mit der Hemmung der Gesamtrespiration kann als Referenzchemikalie auch Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat verwendet werden (9). N-Methylanilin ist als spezifische Referenzchemikalie zur Nitritifikationshemmung geeignet (4).

VALIDITÄTSKRITERIEN UND REPRODUZIERBARKEIT

11. Die Sauerstoffverbrauchsrate der Blindkontrollen (ohne Prüfchemikalie und ohne Referenzchemikalien) muss pro Stunde mindestens 20 mg Sauerstoff pro Gramm Belebtschlamm (Trockenmasse der suspendierten Feststoffe) betragen. Bei geringerer Sauerstoffverbrauchsrate ist der Test mit gewaschenem Belebtschlamm oder mit Schlamm anderer Herkunft zu wiederholen. Der Variationskoeffizient der Sauerstoffverbrauchsrate der Kontrollreplikate darf am Ende des definitiven Tests höchstens bei 30 % liegen.
12. 2004 hat die ISO einen internationalen Ringtest mit Belebtschlamm aus häuslichen Abwässern organisiert (4); in diesem Test wurde für 3,5-DCP ein EC_{50} -Wert im Bereich von 2 bis 25 mg/l für die Gesamtrespiration, von 5 bis 40 mg/l für die heterotrophe Respiration und von 0,1 bis 10 mg/l für die Nitrifikationsrespiration ermittelt. Wenn der EC_{50} -Wert für 3,5-DCP nicht im erwarteten Bereich liegt, ist der Test mit Belebtschlamm anderer Herkunft zu wiederholen. Der EC_{50} -Wert für Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat muss für die Gesamtrespiration bei 53 bis 155 mg/l liegen (9).

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Prüfgefäße und Apparatur

13. Für die Prüfung sind gewöhnliche Laborausrüstung sowie folgende Materialien zu verwenden:
 - a) Prüfgefäße – z. B. 1000-ml-Bechergläser für jeweils 500 ml Reaktionsgemisch (siehe Nummer 5 in Abb. 1);
 - b) Zellen und Zubehör zur Messung der Konzentration des gelösten Sauerstoffs, eine geeignete Sauerstoffelektrode, eine geschlossene Zelle zur Aufnahme der Probe ohne Kopfraum (*headspace*) und ein Aufzeichnungsgerät (z. B. Nummern 7, 8, 9 in Abb. 1, Anlage 2). Alternativ kann eine BSB-Flasche mit geeigneter Übergangsstülle zur Abdichtung der Sauerstoffelektrode zum Flaschenhals verwendet werden (siehe Abb. 2 in Anlage 3). Um zu vermeiden, dass beim Einsetzen der Sauerstoffelektrode Flüssigkeit austritt, sollte zunächst ein Trichter oder ein Glasröhrchen durch die Tülle geschoben werden; statt dessen können auch Gefäße mit gebördeltem Rand verwendet werden. In beiden Fällen sind ein Magnetrührer oder ein alternatives Rührverfahren zu verwenden (z. B. eine selbstrührende Sonde);
 - c) Magnetrührer und Rührfisch mit einem Überzug aus inertem Material zur Verwendung in der Messkammer und/oder in den Prüfgefäßen;
 - d) Belüftungseinrichtung: Erforderlichenfalls müssen Staub und Öl mit Druckluft unter Verwendung eines geeigneten Filters abgetrennt werden; außerdem sind Waschflaschen mit Wasser zur Luftbefeuchtung gegebenenfalls mit Druckluft zu beaufschlagen. Die Gefäße sind mit Pasteur-Pipetten oder sonstigen Belüftungseinrichtungen zu belüften, die keine Chemikalien adsorbieren. Mit einer Schüttelmaschine mit Rundschüttelbewegung mit einer Drehzahl zwischen 150 und 250 min^{-1} und mit Flaschen mit einem Volumen von z. B. 2000 ml kann der Sauerstoffbedarf des

Schlamms gedeckt werden; außerdem können mit dieser Schüttelmaschine Probleme bei Chemikalien überwunden werden, die übermäßig schäumen, die flüchtig sind und daher verlorengehen können oder schwierig zu dispergieren sind, wenn die Belüftung durch Druckluftspeisung (*Air Sparging*) erfolgt. Das Prüfsystem umfasst gewöhnlich eine Reihe kontinuierlich belüfteter und nacheinander (z. B. in Intervallen von 10 bis 15 Minuten) angesetzter Bechergläser, die dann der Reihe nach analysiert werden. Wahlweise können auch validierte Geräte verwendet werden, die für eine gleichzeitige Belüftung und Messung der Sauerstoffverbrauchsrate der Mischung ausgelegt sind;

e) pH-Messgerät;

f) Zentrifuge, normale Tischzentrifuge zur Zentrifugierung von Schlämmen mit $10\,000\text{ m/s}^2$.

Reagenzien

14. Für die Prüfungen sind grundsätzlich Reagenzien in Analysequalität zu verwenden.

Wasser

15. Wenn nicht ausdrücklich chlorfreies Leitungswasser vorgeschrieben ist, muss destilliertes oder entionisiertes Wasser mit weniger als 1 mg/l gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC) verwendet werden.

Versorgung mit synthetischem Abwasser

16. Das Medium ist so zuzubereiten, dass die folgenden Bestandteile in den jeweils genannten Anteilen enthalten sind:

- Pepton	16 g
- Fleischextrakt (oder ein vergleichbarer Pflanzenextrakt)	11 g
- Harnstoff	3 g
- Natriumchlorid (NaCl)	0,7 g
- Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$)	0,4 g
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
- wasserfreies Kaliummonohydrogenphosphat (K_2HPO_4)	2,8 g
- destilliertes oder entionisiertes Wasser q.s.p.	1 Liter

17. Der pH-Wert dieser Lösung muss bei $7,5 \pm 0,5$ liegen. Wenn das hergestellte Medium nicht sofort verwendet wird, kann es bei 0 bis $4\text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln höchstens eine Woche gelagert werden; alternativ kann die Lagerung auch unter anderen Bedingungen erfolgen, bei denen sich die Zusammensetzung nicht verändert. Dieses synthetische Abwasser hat die hundertfache Konzentration des im technischen Bericht der OECD vom 11. Juni 1976 „Vorgeschlagenes Verfahren zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von Tensiden in synthetischen Detergenzien“ beschriebenen Abwassers und enthält außerdem Dikaliumhydrogenphosphat.

18. Alternativ können die Bestandteile des Mediums vor der Lagerung getrennt sterilisiert werden, oder das Pepton und der Fleischextrakt werden erst kurz vor der Durchführung der Prüfung hinzugegeben. Vor der Verwendung ist das Medium

gründlich zu mischen und der pH-Wert erforderlichenfalls auf $7,5 \pm 0,5$ einzustellen.

Prüfchemikalie

19. Eine Stammlösung ist für leicht wasserlösliche Prüfstoffe nur bis zur maximalen Wasserlöslichkeit herzustellen. (Ausfällungen sind nicht annehmbar.) In Wasser schlecht lösliche Stoffe, Gemische mit Bestandteilen mit unterschiedlicher Wasserlöslichkeit und adsorptive Stoffe sind direkt in die Prüfgefäße einzuwiegen. In diesen Fällen kann die Verwendung von Stammlösungen eine Alternative sein, wenn gelöste Konzentrationen der Prüfchemikalien in den Prüfgefäßen analytisch bestimmt werden (bevor der Belebtschlamm hinzugegeben wird). Wenn WAFs (*Water-Accommodated Fractions*) hergestellt werden, ist auch eine analytische Bestimmung der aufgelösten Konzentrationen der Prüfchemikalien in den Prüfgefäßen von wesentlicher Bedeutung. Bei Verwendung organischer Lösungsmittel sind Dispergiemittel/Emulgatoren zur Verbesserung der Löslichkeit zu vermeiden. Stammlösungen können einer Ultraschallbehandlung unterzogen werden, und Suspensionen können vorgerührt werden (z. B. über Nacht), wenn geeignete Informationen über die Stabilität der jeweiligen Prüfchemikalie unter den betreffenden Bedingungen verfügbar sind.
20. Die Prüfchemikalie kann den pH-Wert im Prüfsystem beeinträchtigen. Der pH-Wert der mit der Prüfchemikalie behandelten Mischungen ist vor der Herstellung des Versuchsaufbaus in einem Vorversuch zu bestimmen, um zu prüfen, ob der pH-Wert vor der eigentlichen Prüfung sowie nochmals am Tag der eigentlichen Prüfung eingestellt werden muss. Lösungen/Suspensionen der Prüfchemikalie in Wasser sind erforderlichenfalls vor Hinzugabe des Inokulums zu neutralisieren. Da die Neutralisierung jedoch die chemischen Merkmale der Chemikalie ändern kann, könnten je nach Zweck der Untersuchung weitere Prüfungen durchgeführt werden, um die Auswirkungen der Prüfchemikalie auf den Schlamm ohne Einstellung des pH-Wertes zu ermitteln.
21. Infolge von Stoffverlusten während der Expositionsdauer können die toxischen Wirkungen flüchtiger Chemikalien insbesondere bei Prüfungen, bei denen Luft durch das System geperlt wird, unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Bei den betreffenden Stoffen ist Vorsicht geboten; in diesen Fällen sind stoffspezifische Analysen von Kontrollmischungen vorzunehmen, in denen der jeweilige Stoff enthalten ist, und die Belüftung ist entsprechend zu modifizieren.

Referenzchemikalie

22. Wenn 3,5-Dichlorphenol als Referenzchemikalie verwendet wird, ist eine Lösung aus 1,00 g 3,5-Dichlorphenol auf 1000 ml Wasser herzustellen (15). Die Auflösung ist durch warmes Wasser und/oder eine Ultraschallbehandlung zu beschleunigen; nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur ist die Lösung auf das vorgesehene Volumen aufzufüllen. Es muss allerdings sichergestellt werden, dass sich die Struktur der Referenzchemikalie nicht geändert hat. Der pH-Wert der Lösung wird geprüft und gegebenenfalls mit NaOH oder H₂SO₄ auf 7-8 eingestellt.

23. Wenn Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat als Referenzchemikalie vorgesehen ist, sind Konzentrationen von 58 mg/l, 100 mg/l und 180 mg/l (Faktor 1,8) zu verwenden. Der Stoff wird unmittelbar in die Prüfgefäße eingewogen (29 – 50 – 90 mg bei einem Gesamtvolumen von 500 ml). Anschließend wird der Stoff in 234 ml autoklaviertem Leitungswasser aufgelöst. Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat ist leicht löslich. Nach Beginn der Prüfung werden 16 ml synthetisches Abwasser und 250 ml Belebtschlamm hinzugegeben.

Spezifischer Nitrifikationshemmer

24. Es wird eine Stammlösung mit 2,32 g N-Allylthioharnstoff (ATU) pro Liter hergestellt. Die Hinzugabe von 2,5 ml dieser Stammlösung zu einem Inkubationsgemisch mit einem Endvolumen von 500 ml führt zu einer Endkonzentration von 11,6 mg ATU/l (10^{-4} mol/l); diese Konzentration ist erfahrungsgemäß hinreichend (4), um eine vollständige Hemmung der Nitrifikation in einem nitrifizierenden Belebtschlamm mit 1,5 g/l suspendierten Stoffen zu bewirken.

Abiotische Kontrolle

25. Unter gewissen seltenen Bedingungen kann eine Prüfchemikalie mit starker Reduktionswirkung einen messbaren abiotischen Sauerstoffverbrauch verursachen. In diesen Fällen sind abiotische Kontrollen erforderlich, um zwischen der abiotischen Sauerstoffaufnahme durch die Prüfchemikalie und dem Sauerstoffverbrauch durch Mikroorganismen unterscheiden zu können. Abiotische Kontrollen können hergestellt werden, indem bei den Prüfmischungen auf das Inokulum verzichtet wird. Ebenso können abiotische Kontrollen ohne Inokulum verwendet werden, wenn unterstützende analytische Messungen vorgenommen werden, um die erzielte Konzentration in der Expositionsphase der Prüfung zu bestimmen (z. B. bei Verwendung von Stammlösungen von schlecht wasserlöslichen Chemikalien mit Bestandteilen mit unterschiedlicher Wasserlöslichkeit. In speziellen Fällen kann die Herstellung einer abiotischen Kontrolle mit einem (z. B. durch Autoklavieren oder durch Hinzugabe sterilisierender Giftstoffe) sterilisierten Inokulum erforderlich sein. Manche Chemikalien können Sauerstoff nur dann erzeugen oder verbrauchen, wenn die Oberfläche hinreichend groß für eine Reaktion ist, selbst dann, wenn die Chemikalien dazu normalerweise eine erhebliche höhere Temperatur oder einen erheblich höheren Druck benötigen. In diesem Zusammenhang ist bei Peroxiden besondere Aufmerksamkeit geboten. Ein sterilisiertes Inokulum besitzt eine große Oberfläche.

Inokulum

26. Im Allgemeinen wird Belebtschlamm am Auslass des Belüftungsbeckens oder in der Nähe des Auslasses am Becken einer ordnungsgemäß betriebenen Kläranlage entnommen, in der hauptsächlich häusliche Abwässer aufbereitet werden. Je nach Zweck des Tests können auch sonstige geeignete Typen von Belebtschlamm oder Belebtschlamm sonstiger Herkunft mit geeigneten Konzentrationen an suspendierten Stoffen (2-4 g/l) verwendet werden. Schlämme aus unterschiedlichen

Behandlungsanlagen dürften jedoch unterschiedliche Merkmale aufweisen und unterschiedlich empfindlich sein.

27. Der Schlamm kann wie entnommen verwendet werden; grobe Teilchen sind jedoch durch kurzzeitiges Ausfällen (etwa 5-15 Minuten) und Dekantieren der oberen Schicht der feineren Feststoffe oder durch Sieben (z. B. mit einer Maschenweite von 1 mm²) abzutrennen. Alternativ kann der Schlamm in einem Mischer mindestens etwa 15 Sekunden homogenisiert werden; dabei sind jedoch die Scherkräfte und die Temperaturänderung zu beachten, die bei längerer Mischdauer auftreten können.
28. Häufig muss der Schlamm gewaschen werden (z. B. bei geringer endogener Respirationsrate). Zunächst ist der Schlamm zu zentrifugieren, bis ein klarer Überstand entsteht und sich aus den Feststoffen des Abwassers ein Pellet bildet (z. B. nach 10 Minuten mit etwa 10 000 m/s²). Die überstehende Flüssigkeit wird entfernt und der Schlamm in chlorfreiem Leitungswasser unter Schütteln resuspendiert; anschließend ist das Waschwasser durch Zentrifugieren abzutrennen und ebenfalls zu entfernen. Erforderlichenfalls ist der Wasch- und Zentrifugiervorgang zu wiederholen. Die Trockenmasse eines bekannten Volumens des resuspendierten Schlammes wird ermittelt, und der Schlamm wird unter Abtrennen der Flüssigkeit konzentriert oder in chlorfreiem Leitungswasser weiter verdünnt, bis er die erforderliche Feststoffkonzentration von 3 g/l aufweist. Der Belebtschlamm ist bei der Testtemperatur und möglichst am Tag der Entnahme kontinuierlich zu belüften (z. B. mit 2 l/Minute). Wenn dies nicht möglich ist, muss dem Schlamm das synthetische Abwasser (50 ml synthetisches Abwasser/l Belebtschlamm) zwei weitere Tage lang täglich zugeführt werden. Anschließend wird der Schlamm für die Prüfung verwendet, und die Ergebnisse sind als gültig anzunehmen, sofern keine signifikante Änderung der Aktivität des Schlammes zu verzeichnen sind; dies ist anhand der endogenen heterotrophen Respirationsrate und der Respirationsrate durch Nitrifikation zu beurteilen.
29. Schwierigkeiten können sich ergeben, wenn es bei der Inkubation zu derartiger Schaumbildung kommt, dass der Schaum und die mit dem Schaum verbundenen Feststoffe des Schlammes aus den Belüftungsgefäßen herausgedrückt werden. Gelegentlich ist ein Schäumen einfach auf das Vorhandensein des synthetischen Abwassers zurückzuführen, aber wenn die Prüfchemikalie aus einem Tensid besteht oder ein Tensid enthält, ist mit Schaumbildung zu rechnen. Der Verlust von Schlamm-Feststoffen aus den Prüfmischungen hat eine künstliche Reduzierung der Respirationsrate zur Folge, die fälschlicherweise als Ergebnis einer Hemmung ausgelegt werden könnte. Außerdem bewirkt die Belüftung der Tensidlösung eine Konzentration der Tenside in der Schaumschicht; der Verlust des Schaums aus dem Prüfsystem reduziert die Expositionskonzentrationen. Die Schaumbildung kann durch einfache mechanische Methoden (z. B. durch gelegentliches manuelles Rühren mit einem Glasstab) oder durch Zugabe eines tensidfreien Silikon-Antischaummittels und/oder durch Belüftung mit einem Schüttelkolben kontrolliert werden. Wenn das Problem auf das Vorhandensein des synthetischen Abwassers zurückzuführen ist, muss die Zusammensetzung des Abwassers geändert werden, indem ein Antischaum-Reagenz zugesetzt wird (z. B. 50 µl/l). Ist die

Schaumbildung auf die Prüfchemikalie zurückzuführen, muss die für eine Reduzierung der Schaumbildung erforderliche Menge bei der maximalen Prüfkonzentration ermittelt werden; anschließend sind alle Prüfgefäße in identischer Weise zu behandeln (einschließlich der Prüfgefäße – etwa Blindkontrollen und Referenzgefäßen ohne Schaum). Wenn Antischaummittel verwendet werden, darf es nicht zu Wechselwirkungen mit dem Inokulum und/oder mit der Prüfchemikalie kommen.

PRÜFVERFAHREN

30. Die Hemmung kann für drei Arten von Sauerstoffverbrauch bestimmt werden: den Gesamtverbrauch, den heterotrophen Sauerstoffverbrauch und den Verbrauch durch Nitrifikation. Im Allgemeinen ist die Messung der Hemmung des Gesamtsauerstoffverbrauchs ausreichend. Die Auswirkungen der Oxidation organischen Kohlenstoffs einerseits und der Ammoniumoxidation andererseits auf den heterotrophen Sauerstoffverbrauch müssen aber bestimmt werden, wenn für eine bestimmte Chemikalie eine getrennte Bewertung dieser beiden Endpunkte erforderlich ist oder wenn (optional) atypische Dosis-Wirkungs-Kurven der Hemmung des Gesamtsauerstoffverbrauchs erklärt werden sollen.

Prüfbedingungen

31. Die Prüfung ist bei einer Temperatur von 20 ± 2 °C vorzunehmen.

Prüfmischungen

32. Prüfmischungen (F_T wie in Tabelle 1), die Wasser, synthetisches Abwasser und die Prüfchemikalie enthalten, sind mit verschiedenen nominellen Konzentrationen der Prüfchemikalie herzustellen (siehe Tabelle 1 für Beispiele von Volumina der Bestandteile). Erforderlichenfalls ist der pH-Wert auf $7,5 \pm 0,5$ einzustellen; die Mischungen werden mit Wasser verdünnt, und anschließend wird das Inokulum hinzugegeben, um in den Gefäßen gleiche Endvolumina herzustellen und mit der Belüftung beginnen zu können.

Referenzmischungen

33. Diese Mischungen (F_R) sind mit der Referenzchemikalie (z. B. mit 3,5-Dichlorphenol) anstelle der Prüfchemikalie auf die gleiche Weise herzustellen wie die Prüfmischungen.

Blindkontrollen

34. Bei Tests, bei denen die Prüfgefäße nacheinander in regelmäßigen Abständen vorbereitet werden, sind zu Beginn und am Ende der Expositionsdauer Blindkontrollen (F_B) vorzunehmen. Wenn Prüfungen mit Geräten vorgenommen werden, die gleichzeitige Messungen des Sauerstoffverbrauchs zulassen, sind für jede Gruppe gleichzeitiger Analysen mindestens zwei Blindkontrollen einzubeziehen. Blindkontrollen enthalten jeweils gleiche Volumina des

Belebtschlamm und des synthetischen Mediums, jedoch weder die Prüfchemikalie noch die Referenzchemikalie. Sie sind mit Wasser auf das gleiche Volumen wie die Prüf- und die Referenzmischungen zu verdünnen.

Abiotische Kontrolle

35. Wenn erforderlich (beispielsweise wenn von einer Prüfchemikalie bekannt oder anzunehmen ist, dass sie stark reduzierende Eigenschaften hat), muss ein Gemisch F_A hergestellt werden, um den abiotischen Sauerstoffverbrauch zu messen. Das Gemisch muss die gleichen Mengen der Prüfchemikalie und des synthetischen Abwassers enthalten und das gleiche Volumen wie die Prüfmischungen haben, darf aber keinen Belebtschlamm enthalten.

Allgemeines Verfahren und Messungen

36. Prüfmischungen, Referenzmischungen, die Blindkontrollen und die abiotischen Kontrollen werden bei der Testtemperatur inkubiert und zwangsbelüftet (0,5 bis 1 l/min), um die Konzentration des gelösten Sauerstoffs über 60–70 % zu halten und die Suspendierung der Schlammflocken aufrechtzuerhalten. Um die Schlammflocken in Suspension zu halten, müssen die Kulturen zudem gerührt werden. Die Inkubation gilt als begonnen, wenn das Belebtschlamm-Inokulum mit den anderen Bestandteilen des endgültigen Gemischs in Kontakt kommt. Am Ende der Inkubation werden die Proben nach Ablauf der vorgesehenen Expositionsdauer von gewöhnlich drei Stunden entnommen, um in einer für diesen Zweck entwickelten Zelle (Abbildung 2 in Anlage 3) oder in einer vollständig gefüllten BSB-Flasche die Geschwindigkeit der Abnahme der Konzentration des gelösten Sauerstoffs zu messen. Auf welche Weise die Inkubationen beginnen, hängt auch von der Kapazität der Ausrüstung ab, mit der die Sauerstoffverbrauchsraten gemessen werden. Wenn die Ausrüstung beispielsweise nur eine einzelne Sauerstoffsonde enthält, werden die Messungen getrennt vorgenommen. In diesem Fall werden die für die Prüfung in synthetischem Abwasser benötigten Mischungen ohne Zugabe des Inokulums hergestellt, und die jeweils benötigten Anteile Schlamm werden in alle Gefäße der jeweiligen Reihe gegeben. Die Inkubation der Proben wird nacheinander in angemessenen Intervallen (z. B. 10 bis 15 Minuten) gestartet. Das Messsystem kann auch mehrere Sonden enthalten, was die Durchführung mehrerer gleichzeitiger Messungen erleichtert; in diesem Fall kann das Inokulum den Gefäßen der betreffenden Gruppen gleichzeitig hinzugegeben werden.
37. Die Belebtschlamm-Konzentration liegt bei allen Prüf-, Referenz- und Blindmischungen (nicht aber bei der abiotischen Kontrolle) bei nominell 1,5 g/l suspendierte Feststoffe. Der Sauerstoffverbrauch ist nach dreistündiger Exposition zu messen. Gegebenenfalls sind weitere Messungen nach jeweils 30-minütiger Exposition vorzunehmen, wie unter Nummer 5 beschrieben.

Nitrifikationspotenzial des Schlamm

38. Um festzustellen, ob der Schlamm nitrifiziert und mit welcher Geschwindigkeit diese Nitrifikation gegebenenfalls erfolgt, werden Mischungen (F_B) wie die

Mischungen für die Blindkontrollen und die zusätzlichen „Kontrollen“ (F_N) hergestellt, die jedoch ebenfalls N-Allylthioharnstoff in einer Konzentration von 11,6 mg/l enthalten. Die Mischungen sind zu belüften und 3 Stunden bei $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ zu inkubieren. Anschließend wird der Sauerstoffverbrauch gemessen, und die Sauerstoffverbrauchsrate durch Nitrifikation wird berechnet.

Prüfprotokolle

Vorversuch

39. Erforderlichenfalls wird mit einem Vorversuch die Größenordnung der Konzentrationen der Prüfchemikalie ermittelt, die in einem definitiven Test zur Bestimmung der Hemmung des Sauerstoffverbrauchs benötigt werden. Alternativ kann durch die Tatsache, dass in einem Vorversuch keine Hemmung des Sauerstoffverbrauchs durch die Prüfchemikalie festgestellt wurde, belegt werden, dass ein definitiver Test nicht erforderlich ist. In diesem Fall werden drei Proben mit der höchsten im Vorversuch geprüften Konzentration (in der Regel 1000 mg/l, jedoch abhängig von den Datenanforderungen) einbezogen.

Tabelle 1: Beispiele für Mischungen für den Vorversuch

Reagenz	Ausgangskonzentration				
Stammlösung der Prüfchemikalie	10 g/l				
Stammlösung des synthetischen Mediums	Siehe Nummer 16				
Stammlösung mit Belebtschlamm	3 g/l suspendierte Feststoffe				
Bestandteile von Mischungen	Dosierung in Prüfgefäße (a)				
	F_{T1}	F_{T2}	F_{T3-5}	F_{B1-2}	F_A
Stammlösung der Prüfchemikalie (ml) (Nummern 19 bis 21)	0,5	5	50	0	50
Stammlösung mit synthetischem Abwasser (ml) (Nummer 16)	16	16	16	16	16
Belebtschlamm-Suspension (ml) (Nummern 26 bis 29)	250	250	250	250	0
Wasser (Nummer 15)	233,5	229	184	234	434
Gesamtvolumen der Mischungen (ml)	500	500	500	500	500
Konzentrationen in der Mischung					
Prüfsuspension (mg/l)	10	100	1000	0	1000
Belebtschlamm (suspendierte Feststoffe) (mg/l)	1500	1500	1500	1500	0
(a) Auf dieselbe Weise ist mit der Referenzchemikalie zu verfahren (Gefäße F_{R1-3}).					

40. Die Prüfung ist unter Verwendung von mindestens drei Konzentrationen der Prüfchemikalie (z. B. 10 mg/l, 100 mg/l und 1000 mg/l) und mit einer Blindkontrolle sowie erforderlichenfalls mit mindestens drei abiotischen Kontrollen

mit den höchsten Konzentrationen der Prüfchemikalie vorzunehmen (siehe z. B. Tabelle 1). Im Idealfall hat die niedrigste Konzentration keine Auswirkungen auf den Sauerstoffverbrauch. Gegebenenfalls sind die Sauerstoffverbrauchsrate und die Nitrifikationsrate zu berechnen; anschließend wird die prozentuale Hemmung berechnet. Je nach Zweck der Prüfung ist es auch möglich, nur die Toxizität einer Grenzkonzentration (z. B. 1000 mg/l) zu bestimmen. Wenn bei diesen Konzentrationen keine statistisch signifikante toxische Wirkung auftritt, brauchen keine weiteren Prüfungen mit höheren oder niedrigeren Konzentrationen mehr vorgenommen zu werden. Schlecht wasserlösliche Stoffe, Mischungen mit Bestandteilen mit unterschiedlicher Wasserlöslichkeit und adsorptive Stoffe sind direkt in die Prüfgefäße einzuwiegen. In diesem Fall ist das für die Stammlösung mit dem Prüfstoff vorgesehene Volumen durch Verdünnungswasser zu ersetzen.

Definitiver Test

Hemmung des Gesamtsauerstoffverbrauchs

41. Die Prüfung wird mit einer Reihe von Konzentrationen durchgeführt, die im Vorversuch ermittelt wurden. Um sowohl eine NOEC als auch einen EC_x -Wert (z. B. EC_{50}) zu erhalten, sind meist sechs Kontrollen und fünf Behandlungskonzentrationen in einer geometrischen Reihe mit fünf Replikaten zu empfehlen. Die abiotische Kontrolle braucht nicht wiederholt zu werden, wenn im Vorversuch kein Sauerstoffverbrauch festgestellt wurde; wenn jedoch ein signifikanter Sauerstoffverbrauch zu verzeichnen ist, sind für jede Konzentration der Prüfchemikalie abiotische Kontrollen einzubeziehen. Die Empfindlichkeit des Schlammes ist mithilfe der Referenzchemikalie 3,5-Dichlorphenol zu prüfen. Da diese Empfindlichkeit erfahrungsgemäß schwankt, muss sie bei jeder Testreihe geprüft werden. In jedem Fall werden nach drei Stunden sowie erforderlichenfalls nochmals nach 30 Minuten Proben aus den Prüfgefäßen entnommen, um den Sauerstoffverbrauch in der Zelle mit der Sauerstoffelektrode zu messen. Aus den erfassten Daten werden die spezifischen Respirationsraten der Kontroll- und der Prüfmischungen berechnet. Die prozentuale Hemmung ist mit der nachstehenden Gleichung 7 zu ermitteln.

Unterscheidung zwischen der Hemmung der heterotrophen Respiration und der Nitrifikation

42. Die Verwendung des spezifischen Nitrifikationshemmers ATU ermöglicht die unmittelbare Beurteilung der hemmenden Wirkung von Prüfchemikalien auf die heterotrophe Oxidation. Die Auswirkungen auf die Nitrifikationsrate können durch Subtraktion der Sauerstoffverbrauchsrate in Gegenwart mit ATU von der Gesamtverbrauchsrate (ohne ATU) berechnet werden. Zwei Reihen von Reaktionsmischungen sind nach den Prüfprotokollen zur Ermittlung des EC_x -Wertes bzw. der NOEC herzustellen, wie unter Nummer 41 beschrieben; außerdem ist jedem Gemisch in einer der beiden Reihen ATU in einer Endkonzentration von 11,6 mg/l zuzugeben. (Von dieser Konzentration ist belegt, dass die Nitrifikation in Schlamm mit Konzentrationen suspendierter Feststoffe von bis zu 3000 mg/l vollständig gehemmt wird (4).) Am Ende des Expositionszeitraums werden die Sauerstoffverbrauchsraten gemessen; diese direkten Werte geben nur Aufschluss

über die heterotrophe Respiration. Die Differenz zwischen diesen Werten und den entsprechenden Gesamtrespirationsraten entspricht der Nitrifikation. Anschließend werden die unterschiedlichen Grade der Hemmung berechnet.

Messungen

43. Nach den jeweiligen Expositionszeiten wird eine Probe aus dem ersten Belüftungsgefäß in die Zelle mit der Sauerstoffelektrode gegeben (siehe Abb. 1 in Anlage 2) und umgehend die Konzentration des gelösten Sauerstoffs gemessen. Wenn ein System mit mehreren Elektroden verfügbar ist, können die Messungen gleichzeitig vorgenommen werden. Das Rühren (mit einem beschichteten Magnetrührstäbchen) erfolgt mit der gleichen Geschwindigkeit wie beim Kalibrieren der Elektrode. Dadurch wird sichergestellt, dass die Sonde mit minimaler Verzögerung auf Änderungen der Sauerstoffkonzentrationen reagiert und dass im Messgefäß regelmäßige und reproduzierbare Sauerstoffmessungen vorgenommen werden können. In der Regel kann ein selbstrühendes Sondensystem mit mehreren Sauerstoffelektroden verwendet werden. Zwischen den Messungen ist die Zelle mit Wasser zu spülen. Alternativ kann die Probe auch in eine BSB-Flasche (Abb. 2 in Anlage 3) mit einem Magnetrührer gegeben werden. Anschließend ist eine Sauerstoffsonde mit Dichttülle in den Hals des Gefäßes einzuführen und der Magnetrührer zu starten. In beiden Fällen wird die Konzentration des gelösten Sauerstoffs über einen Zeitraum von gewöhnlich 5 bis 10 Minuten bzw. bis zum Absinken der Sauerstoffkonzentration auf weniger als 2 mg/l kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet. Danach wird die Elektrode herausgenommen und das Gemisch wieder in das Belüftungsgefäß gegeben; die Flüssigkeit ist weiter zu belüften und zu rühren, wenn eine Messung nach längeren Expositionszeiten erforderlich ist.

Überprüfung der Konzentration der Prüfchemikalie

44. Für bestimmte Zwecke muss unter Umständen die Konzentration der Prüfchemikalie in den Prüfgefäßen gemessen werden. Bei der Verwendung von Stammlösungen mit

- schlecht wasserlöslichen Stoffen,
- Gemischen mit Bestandteilen mit unterschiedlicher Wasserlöslichkeit oder
- Stoffen mit guter Wasserlöslichkeit, deren Konzentration in der Stammlösung jedoch an der Grenze zur maximalen Wasserlöslichkeit liegt,

ist die gelöste Fraktion nicht bekannt, und die tatsächliche Konzentration der in die Prüfgefäße überführten Prüfchemikalie ist demnach nicht bestimmt. Um die Exposition zu beschreiben, müssen die Konzentrationen der Prüfchemikalie in den Prüfgefäßen analysiert werden. Zur Vereinfachung des Verfahrens sollte diese Analyse vor Zugabe des Inokulums erfolgen. Da ausschließlich gelöste Fraktionen in die Prüfgefäße gegeben werden, können die gemessenen Konzentrationen sehr gering sein.

45. Um zeitaufwendige und teure Analysen zu vermeiden, sollte die Prüfchemikalie einfach direkt in die Prüfgefäße eingewogen und bei den anschließenden Berechnungen die anfänglich gewogene nominelle Konzentration zugrunde gelegt werden. Eine Unterscheidung zwischen gelöster, nicht gelöster und adsorbierter

Fraktion der Prüfchemikalie braucht nicht vorgenommen zu werden, da alle diese Fraktionen auch unter realen Bedingungen in Kläranlagen auftreten und je nach Zusammensetzung des Abwassers sehr unterschiedlich sein können. Ziel der Prüfmethode ist die realistische Abschätzung einer nicht hemmenden Konzentration; die Methode ist nicht geeignet, um im Einzelnen zu untersuchen, welche Fraktionen zur Hemmung der Mikroorganismen im Belebtschlamm beitragen. Auch adsorptive Stoffe sind direkt in die Prüfgefäße einzuwiegen; um Verluste durch Adsorption zu minimieren, werden die Gefäße silanisiert.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate

46. Die Sauerstoffverbrauchsrate sind aus dem Mittelwert der gemessenen Werte zu berechnen – z. B. aus dem linearen Abschnitt der Kurven der Sauerstoffkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit. Die Berechnungen werden auf Sauerstoffkonzentrationen von 2,0 mg/l bis 7,0 mg/l beschränkt, da höhere und niedrigere Konzentrationen selbst Auswirkungen auf die Sauerstoffverbrauchsrate haben könnten. Die Berücksichtigung von Konzentrationsbereichen ober- oder unterhalb dieser Werte ist manchmal nicht zu vermeiden und erforderlich, wenn die Respiration stark beeinträchtigt und entsprechend gering ist oder wenn bei einem bestimmten Belebtschlamm eine sehr hohe Respiration zu verzeichnen ist. Dies ist annehmbar, wenn die betreffenden Bereiche der Verbrauchskurve gerade verlaufen und wenn sich ihre Steigung bei den O₂-Grenzwerten 2,0 mg/l oder 7,0 mg/l nicht ändert. Gekrümmte Kurvenabschnitte sind ein Beleg dafür, dass sich das Messsystem noch stabilisiert oder dass sich die Verbrauchsrate ändert. Die Sauerstoffverbrauchsrate darf nicht anhand dieser Abschnitte berechnet werden. Die Sauerstoffverbrauchsrate ist in Milligramm pro Liter und Stunde (mg/lh) oder in Milligramm pro Gramm getrockneter Schlamm und Stunde (mg/gh) anzugeben. Die Sauerstoffverbrauchsrate R , in mg/lh, kann nach der Gleichung 1 berechnet oder interpoliert werden ausgehend vom linearen Abschnitt der Kurve des aufgezeichneten Sauerstoffrückgangs:

$$R = (Q_1 - Q_2) / \Delta_t \times 60 \quad (1)$$

Dabei sind:

Q_1 = Sauerstoffkonzentration am Anfang des ausgewählten Abschnitts der linearen Phase (mg/l);

Q_2 = Sauerstoffkonzentration am Ende des ausgewählten Abschnitts der linearen Phase (mg/l);

Δ_t = Zeitabstand zwischen diesen beiden Messungen (min.).

47. Die spezifische Respirationsrate (R_s) wird als die Menge an Sauerstoff ausgedrückt, die pro Gramm Trockenmasse des Schlammes und pro Stunde (mg/gh) verbraucht wird; sie ist mit Gleichung 2 zu berechnen:

$$R_s = R / SS \quad (2)$$

Dabei ist SS die Konzentration der suspendierten Feststoffe im Prüfgemisch (g/l).

48. Die verschiedenen kombinierbaren Indizes von R sind:

- S = spezifische Rate
- T = Gesamtrespirationsrate
- N = auf Nitrifikationsrespiration zurückzuführende Rate
- H = auf heterotrophe Respiration zurückzuführende Rate
- A = auf abiotische Prozesse zurückzuführende Rate
- B = auf Blindkontrollen basierende Rate (Mittelwert)

Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate aufgrund von Nitrifikation

49. Die Beziehung zwischen der Gesamtrespiration (R_T), der Nitrifikationsrespiration (R_N) und der heterotrophen Respiration (R_H) wird mit Gleichung 3 beschrieben:

$$R_N = R_T - R_H \quad (3)$$

Dabei sind:

R_N = Sauerstoffverbrauchsrate aufgrund von Nitrifikation (mg/lh);

R_T = gemessene Rate des Sauerstoffverbrauchs der Blindkontrolle (ohne ATU; F_B) (mg/lh).

R_H = gemessene Rate des Sauerstoffverbrauchs der Blindkontrolle mit ATU (F_N) (mg/lh).

50. Diese Beziehung gilt für Blindwerte (R_{NB} , R_{TB} , R_{HB}), abiotische Kontrollen (R_{NA} , R_{TA} , R_{HA}) und Assays mit Prüfchemikalien (R_{NS} , R_{TS} , R_{HS}) (mg/gh). Spezifische Respirationsraten werden wie folgt berechnet:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Wenn R_N in einem Vorversuch nicht signifikant ist (z. B. $< 5\%$ der R_T bei Blindkontrollen), kann davon ausgegangen werden, dass der heterotrophe Sauerstoffverbrauch dem Gesamtverbrauch entspricht und dass keine Nitrifikation stattfindet. Wenn in den Prüfungen die Auswirkungen auf heterotrophe und nitrifizierende Mikroorganismen berücksichtigt werden sollen, wird Belebtschlamm anderer Herkunft benötigt. Der definitive Test ist durchzuführen, wenn bei unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfchemikalie Anzeichen für eine Hemmung des Sauerstoffverbrauchs festgestellt werden.

Berechnung der prozentualen Hemmung

52. Die prozentuale Hemmung des Gesamtsauerstoffverbrauchs, I_T , bei den einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie wird mit Gleichung 7 ermittelt:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100 \% \quad (7)$$

53. Analog dazu wird die prozentuale Hemmung des heterotrophen Sauerstoffverbrauchs, I_H , bei den einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie mit Gleichung 8 ermittelt:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100 \% \quad (8)$$

54. Die Hemmung des Sauerstoffverbrauchs durch Nitrifikation, I_N , schließlich wird für die einzelnen Konzentrationen mit Gleichung 9 berechnet:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100 \% \quad (9)$$

55. Die prozentuale Hemmung des Sauerstoffverbrauchs ist bezogen auf den Logarithmus der Konzentration der Prüfchemikalie grafisch darzustellen (Hemmkurve siehe Abb. 3 in Anlage 4). Die Hemmkurven werden für jede Belüftungsperiode von jeweils 3 Stunden bzw. zusätzlich nach 30 Minuten grafisch dargestellt. Anschließend ist aus der Grafik die Konzentration der Prüfchemikalie zu berechnen oder zu interpolieren, bei der der Sauerstoffverbrauch um 50 % gehemmt wird (EC_{50}). Wenn geeignete Daten verfügbar sind, können die 95-%-Konfidenzintervalle der EC_{50} -Werte, die Steigung der Kurve und geeignete Werte für den Beginn der Hemmung (z. B. EC_{10} oder EC_{20}) sowie das Ende des Inhibitionsbereichs (etwa EC_{80} oder EC_{90}) berechnet oder interpoliert werden.

56. Angesichts der häufig beobachteten Variabilität der Ergebnisse kann es in vielen Fällen ausreichen, die Ergebnisse zusätzlich nach der Größenordnung anzugeben, z. B.:

$EC_{50} < 1 \text{ mg/l}$
 $EC_{50} 1 \text{ mg/l bis } 10 \text{ mg/l}$
 $EC_{50} 10 \text{ mg/l bis } 100 \text{ mg/l}$
 $EC_{50} > 100 \text{ mg/l}$

Interpretation der Ergebnisse

EC_x

57. EC_x -Werte einschließlich der entsprechenden oberen und unteren 95-%-Konfidenzgrenzen für die einzelnen Parameter werden mit geeigneten statistischen Methoden berechnet (z. B. Probit-Analysen, Logit- oder Weibull-Modell, Trimmed Spearman-Kärber-Methode oder einfache Interpolation) (11). Ein EC_x -Wert wird ermittelt, indem der x % des Mittelwerts der Kontrollen entsprechende Wert in die gefundene Gleichung eingesetzt wird. Um den EC_{50} -Wert oder einen sonstigen EC_x -Wert zu ermitteln, sind die Mittelwerte der Vorbehandlung (x) einer Regressionsanalyse zu unterziehen.

Schätzung der NOEC

58. Wenn mit einer statistischen Analyse die NOEC bestimmt werden soll, werden

Statistiken für die einzelnen Gefäße benötigt. (Die Gefäße werden jeweils als Replikate betrachtet.) Es sind geeignete statistische Methoden anzuwenden; maßgeblich ist das OECD-Dokument „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*“ (11). Im Allgemeinen werden schädliche Wirkungen der Prüfchemikalie im Vergleich mit der Kontrolle einer einseitigen (kleineren) Hypothesenprüfung mit $p \leq 0,05$ unterzogen.

Prüfbericht

59. Das Prüfprotokoll enthält die folgenden Informationen:

Prüfchemikalie:

- allgemeine Bezeichnung, chemische Bezeichnung, CAS-Nummer, Reinheit;
- physikalisch-chemische Eigenschaften der Prüfchemikalie (z. B. $\log K_{ow}$, Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Henry-Konstante (H) und mögliche Informationen zum Verbleib der Prüfchemikalie (z. B. Adsorption in den Belebtschlamm));

Prüfsystem

- Herkunft, Betriebsbedingungen der Kläranlage und eingeleitete Abwässer, Konzentration, Vorbehandlung und Versorgung des Belebtschlammes;

Prüfbedingungen

- Testtemperatur, pH-Wert während der Prüfung und Dauer der Expositionsphase(n);

Ergebnisse

- Spezifischer Sauerstoffverbrauch der Kontrollen ($\text{mg O}_2/(\text{g Schlamm} \times \text{h})$);
- alle gemessenen Daten, die Hemmungskurve(n) und die Methode zur Berechnung von EC_{50} ;
- EC_{50} und nach Möglichkeit die 95-%-Konfidenzgrenzen sowie möglichst EC_{20} und EC_{80} ; wenn möglich, die NOEC und die angewandten statistischen Methoden, wenn EC_{50} nicht bestimmt werden kann;
- Ergebnisse für die Gesamthemmung sowie gegebenenfalls für die Hemmung der heterotrophen und der Nitrifikationsrespiration;
- der abiotische Sauerstoffverbrauch der physikalisch-chemischen Kontrolle (soweit verwendet);
- Bezeichnung der Referenzchemikalie und Ergebnisse mit dieser Chemikalie;
- sämtliche Beobachtungen und Abweichungen vom Standardverfahren, die Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben könnten.

LITERATUR

- (1) Brown, D., Hitz, H.R., und Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.
- (2) King, E. F. und Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.
- (3) OECD (1984), Activated sludge, Respiration inhibition test, Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (4) ISO (2007). ISO 8192, Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Belebtschlamm nach Kohlenstoff- und Ammonium-Oxidation; Internationale Organisation für Normung.
- (5) Bealing, D. J. (2003). Dokument ISO/TC147/WGI/N.183, ISO.
- (6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.
- (7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.
- (8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.
- (9) Fiebig, S., und Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test - acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.
- (10) ISO (1995). ISO 10634, Wasserbeschaffenheit — Anleitung für die Vorbereitung und Behandlung von in Wasser schwer löslichen organischen Verbindungen für die nachfolgende Bestimmung ihrer biologischen Abbaubarkeit in einem wässrigen Medium.
- (11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Bei dieser Prüfmethode werden die folgenden Begriffsbestimmungen zugrunde gelegt:

Chemikalie: ein Stoff oder eine Mischung.

EC_x (Konzentration mit einer Wirkung von x %): Konzentration, bei der innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle eine Wirkung von x % auf die Testorganismen zu verzeichnen ist. Der EC₅₀-Wert beispielsweise ist die Konzentration, bei der bei 50 % einer exponierten Population während einer bestimmten Expositionsdauer von einer Wirkung auf einen Endpunkt der Prüfung ausgegangen wird.

NOEC (höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete Wirkung): Die Konzentration der Prüfchemikalie, bei der keine Wirkung beobachtet wird. Bei diesem Test hat die der NOEC entsprechende Konzentration innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$).

Prüfchemikalie: ein beliebiger Stoff oder eine Mischung, der bzw. die nach dieser Methode geprüft wird.

Anlage 2

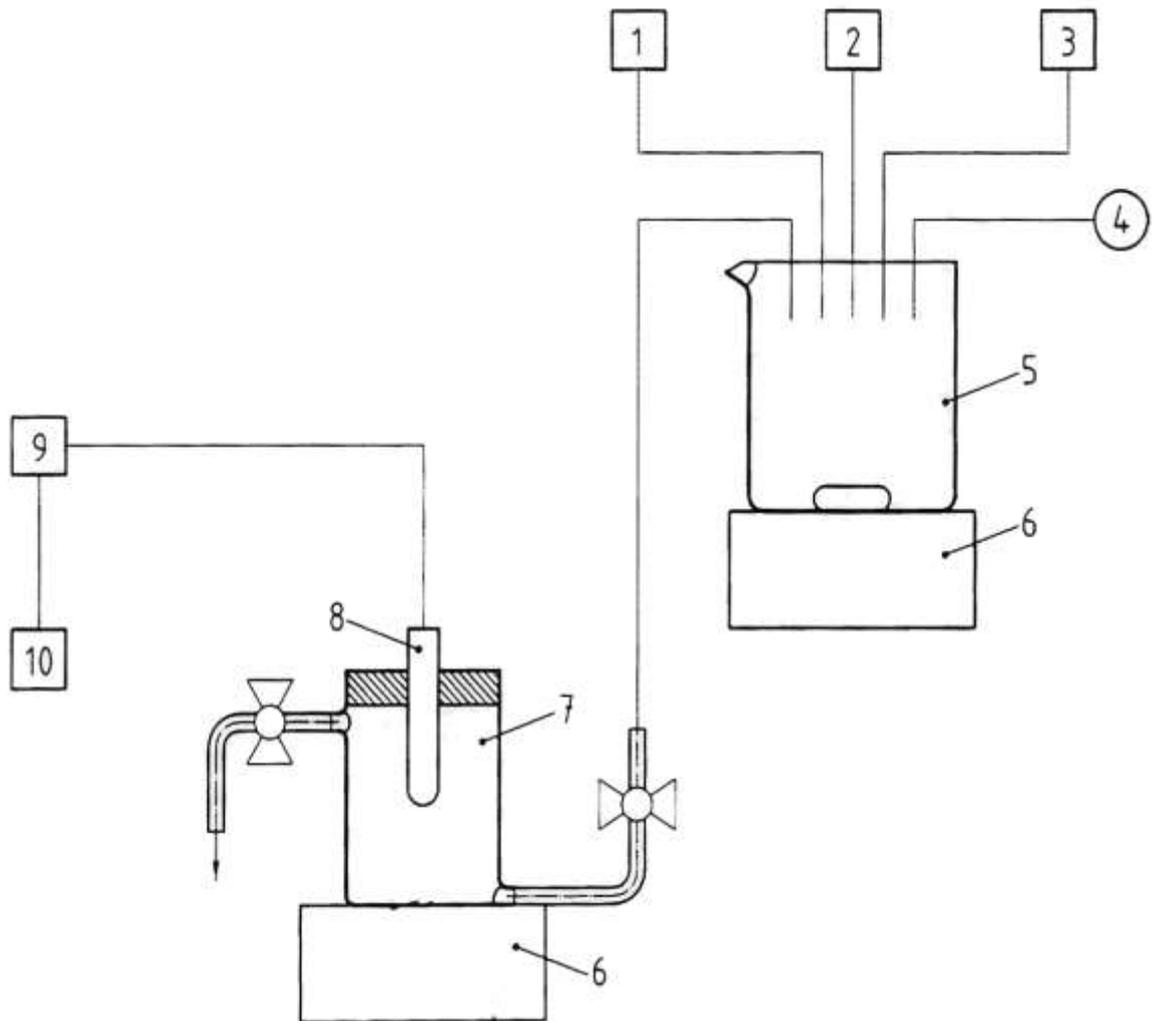


Abb. 1 Messgeräte (Beispiele)

Legende

- | | |
|------------------------|-----------------------|
| 1 Belebtschlamm | 6 Magnetrührer |
| 2 Synthetisches Medium | 7 Sauerstoffmesszelle |
| 3 Prüfchemikalie | 8 Sauerstoffelektrode |
| 4 Luft | 9 Sauerstoffmessgerät |
| 5 Mischgefäß | 10 Aufzeichnungsgerät |

Anlage 3

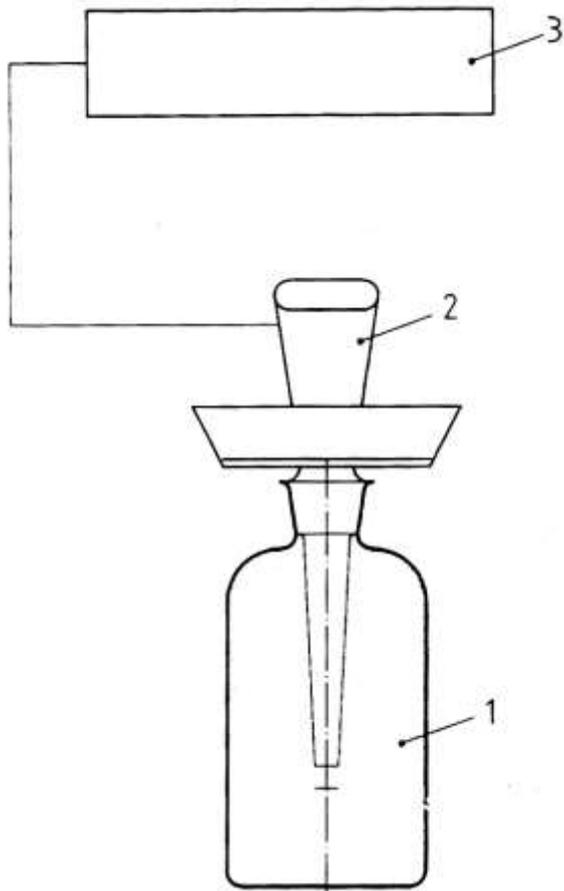


Abb. 2 Messgerät (Beispiel) mit einer BSB-Flasche

Legende

- 1 Prüfgefäß
- 2 Sauerstoffelektrode
- 3 Sauerstoffmessgerät

Anlage 4

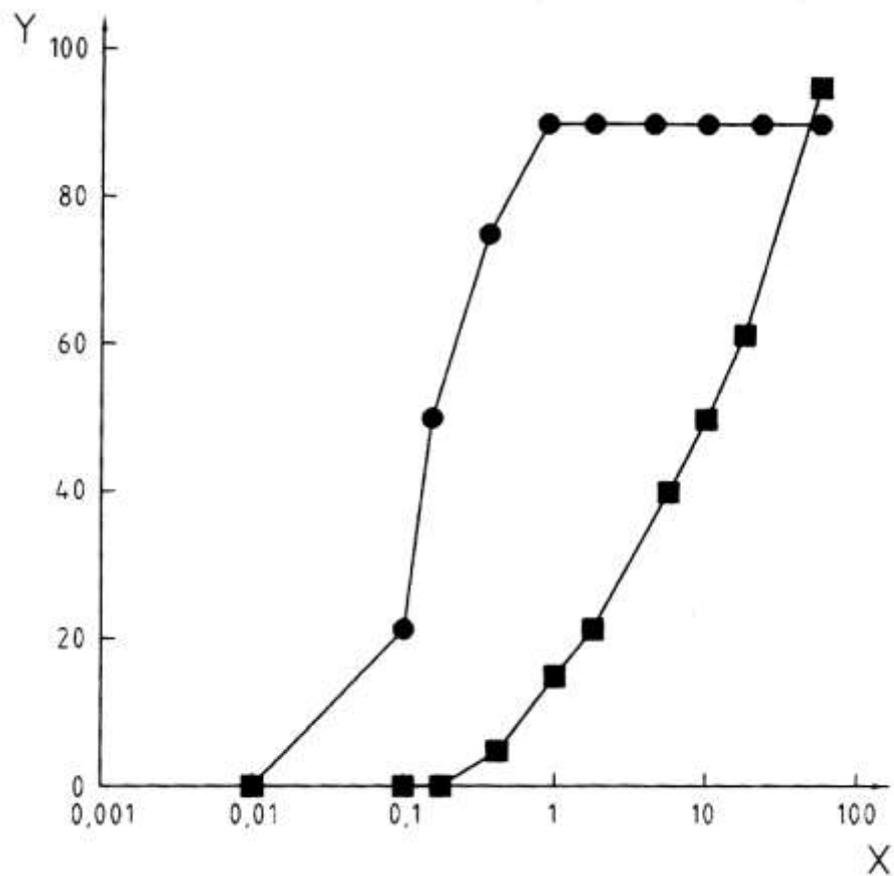


Abb. 3 Hemmkurven (Beispiel)

Legende

X Konzentration von 3,5-Dichlorphenol (mg/l)

Y Hemmung (%)

■ Hemmung der heterotrophen Respiration mit einem nitrifizierenden Schlamm

● Hemmung der Nitrifikation mit einem nitrifizierenden Schlamm“

(5) Kapitel C.26 erhält folgende Fassung:

„C.26 Lemna sp. - Wachstumsinhibitionstest

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 221 (2006). Sie dient zur Beurteilung der Toxizität von Chemikalien bei Süßwasserpflanzen der Gattung *Lemna* (Wasserlinse). Die Methode beruht auf bestehenden Methoden (1)(2)(3)(4)(5)(6), sieht aber Änderungen der entsprechenden Methoden vor, die neueren Forschungsergebnissen und Anhörungen bezüglich einer Reihe wesentlicher Aspekte Rechnung tragen. Die Prüfmethode wurde in einem internationalen Ringversuch validiert (7).
2. Die Prüfmethode beschreibt Toxizitätstests mit *Lemna gibba* und *Lemna minor*, die beide umfassend untersucht wurden und Gegenstand der genannten Standards waren. Die Taxonomie von *Lemna* spp. ist schwierig; problematisch sind die zahlreichen Phänotypen. *Lemna* können zwar genetisch bedingt unterschiedlich auf Giftstoffe reagieren, doch es liegen noch keine ausreichenden Daten zu den Ursachen für diese Variabilität vor, um einen speziellen Klon zur Verwendung bei dieser Prüfmethode empfehlen zu können. Es wird darauf hingewiesen, dass der Test nicht axenisch durchgeführt wird; in verschiedenen Stadien während der Durchführung des Tests wird jedoch mit geeigneten Maßnahmen versucht, Verunreinigungen durch andere Organismen auf ein Minimum zu begrenzen.
3. Die Durchführung von Tests sowohl unter Erneuerung der Testlösung (semistatische Tests und Durchflusstests) als auch ohne Erneuerung der Testlösung (statische Tests) wird detailliert beschrieben. Abhängig von den Zielsetzungen der Tests sowie von rechtlichen Anforderungen wird empfohlen, den Einsatz von semistatischen Methoden sowie von Durchflussmethoden zu prüfen (z. B. für Stoffe, die durch Verflüchtigung, Photodegradation, Ausfällung oder biologischen Abbau rasch verloren gehen). Weitere Informationen sind Quelle (8) zu entnehmen.
4. Definitionen der verwendeten Begriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

5. Exponentiell wachsende Pflanzenkulturen der Gattung *Lemna* werden über einen Zeitraum von sieben Tagen als Monokulturen in unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfchemikalie kultiviert. Ziel des Tests ist die Quantifizierung von durch den Stoff bedingten Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum während dieses Zeitraums, ausgehend von Bewertungen der ausgewählten Messvariablen. Die Frondzahl ist die primäre Messvariable. Außerdem wird mindestens eine weitere Messvariable (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse) gemessen, da sich einige Stoffe erheblich stärker als die Frondzahlen auf die Messvariablen auswirken können. Um die stoffabhängigen Auswirkungen zu quantifizieren, wird

das Wachstum der Testlösungen mit dem Wachstum der Kontrolllösungen verglichen, und die Konzentration, die eine spezifizierte Wachstumshemmung von x % (z. B. 50 %) verursacht, wird bestimmt und als EC_x (z. B. EC_{50}) angegeben.

6. Der Endpunkt des Tests ist die Wachstumshemmung, ausgedrückt als logarithmische Zunahme der Messvariablen (durchschnittliche spezifische Wachstumsrate) während der Expositionsdauer. Aus den in einer Reihe von Testlösungen erfassten durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten wird die Konzentration bestimmt, bei der sich eine spezifizierte Hemmung der Wachstumsrate von x % (z. B. 50 %) ergibt; diese Konzentration wird als E_rC_x bezeichnet (z. B. E_rC_{50}).
7. Eine weitere Reaktionsvariable bei dieser Prüfmethode ist der Zellertrag; diese Variable kann erforderlich sein, damit in manchen Ländern bestimmte maßgebliche Rechtsvorschriften erfüllt werden. Die Variable ergibt sich aus den Messvariablen am Ende der Expositionsdauer abzüglich der Messvariablen bei Beginn der Expositionsdauer. Aus dem in einer Reihe von Testlösungen ermittelten Zellertrag wird die Konzentration berechnet, bei der sich eine festgelegte Zellertrag-Hemmung von x % (z. B. 50 %) ergibt; diese Konzentration wird als E_yC_x bezeichnet (z. B. E_yC_{50}).
8. Außerdem können die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC) und die höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkung (NOEC) statistisch bestimmt werden.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

9. Eine Analysemethode mit geeigneter Empfindlichkeit für die Quantifizierung des im Prüfmedium enthaltenen Stoffs sollte verfügbar sein.
10. Zur Festlegung der Testbedingungen hilfreiche Informationen zur Prüfchemikalie sind die Strukturformel, die Reinheit, die Wasserlöslichkeit, die Stabilität in Wasser, die Lichtbeständigkeit, pK_a , K_{ow} , der Dampfdruck und die biologische Abbaubarkeit. Aus der Wasserlöslichkeit und dem Dampfdruck kann die Henry-Konstante berechnet werden, aus der zu entnehmen ist, ob während der Testdauer erhebliche Verluste der Prüfchemikalie zu erwarten sind. Die Konstante gibt Aufschluss darüber, ob bestimmte Maßnahmen zur Überwachung dieser Verluste durchgeführt werden sollten. Wenn Informationen zur Löslichkeit und zur Stabilität der Prüfchemikalie nicht zuverlässig sind, sollten diese unter den Testbedingungen (Nährmedium, Temperatur und Beleuchtung) untersucht werden.
11. Wenn der Steuerung des pH-Wertes des Prüfmediums besondere Bedeutung zukommt (z. B. beim Testen von Metallen oder sonstigen hydrolytisch instabilen Chemikalien), wird die Zugabe einer Pufferlösung zum Nährmedium empfohlen (siehe Nummer 21). Weitere Hinweise zur Prüfung von Chemikalien mit physikalisch-chemischen Merkmalen, welche die Durchführung des Tests erschweren, sind Quelle (8) zu entnehmen.

VALIDITÄT DES TESTS

12. Die Tests sind nur dann gültig, wenn die Zeit bis zur Verdopplung der Frondzahl der Kontrolle weniger als 2,5 Tage (60 h) und damit in etwa einer Erhöhung um das Siebenfache binnen sieben Tagen bei einer durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate von $0,275 \text{ d}^{-1}$ entspricht. Für die Medien und Testbedingungen gemäß dieser Methode kann dieses Kriterium mit dem Prüfprotokoll des statischen Tests (5) erfüllt werden. Außerdem wird angenommen, dass dieses Kriterium auch bei den Bedingungen des semistatischen Tests und des Durchflusstests erfüllt wird. Wie die Verdopplungszeit zu berechnen ist, wird unter Nummer 49 beschrieben.

REFERENZCHEMIKALIE

13. Um das Prüfverfahren zu testen, können Referenzstoffe wie z. B. das im internationalen Ringtest (7) verwendete 3,5-Dichlorphenol geprüft werden. Die Referenzchemikalien sollten mindestens zweimal jährlich bzw. – wenn die Tests seltener durchgeführt werden – gleichzeitig mit der Bestimmung der Toxizität einer Prüfchemikalie getestet werden.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Apparatur

14. Sämtliche Geräte, die mit dem Prüfmedium in Berührung kommen, müssen aus Glas oder einem sonstigen chemisch inerten Material bestehen. Die zur Kultivierung und für die Tests verwendeten Glasgeräte müssen steril sein und von chemischen Verunreinigungen befreit werden, die in das Prüfmedium gelangen könnten. Die Prüfgefäße müssen so groß sein, dass die Fronds der verschiedenen Kolonien in den Kontrollgefäßen wachsen können, ohne sich am Ende der Testdauer zu überlagern. Es ist unerheblich, ob die Wurzeln den Boden der Prüfgefäße berühren, in jedem Fall sind jedoch eine Mindestdiefe von 20 mm und ein Mindestvolumen von 100 ml pro Prüfgefäß zu empfehlen. Die Art der Prüfgefäße ist nicht entscheidend, sofern diese Anforderungen erfüllt sind. Bewährt haben sich Bechergläser, Kristallisierungsschalen und Petrischalen mit geeigneten Abmessungen. Die Prüfgefäße werden abgedeckt, um die Verdunstung und zufällige Verunreinigungen zu minimieren und trotzdem den erforderlichen Luftaustausch zu ermöglichen. Die Prüfgefäße und insbesondere die verwendeten Abdeckungen dürfen keine Schatten erzeugen und keine Änderungen des Lichtspektrums bewirken.
15. Kulturen und Prüfgefäße dürfen nicht zusammen gelagert werden. Daher werden am besten getrennte Wachstumskammern bzw. getrennte Inkubatoren verwendet oder getrennte Räume genutzt. Beleuchtung und Temperatur müssen kontrolliert werden können, und für Beleuchtung und Temperatur müssen gleichbleibende Werte aufrechterhalten werden können (siehe Nummern 35 und 36).

Testorganismus

16. Für diesen Test wird entweder *Lemna gibba* oder *Lemna minor* verwendet. In Anlage 2 sind Kurzbeschreibungen von in Toxizitätstests verwendeten Wasserlinsenarten zusammengestellt. Das Pflanzenmaterial kann aus einer Kultursammlung oder aus einem anderen Labor bezogen oder aus der Natur entnommen werden. Bei Entnahme aus der Natur sollten die Pflanzen mindestens acht Wochen vor der Verwendung in dem Medium kultiviert werden, das auch für die Tests verwendet wird. Orte in der freien Natur, aus denen die Ausgangskulturen entnommen werden, dürfen keinen offensichtlichen Quellen von Verunreinigungen ausgesetzt sein. Wenn die Kulturen aus einem anderen Labor oder aus einer Kultursammlung bezogen werden, sollten sie ebenfalls mindestens drei Wochen unter ähnlichen Bedingungen kultiviert werden. Angegeben werden sollten auch die Herkunft des Pflanzenmaterials, der Arten und des Klons (wenn bekannt), die für die Tests verwendet werden.
17. Für die Tests werden Monokulturen verwendet, die keine sichtbaren Verunreinigungen durch andere Organismen als Algen und Protozoen aufweisen. Gesunde Pflanzen der Art *L. minor* bestehen aus Kolonien mit zwei bis fünf Fronds; gesunde *L.-gibba*-Kolonien können bis zu sieben Fronds umfassen.
18. Qualität und Einheitlichkeit der für die Tests verwendeten Pflanzen haben erhebliche Auswirkungen auf das Ergebnis der Tests; entsprechend sorgfältig müssen die Pflanzen ausgewählt werden. Nach Möglichkeit sollten junge, rasch wachsende Pflanzen ohne sichtbare Läsionen oder Verfärbungen (Chlorose) verwendet werden. Hochwertige Kulturen weisen einen hohen Anteil an Kolonien mit mindestens zwei Fronds auf. Zahlreiche einzelne Fronds deuten auf Umweltstress hin (z. B. auf Nährstoffmangel); Pflanzenmaterial aus diesen Kulturen sollte für die Tests nicht verwendet werden.

Kultivierung

19. Um den Kultivierungsaufwand zu reduzieren (z. B. wenn über einen bestimmten Zeitraum keine Tests mit *Lemna* vorgesehen sind), können die Kulturen bei verringerter Beleuchtung und niedrigerer Temperatur (4-10 °C) gelagert werden. Nähere Informationen zur Kultivierung sind Anlage 3 zu entnehmen. Bei offensichtlichen Anzeichen für Verunreinigungen durch Algen oder sonstige Organismen muss eine Oberflächensterilisation einer Teilprobe der *Lemna*-Fronds vorgenommen werden und anschließend eine Übertragung in ein frisches Medium erfolgen (siehe Anlage 3). In diesem Fall sollte die verbleibende verunreinigte Kultur verworfen werden.
20. Mindestens sieben Tage vor Durchführung der Tests wird eine hinreichende Anzahl an Kolonien keimfrei in ein frisches steriles Medium gebracht und 7-10 Tage bei Testbedingungen kultiviert.

Prüfmedium

21. Für *Lemna minor* und *Lemna gibba* werden jeweils die im Folgenden genannten Medien empfohlen. Wenn vermutet wird, dass das Medium mit der Prüfchemikalie reagieren und die Toxizitätswirkung beeinflussen könnte, ist sorgfältig zu prüfen, ob eine pH-Pufferlösung zum Prüfmedium gegeben werden muss (beim *L.-minor*-Medium MOPS (4-Morpholinpropan-Sulfonsäure, CAS-Nr: 1132-61-2) und beim *L.-gibba*-Medium NaHCO₃). Das Steinberg-Medium (9) ist ebenfalls annehmbar, wenn die Validitätskriterien erfüllt werden.
22. Zur Kultivierung von *L. minor* und für Tests mit *L. minor* wird eine Modifizierung des SIS-Lemna-Nährmediums (SIS = schwedisches Standardmedium) empfohlen. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist Anlage 4 zu entnehmen.
23. Zur Kultivierung von *L. gibba* und für Tests mit *L. gibba* wird das Nährmedium 20X – AAP (siehe Anlage 4) empfohlen.
24. Das in Anlage 4 beschriebene Steinberg-Medium ist für *L. minor* ebenfalls geeignet, kann aber auch für *L. gibba* verwendet werden, wenn die Validitätskriterien erfüllt sind.

Testlösungen

25. Die Testlösungen werden gewöhnlich durch Verdünnung einer Stammlösung hergestellt. Zum Herstellen von Stammlösungen der Prüfchemikalie wird die Chemikalie im Allgemeinen im Nährmedium gelöst.
26. Die höchste getestete Konzentration der Prüfchemikalie sollte in der Regel die Wasserlöslichkeit der Chemikalie bei den jeweiligen Testbedingungen nicht überschreiten. Allerdings wird darauf hingewiesen, dass *Lemna spp.* auf der Oberfläche treiben und Chemikalien ausgesetzt werden könnten, die sich am Übergang zwischen Wasser und Umgebungsluft sammeln (z. B. schlecht wasserlösliche oder hydrophobe Chemikalien oder oberflächenaktive Chemikalien). Unter diesen Umständen besteht eine Belastung durch nicht in der Lösung enthaltene Materialien, und die Testkonzentrationen können je nach den Merkmalen der Prüfchemikalie die Wasserlöslichkeit überschreiten. Bei Prüfchemikalien mit geringerer Wasserlöslichkeit muss unter Umständen mit einem organischen Lösungsmittel oder einem Dispergiermittel eine konzentrierte Stammlösung oder eine Dispersion der Chemikalie hergestellt werden, damit leichter die exakten Mengen der Prüfchemikalie zum Prüfmedium hinzugegeben werden können und damit die Dispergierung und die Auflösung der Chemikalie begünstigt wird. Die Verwendung dieser Materialien sollte unbedingt vermieden werden. Infolge der Verwendung unterstützender Lösungsmittel oder Dispergiermittel sollte keine Phytotoxizität entstehen. Häufig verwendete Lösungsmittel, die bei Konzentrationen bis zu 100 µl/l keine phototoxische Wirkung haben, sind z. B. Aceton und Dimethylformamid. Wenn ein Lösungsmittel oder ein Dispergiermittel verwendet wird, muss die Endkonzentration protokolliert und auf ein Minimum ($\leq 100 \mu\text{l/l}$) beschränkt werden; alle behandelten Proben und die Kontrollproben müssen das Lösungsmittel bzw. das Dispergiermittel in derselben Konzentration

enthalten. Weitere Informationen zur Verwendung von Dispergiermitteln sind Quelle (8) zu entnehmen.

Test- und Kontrollgruppen

27. Die vorherige Kenntnis der Toxizität der Prüfchemikalie für *Lemna* (z. B. aufgrund eines Vorversuchs) erleichtert die Auswahl geeigneter Testkonzentrationen. Beim definitiven Toxizitätstest werden in der Regel mindestens fünf Testkonzentrationen in einer geometrischen Reihe angeordnet. Der Abstandsfaktor zwischen den Testkonzentrationen beträgt höchstens 3,2; bei flachen Konzentrations-Reaktionskurven kommen jedoch auch höhere Werte in Betracht. Die Verwendung von weniger als fünf Konzentrationen muss begründet werden. Für jede Testkonzentration sind mindestens drei Replikate zu verwenden.
28. Beim Festlegen des Testkonzentrationsbereichs (zur Bereichsermittlung und/oder für den definitiven Toxizitätstest) sind folgende Punkte zu berücksichtigen:
 - Um ein angemessenes Konfidenzintervall sicherzustellen, müssen bei der Bestimmung eines EC_x -Wertes die Testkonzentrationen so gewählt werden, dass der EC_x -Wert abgedeckt ist. Bei der Schätzung von EC_{50} beispielsweise muss die höchste Testkonzentration größer als EC_{50} sein. Wenn der EC_{50} -Wert außerhalb des Testkonzentrationsbereichs liegt, sind die entsprechenden Konfidenzintervalle groß, und eine angemessene Bewertung der statistischen Eignung des Modells ist unter Umständen nicht möglich.
 - Wenn die LOEC oder die NOEC bestimmt werden sollen, muss die niedrigste Testkonzentration so gering sein, dass das Wachstum nicht signifikant kleiner als das Wachstum der Kontrollgruppe ist. Außerdem muss die höchste Testkonzentration so hoch sein, dass das Wachstum signifikant geringer ist als das Wachstum der Kontrollgruppe. Ansonsten muss der Test mit einem anderen Konzentrationsbereich wiederholt werden (wenn die höchste Konzentration nicht an der Löslichkeitsgrenze bzw. bei der höchstens erforderlichen Grenzkonzentration [z. B. $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$] liegt).
29. Die Tests beinhalten jeweils Kontrollen, bei denen dasselbe Nährmedium, dieselbe Anzahl an Fronds und Kolonien und die gleichen Umgebungsbedingungen und Verfahren wie in den Prüfgefäßen gegeben sind und nur die Prüfchemikalie fehlt. Wenn ein zusätzliches Lösungsmittel oder Dispergiermittel verwendet wird, muss eine zusätzliche Kontrollbehandlung mit dem Lösungsmittel/Dispergiermittel erfolgen, das in derselben Konzentration wie in den Gefäßen mit der Prüfchemikalie vorliegt. Die Anzahl der Kontrollgefäße zur Durchführung von Replikaten (sowie ggf. der Lösungsmittelgefäße) muss mindestens identisch mit der Anzahl der für die verschiedenen Testkonzentrationen verwendeten Gefäße sein; im Idealfall sollten sogar doppelt so viele Gefäße verwendet werden.
30. Wenn die NOEC nicht bestimmt werden muss, kann das Prüfprotokoll geändert werden, indem die Anzahl der Konzentrationen erhöht und die Anzahl der Replikate verringert wird. Zur Kontrolle müssen allerdings mindestens drei Replikate durchgeführt werden.

Exposition

31. Kolonien mit zwei bis vier sichtbaren Fronds werden unter keimfreien Bedingungen aus der Impfkultur übertragen und zufällig den Prüfgefäßen zugewiesen. Die Prüfgefäße enthalten insgesamt jeweils neun bis zwölf Fronds. Die Anzahl der Fronds und Kolonien muss in allen Prüfgefäßen identisch sein. Erfahrungen mit dieser Methode sowie Daten aus Ringtests haben gezeigt, dass drei Replikate pro Behandlung, wobei jedes Replikat anfänglich neun bis zwölf Fronds enthält, hinreichend sind, um Unterschiede hinsichtlich der Wachstumshemmungen in der Größenordnung von ca. 4 bis 7 % aufgrund der Wachstumsrate (pro Zellertrag 10 bis 15 % berechnet) zwischen den Behandlungen feststellen zu können (7).
32. Die Prüfgefäße müssen randomisiert im Inkubator angeordnet werden, um die Auswirkungen räumlich unterschiedlicher Lichtintensitäten und Temperaturen zu minimieren. Außerdem sind die Gefäße blockweise anzuordnen oder zufällig umzustellen, wenn die Messungen vorgenommen werden (bzw. noch häufiger).
33. Wenn aufgrund eines vorläufigen Stabilitätstests anzunehmen ist, dass die Prüfchemikalienkonzentration nicht über die gesamte Testdauer (7 Tage) aufrechterhalten werden kann (d. h. wenn die gemessene Konzentration unter 80 % der gemessenen Ausgangskonzentration fällt), wird ein semistatischer Test empfohlen. In diesem Fall werden die Kolonien während der Testdauer mindestens zweimal (z. B. an den Tagen 3 und 5) frisch hergestellten Test- und Kontrolllösungen ausgesetzt. Wie häufig die Lösungen dem frischen Medium ausgesetzt werden, hängt von der Stabilität der Prüfchemikalie ab. Bei sehr instabilen oder flüchtigen Chemikalien ist unter Umständen eine häufigere Exposition erforderlich, um die Konzentrationen annähernd konstant zu halten. Unter gewissen Umständen kann auch die Durchführung eines Durchflusstests erforderlich sein (8)(10).
34. Das Expositionsszenario beim Besprühen wird in dieser Prüfmethode nicht berücksichtigt; diesbezüglich wird auf Quelle (11) verwiesen.

Inkubationsbedingungen

35. Durch kontinuierliche fluoreszierende Beleuchtung mit warmem oder kaltweißem Licht wird eine Lichtintensität hergestellt, die bei Messung unter photosynthetisch aktiver Strahlung (400-700 nm) an Punkten jeweils in demselben Abstand von der Lichtquelle wie die Lemna-Fronds bei $85\text{-}135 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ liegt (entsprechend etwa 6500-10 000 lx). Abweichungen von der gewählten Lichtintensität dürfen im Testbereich höchstens $\pm 15 \%$ betragen. Dabei ist zu beachten, dass die Messwerte von der Methode zur Feststellung und zur Messung der Lichtintensität (insbesondere vom Sensortyp) abhängen. Kugelförmige Sensoren (die auf Licht aus allen Winkeln über und unter der Messebene reagieren) sowie „Kosinus“-Sensoren (die auf Licht aus allen Winkeln über der Messebene ansprechen) sind gegenüber unidirektionalen Sensoren zu bevorzugen, da diese Sensoren bei Mehrpunkt-Lichtquellen des hier beschriebenen Typs höhere Messwerte ergeben.

36. Die Temperatur der Prüfgefäße beträgt 24 ± 2 °C. Der pH-Wert des Kontrollmediums darf während des Tests höchstens um 1,5 Einheiten ansteigen. Auch bei Abweichungen von mehr als 1,5 Einheiten sind Testergebnisse dann nicht ungültig, wenn nachgewiesen werden kann, dass die Validitätskriterien erfüllt sind. Erhöhte Sorgfalt ist bei der Beurteilung von Verschiebungen des pH-Wertes in Sonderfällen geboten (z. B. beim Testen instabiler Chemikalien oder beim Testen von Metallen). Weitere Informationen in diesem Zusammenhang sind Quelle (8) zu entnehmen.

Dauer

37. Der Test wird sieben Tage nach Einsetzen der Pflanzen in die Prüfgefäße beendet.

Messungen und analytische Bestimmungen

38. Bei Beginn des Tests wird die Anzahl der in den Prüfgefäßen enthaltenen Fronds ermittelt und protokolliert; zu zählen sind alle herausragenden, deutlich erkennbaren Fronds. Die Anzahl der normal oder anomal aussehenden Fronds ist bei Beginn des Tests, alle drei Tage während der Expositionsdauer (d. h. binnen des Zeitraums von sieben Tagen mindestens zweimal) und am Ende des Tests zu bestimmen. Änderungen in der Entwicklung der Pflanzen (z. B. Änderungen der Größe oder des Aussehens der Fronds, Anzeichen für eine Nekrose, Chlorose oder Aufwölbungen, das Aufbrechen von Kolonien oder der Verlust der Schwimmfähigkeit sowie Veränderungen der Wurzellänge oder der sonstigen Beschaffenheit der Wurzeln) sind zu protokollieren. Wesentliche Merkmale des Prüfmediums (z. B. Vorliegen nicht gelösten Materials oder Algenwachstum im Prüfgefäß) werden ebenfalls vermerkt.

39. Ergänzend zur Ermittlung der Frondzahl während des Tests sind auch die Auswirkungen der Prüfchemikalie auf eine (oder mehrere) der folgenden Messvariablen zu bewerten:

i) Gesamtfläche der Fronds,

ii) Trockenmasse und

iii) Frischmasse.

40. Die Gesamtfläche der Fronds hat den Vorteil, dass sie für jedes einzelne Prüfgefäß und für jedes einzelne Kontrollgefäß jeweils bei Beginn des Tests, während der Durchführung des Tests und am Ende des Tests bestimmt werden kann. Die Trockenmasse und die Frischmasse werden bei Beginn des Tests an einer Probe der Impfkultur ermittelt, die typisch für das bei Beginn des Tests verwendete Material ist; eine weitere Feststellung erfolgt am Ende des Tests anhand des Pflanzenmaterials jeweils aus den Prüfgefäßen und aus den Kontrollgefäßen. Wenn die Frondfläche nicht gemessen wird, ist eher die Trockenmasse als die Frischmasse zu ermitteln.

41. Die Gesamtfläche der Fronds, die Trockenmasse und die Frischmasse können wie folgt bestimmt werden:

i) Gesamtfläche der Fronds: Die Gesamtfläche der Fronds aller Kolonien kann durch Bildanalyse ermittelt werden. Eine Silhouette des Prüfgefäßes und der Pflanzen kann mit einer Videokamera erfasst werden. Dazu wird das Gefäß auf einen Leuchtkasten gestellt; das dort aufgenommene Bild wird anschließend digitalisiert. Durch die Kalibrierung mit flachen Verläufen bekannter Flächen kann dann die Gesamtfläche der Fronds im Prüfgefäß bestimmt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass Störungen durch den Rand des Prüfgefäßes ausgeschlossen werden. Ein alternatives, aber aufwendigeres Verfahren besteht darin, Prüfgefäße und Pflanzen zu fotokopieren und die entsprechenden Silhouetten der Kolonien auszuschneiden; anschließend wird die jeweilige Fläche mit einem Blattflächen-Analysator oder mit Millimeterpapier bestimmt. Geeignet sind unter Umständen aber auch andere Verfahren (z. B. die Ermittlung des Papiergewicht-Verhältnisses zwischen der Fläche der Kolonie-Silhouette und der Fläche der jeweils zugrunde gelegten Einheit).

ii) Trockenmasse: Alle Kolonien werden aus den Prüfgefäßen entnommen und mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gespült. Durch anschließendes Ablöschen wird überschüssiges Wasser entfernt; danach werden die Proben bei 60 °C auf ein konstantes Gewicht getrocknet. Wurzelreste werden einbezogen. Die Trockenmasse wird mit einer Genauigkeit von mindestens 0,1 mg angegeben.

iii) Frischmasse: Alle Kolonien werden in zuvor gewogene Röhrchen aus Polystyrol (oder einem sonstigen inerten Material) mit feinen Löchern (1 mm) im gerundeten Boden gesetzt. Anschließend werden die Röhrchen bei Raumtemperatur 10 Minuten mit 3000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Die Röhrchen mit den nun getrockneten Kolonien werden noch einmal gewogen; danach wird die Frischmasse durch Subtraktion des Gewichts der leeren Röhrchen bestimmt.

Häufigkeit der Messungen und der analytischen Bestimmungen

42. Bei statischen Tests wird jeweils bei Beginn und am Ende des Tests der pH-Wert der behandelten Lösungen gemessen. Bei semistatischen Tests wird für alle Batches der „frischen“ Testlösung jeweils vor den Erneuerungen der pH-Wert ermittelt; außerdem ist der pH-Wert der „verbrauchten“ Lösungen zu bestimmen.

43. Die Lichtintensität wird in der Wachstumskammer, im Inkubator oder im jeweiligen Raum in dem Abstand von der Lichtquelle gemessen, der auch bei den *Lemna*-Fronds gegeben ist. Während des Tests wird mindestens eine Messung vorgenommen. Die Temperatur des Mediums in einem Surrogatgefäß unter den gleichen Bedingungen wie in der Wachstumskammer bzw. im Inkubator oder im jeweiligen Raum ist mindestens täglich zu protokollieren.

44. Während des Tests wird die Konzentration der Prüfchemikalie in geeigneten Intervallen bestimmt. Bei statischen Tests ist die Konzentration mindestens bei Beginn des Tests und am Ende des Tests zu ermitteln.

45. Bei semistatischen Tests, bei denen davon ausgegangen wird, dass die

Konzentration der Prüfchemikalie nicht im Bereich von $\pm 20\%$ der Nennkonzentration aufrechterhalten werden kann, müssen alle frisch hergestellten Testlösungen sowie alle Lösungen jeweils nach der Erneuerung analysiert werden (siehe Nummer 33). Bei Tests, bei denen die gemessene Ausgangskonzentration der Prüfchemikalie zwar nicht $\pm 20\%$ der Nennkonzentration beträgt, für die aber hinreichend nachgewiesen werden kann, dass die Ausgangskonzentrationen wiederholbar und stabil sind (d. h. dass die Konzentrationen im Bereich von 80-120 % der Ausgangskonzentration liegen), sind chemische Bestimmungen nur bei der höchsten und der niedrigsten Konzentration erforderlich. In jedem Fall brauchen die Prüfchemikalienkonzentrationen für alle Testkonzentrationen vor der Erneuerung jeweils nur bei einem einzigen Replikat (bzw. bei Gefäßen mit zusammengefassten Replikaten jeweils bei nur einem Gefäß) erneut bestimmt zu werden.

46. Bei Durchflusstests ist ähnlich zu verfahren, wie bei den semistatistischen Tests, d. h. Analysen sind jeweils bei Beginn des Tests, in der Mitte und am Ende des Tests durchzuführen; Messungen der „verbrauchten“ Lösungen sind jedoch nicht erforderlich. Bei diesem Testtyp wird der Durchfluss des Verdünnungsmittels und der Prüfchemikalie oder der Prüfchemikalien-Stammlösung täglich geprüft.
47. Wenn nachgewiesen wird, dass die Konzentration der Prüfchemikalie während der gesamten Testdauer zufriedenstellend in Höhe von $\pm 20\%$ der Nennkonzentration oder der gemessenen Ausgangskonzentration aufrechterhalten werden konnte, können die Ergebnisse auch ausgehend von den Nennwerten bzw. von den gemessenen Ausgangswerten analysiert werden. Beträgt die Abweichung von der Nennkonzentration oder von der gemessenen Ausgangskonzentration mehr als $\pm 20\%$, sollte bei der Analyse der Ergebnisse vom geometrischen Mittel der Konzentration während der Expositionsdauer oder von Modellen ausgegangen werden, die den Rückgang der Prüfchemikalienkonzentration beschreiben (8).

Limit-Test

48. Unter bestimmten Umständen, z. B. wenn ein vorläufiger Test darauf hindeutet, dass die Prüfchemikalie bei Konzentrationen bis zu 100 mg/l bzw. bis zur Löslichkeitsgrenze im Prüfmedium (maßgeblich ist die jeweils niedrigere Konzentration) keine toxische Wirkung hat, kann ein Limit-Test durchgeführt werden, in dem die Reaktionen einer Kontrollgruppe und einer Behandlungsgruppe (100 mg/l bzw. eine mit der Löslichkeitsgrenze identische Konzentration) verglichen werden. Es wird nachdrücklich empfohlen, diese Tests durch Analysen der Expositionskonzentration zu verifizieren. Alle oben beschriebenen Testbedingungen und Validitätskriterien beziehen sich auf einen Limit-Test; allerdings sollte die Anzahl der behandelten Replikate mindestens doppelt so hoch sein. Das Wachstum der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe kann mit einem statistischen Test zum Vergleich der Mittelwerte analysiert werden (z. B. mit einem Student-t-Test).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Verdopplungszeit

49. Um die Dauer bis zur Verdopplung der Frondzahl (T_d) zu bestimmen und um sicherzustellen, dass dieses Validitätskriterium von der Studie erfüllt wird (siehe Nummer 12), sind die Daten der Kontrollgefäße in die folgende Gleichung einzusetzen:

$$T_d = \ln 2 / \mu$$

Dabei steht μ für die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate, die wie unter den Nummern 54 und 55 beschrieben bestimmt wurde.

Reaktionsvariablen

50. Mit der Prüfung sollen die Auswirkungen der Prüfchemikalie auf das vegetative Wachstum von *Lemna* bestimmt werden. Diese Prüfmethode beschreibt zwei Reaktionsvariablen, da in unterschiedlichen Rechtsordnungen unterschiedliche Präferenzen und rechtliche Anforderungen bestehen. Damit die Testergebnisse in allen Rechtsordnungen anerkannt werden können, sind die Auswirkungen mithilfe der beiden im Folgenden beschriebenen Reaktionsvariablen a und b zu beurteilen.

a) Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate: Diese Reaktionsvariable wird aufgrund von Veränderungen der Frondzahlen-Logarithmen sowie ausgehend von den Veränderungen der Logarithmen sonstiger Messparameter der Kontrollen und der einzelnen Behandlungsgruppen (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse) während eines bestimmten Zeitraums (jeweils pro Tag ausgedrückt) berechnet. Gelegentlich wird diese Wachstumsrate auch als relative Wachstumsrate bezeichnet (12).

b) Zellertrag: Diese Reaktionsvariable wird ausgehend von Änderungen der Frondzahl sowie aufgrund von Änderungen anderer Messparameter der Kontrollen und der einzelnen Behandlungsgruppen (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse) bis zum Ende der Testdauer berechnet.

51. Es wird darauf hingewiesen, dass die mit diesen beiden Reaktionsvariablen berechneten Toxizitätswerte nicht vergleichbar sind; der entsprechende Unterschied muss bei der Verwendung der Testergebnisse berücksichtigt werden. Die mit der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate ($E_r C_x$) berechneten Werte für EC_x werden im Allgemeinen höher sein als die anhand des Zellertrags ($E_y C_x$) ermittelten Werte, wenn die für diese Testmethode vorgesehenen Bedingungen eingehalten werden; dies ist auf die unterschiedliche mathematische Grundlage der beiden Berechnungsverfahren zurückzuführen. Die auftretenden Unterschiede sollten jedoch nicht als Anzeichen für eine unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Reaktionsvariablen betrachtet werden; beide Werte sind einfach mathematisch verschieden. Das Konzept der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate beruht auf dem im Allgemeinen exponentiellen Verlauf des Wasserlinsenwachstums bei nicht beschränkten Kulturen, bei denen die Toxizität aufgrund der Auswirkungen auf die Wachstumsrate geschätzt wird, ohne jedoch

von der absoluten Höhe der jeweiligen Wachstumsrate der Kontrollprobe, von der Steigung der Konzentrations-Reaktionskurve oder von der Testdauer abhängig zu sein. Auf der Reaktionsvariable „Zellertrag“ beruhende Ergebnisse hingegen hängen von allen übrigen genannten Variablen ab. $E_y C_x$ ist von der spezifischen Wachstumsrate der in den einzelnen Tests verwendeten Wasserlinsenarten sowie von der maximalen spezifischen Wachstumsrate abhängig, die je nach Art sowie sogar zwischen den einzelnen Klonen unterschiedlich sein kann. Diese Reaktionsvariable darf nicht verwendet werden, um die Empfindlichkeit von Algenarten oder auch nur verschiedener Klone gegenüber Giftstoffen zu vergleichen. Die Verwendung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate zur Schätzung der Toxizität wird in der Wissenschaft bevorzugt; bei dieser Prüfmethode werden jedoch auch Toxizitätsschätzungen aufgrund des Zellertrags berücksichtigt, um den derzeitigen rechtlichen Anforderungen einiger Rechtsordnungen Rechnung zu tragen.

52. Toxizitätsschätzungen müssen auf der Frondzahl sowie auf einer weiteren Messvariablen (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse) beruhen, da sich manche Chemikalien erheblich stärker auf andere Messvariablen auswirken können als die Frondzahl. Diese Auswirkungen würden nicht festgestellt, wenn ausschließlich die Frondzahl berechnet würde.
53. Die Anzahl der Fronds sowie alle sonstigen protokollierten Messvariablen (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse) werden zusammen mit den Konzentrationen der Prüfchemikalie für jede Messung tabellarisch zusammengestellt. Anschließende Datenanalysen z. B. zur Schätzung von LOEC-, NOEC- oder EC_x -Werten sollten auf den Werten der einzelnen Replikate, nicht aber auf berechneten Mittelwerten der einzelnen Behandlungsgruppen beruhen.

Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate

54. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate in einem bestimmten Zeitraum wird als logarithmische Zunahme der Wachstumsvariablen (d. h. der Frondzahl und einer sonstigen Messvariablen (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse)) für die einzelnen Replikate der Kontrolllösungen und der behandelten Lösungen mit der nachstehenden Formel berechnet:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

Dabei sind:

- μ_{i-j} : durchschnittliche spezifische Wachstumsrate vom Zeitpunkt i bis zum Zeitpunkt j
- N_i : Messvariable im Prüfgefäß bzw. im Kontrollgefäß zum Zeitpunkt i
- N_j : Messvariable im Prüfgefäß bzw. im Kontrollgefäß zum Zeitpunkt j
- t: Zeitraum vom Zeitpunkt i bis zum Zeitpunkt j

Für jede Behandlungsgruppe und für jede Kontrollgruppe sind die mittlere Wachstumsrate und die Varianzschätzungen zu berechnen.

55. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate wird für die gesamte Testdauer berechnet. (In der vorstehenden Formel bezeichnet „i“ den Beginn des Tests und der Zeitpunkt „j“ das Ende des Tests.) Für alle Konzentrationen der Testlösungen und der Kontrolllösungen sind ein Mittelwert für die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate zu berechnen und die entsprechenden Varianzschätzungen vorzunehmen. Außerdem muss die abschnittsbezogene Wachstumsrate bestimmt werden, um die Auswirkungen der Prüfchemikalie während der Expositionsdauer beurteilen zu können (z. B. durch Prüfung der logarithmisch transformierten Wachstumskurven). Erhebliche Unterschiede zwischen der abschnittsbezogenen Wachstumsrate und der durchschnittlichen Wachstumsrate deuten auf Abweichungen vom konstanten exponentiellen Wachstum hin und erfordern eine genaue Überprüfung der Wachstumskurve. In diesem Fall würde ein vorsichtigerer Ansatz in einem Vergleich der spezifischen Wachstumsraten der behandelten Kulturen während der Dauer der maximalen Hemmung mit den spezifischen Wachstumsraten der Kontrolllösungen im selben Zeitraum bestehen.
56. Die Hemmung der Wachstumsrate in Prozent (I_r) kann anschließend für jede Testkonzentration (Behandlungsgruppe) nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$\% I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

Dabei sind:

- $\% I_r$: Hemmung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate in Prozent
- μ_c : Mittelwert für μ in der Kontrollgruppe
- μ_T : Mittelwert für μ in der Behandlungsgruppe

Zellertrag

57. Die Auswirkungen auf den Zellertrag werden ausgehend von zwei Messvariablen, d. h. der Frondzahl und einer sonstigen Messvariablen (der gesamten Frondfläche, der Trockenmasse oder der Frischmasse) der jeweiligen Prüfgefäße am Anfang und am Ende des Tests bestimmt. Für die Trockenmasse und die Frischmasse wird die Ausgangsbiomasse bezogen auf eine Frond-Probe aus dem betreffenden Batch bestimmt, aus der die Prüfgefäße geimpft wurden (siehe Nummer 20). Für die Testkonzentrationen und für die Kontrolllösungen ist jeweils ein mittlerer Zellertrag zu berechnen; die Varianzen sind jeweils zu schätzen. Die prozentuale Hemmung des Zellertrags ($\% I_y$) kann für die Behandlungsgruppen wie folgt berechnet werden:

$$\% I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

Dabei sind:

- % I_y : Verringerung des Zellertrags in Prozent
- b_C : Biomasse am Ende des Tests abzüglich der Biomasse der Kontrollgruppe am Anfang des Tests
- b_T : Biomasse am Ende des Tests abzüglich der Biomasse der Behandlungsgruppe am Anfang des Tests

Darstellung der Konzentrations-Reaktionskurven

58. Die Konzentrations-Reaktionskurven der mittleren Hemmung der Reaktionsvariablen in Prozent (I_r bzw. I_y berechnet gemäß der Anweisung unter Nummer 56 bzw. Nummer 57) bezogen auf die logarithmische Konzentration der Prüfchemikalie werden grafisch dargestellt.

Schätzung von EC_x

59. Schätzungen der EC_x -Werte (z. B. EC_{50}) sollten sowohl auf der mittleren spezifischen Wachstumsrate (E_rC_x) als auch auf dem Zellertrag (E_yC_x) beruhen, und beide Werte sollten ihrerseits von der Frondzahl und von einer weiteren Messvariablen (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse) ausgehen, weil sich manche Prüfchemikalien unterschiedlich auf die Frondzahl und sonstige Messvariablen auswirken. Die gewünschten Toxizitätsparameter bestehen entsprechend aus vier EC_x -Werten für alle berechneten Hemmkonzentrationen x : E_rC_x (Frondzahl); E_rC_x (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse); E_yC_x (Frondzahl) und E_yC_x (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse).

Statistische Verfahren

60. Ziel ist die Ermittlung einer quantitativen Konzentrations-Reaktionsbeziehung durch Regressionsanalyse. Im Anschluss an eine linearisierte Transformation der Reaktionsdaten (z. B. in Einheiten nach dem Probit-, Logit- oder Weibull-Modell) (13) kann eine gewichtete lineare Regression vorgenommen werden; nicht-lineare Regressionsverfahren, mit denen die unvermeidlichen Unregelmäßigkeiten der Daten und Abweichungen von gleichförmigen Verteilungen besser verarbeitet werden können, werden jedoch bevorzugt. Im Bereich von null bzw. der vollständigen Hemmung können diese Unregelmäßigkeiten durch die Transformation vergrößert werden und die Analyse beeinträchtigen (13). Es wird darauf hingewiesen, dass Standard-Analysemethoden mit Probit-, Logit- oder Weibull-Transformationen für quantale Daten (z. B. Mortalität oder Überlebensraten) vorgesehen sind und zur Verwendung in Verbindung mit Wachstums- oder Zellertragsdaten entsprechend modifiziert werden müssen. Spezifische Verfahren zur Bestimmung von EC_x -Werten aus kontinuierlichen Daten sind den Quellen (14), (15) und (16) zu entnehmen.

61. Für jede zu analysierende Reaktionsvariable sind aufgrund der Konzentrations-Reaktionsbeziehung Punktschätzungen der EC_x -Werte zu ermitteln. Nach

Möglichkeit sollten für jede Schätzung die 95%-Konfidenzgrenzen bestimmt werden. Die Qualität der Übereinstimmung der Reaktionsdaten mit dem Regressionsmodell sollte grafisch oder statistisch bewertet werden. Die Regressionsanalyse wird mit den Reaktionen der einzelnen Replikate (und nicht mit den Mittelwerten der Behandlungsgruppe) durchgeführt.

62. Schätzwerte für EC_{50} und für die Konfidenzgrenzen können auch durch lineare Interpolation mit einem Bootstrapping-Algorithmus (17) erzielt werden, wenn die verfügbaren Regressionsmodelle/-methoden für die betreffenden Daten nicht geeignet sind.
63. Für eine Schätzung der LOEC und entsprechend auch der NOEC müssen die Mittelwerte der behandelten Lösungen durch Varianzanalyseverfahren (ANOVA) verglichen werden. Der Mittelwert der einzelnen Konzentrationen ist dann mit einer geeigneten Methode zur Durchführung von Mehrfachvergleichen bzw. zur Durchführung von Trendtests mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe zu vergleichen. Dunnett- und Williams-Tests können hilfreich sein (18)(19)(20)(21). Die ANOVA-Annahme der Varianzhomogenität muss einer Überprüfung unterzogen werden. Die entsprechende Bewertung kann anhand einer grafischen Darstellung oder aufgrund eines formalen Tests vorgenommen werden (22). Geeignet sind Levene- und Bartlett-Tests. Wenn die Annahme der Varianzhomogenität nicht erfüllt ist, kann gelegentlich eine Korrektur durch logarithmische Datentransformation erfolgen. Bei außerordentlicher Varianzheterogenität, die durch Transformation nicht korrigiert werden kann, sollten Analysen durch Methoden wie z. B. Jonckheere-Trendtests (Stepdown) erwogen werden. Weitere Hinweise zur Bestimmung von NOEC-Werten sind Quelle (16) zu entnehmen.
64. Aufgrund neuer Forschungsergebnisse wird empfohlen, das Konzept der NOEC aufzugeben und durch Punktschätzungen von EC_x -Werten zu ersetzen, die durch Regression ermittelt wurden. Für diesen *Lemna*-Test wurde noch kein geeigneter Wert für x definiert. Ein Bereich von 10 bis 20 % scheint jedoch geeignet (abhängig von der ausgewählten Reaktionsvariablen); vorzugsweise sollten sowohl EC_{10} als auch EC_{20} protokolliert werden.

Abschlussbericht

65. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfchemikalie:

- physikalische Beschaffenheit und physikalisch-chemische Eigenschaften einschließlich der Wasserlöslichkeitsgrenze;
- chemische Kenndaten (z. B. CAS-Nummer) einschließlich der Reinheit (Verunreinigungen).

Im Test verwendete Art:

- wissenschaftliche Bezeichnung, Klon (wenn bekannt) und Herkunft.

Prüfbedingungen:

- verwendetes Testverfahren (statisch, semistatisch oder Durchfluss);
- Datum des Testbeginns und Dauer des Tests;
- Prüfmedium;
- Beschreibung des Prüfprotokolls: Prüfgefäße und Abdeckungen, Lösungsvolumina, Anzahl der Kolonien und Fronds pro Prüfgefäß am Anfang des Tests;
- Testkonzentrationen (Nennkonzentrationen bzw. gemessene Konzentrationen) und Anzahl der Replikate pro Konzentration;
- Methoden zur Herstellung von Stamm- und Testlösungen einschließlich der Verwendung von Lösungsmitteln und Dispergiermitteln;
- Temperatur während des Tests;
- Lichtquelle, Lichtintensität und Homogenität des Lichts;
- pH-Werte der Prüfmedien und der Kontrollmedien;
- Prüfchemikalienkonzentrationen und Analysemethoden mit geeigneten Daten zur Qualitätsbewertung (Validierungsstudien, Standardabweichungen oder Konfidenzgrenzen der Analysen);
- Methoden zur Bestimmung der Frondzahl und sonstiger Messvariablen (z. B. Trockenmasse, Frischmasse oder Frondfläche);
- sämtliche Abweichungen von dieser Prüfmethode.

Ergebnisse:

- Ausgangsdaten: Anzahl der Fronds und sonstige Messvariablen der einzelnen Prüfgefäße und der Kontrollgefäße jeweils bei einer Beobachtung und Analyse;
- Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Messvariablen;
- Wachstumskurven bei den verschiedenen Konzentrationen (möglichst mit logarithmisch transformierter Messvariable, siehe Nummer 55);
- Verdopplungszeit/Wachstumsrate in der Kontrolllösung bezogen auf die Frondzahl;
- berechnete Reaktionsvariablen für alle behandelten Replikate mit Mittelwerten und dem Variationskoeffizienten für Replikate;
- grafische Darstellung der Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung;
- Schätzungen der Endpunkte der Toxizität für die verschiedenen Reaktionsvariablen (z. B. EC_{50} , EC_{10} und EC_{20}) und entsprechende Konfidenzintervalle; wenn berechnet, sind die LOEC und/oder die NOEC sowie die zur jeweiligen Berechnung verwendeten statistischen Methoden anzugeben;
- bei Durchführung von Varianzanalysen (ANOVA) der Umfang der nachzuweisenden Auswirkungen (z. B. geringster signifikanter Unterschied);
- jegliche in behandelten Proben festgestellte Wachstumsstimulation;
- alle offensichtlichen Anzeichen einer Phytotoxizität sowie Beobachtungen an den Testlösungen;
- Diskussion der Ergebnisse einschließlich aller Auswirkungen auf das Testergebnis, die auf Abweichungen von dieser Prüfmethode zurückzuführen sind.

LITERATUR

- (1) ASTM International.(2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (neu genehmigt 1998). S. 733-742. In: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (2) US EPA - United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156.8 S.
- (3) AFNOR - Association Française de Normalisation.(1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 S.
- (4) SSI - Swedish Standards Institute.(1995). Water quality - Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13.15 S. (Schwedisch).
- (5) Environment Canada.(1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 - 120 S.
- (6) Environment Canada.(1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation.Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (7) Sims, I., Whitehouse, P., und Lacey, R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline.R&D Technical Report EMA 003.WRc plc - Environment Agency.
- (8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (9) Internationale Organisation für Normung. ISO DIS 20079. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der toxischen Wirkung von

Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*) - Wasserlinsen-Wachstumshemmtest.

- (10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory - Duluth, Minnesota 55804.US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.
- (11) Lockhart, W.L., Billeck, B. N., und Baron, C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 - 359.
- (12) Huebert, D.B. and Shay J.M.(1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds.*Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- (13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O., und Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (15) Bruce, R.D., und Versteeg, D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- (16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
- (18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
- (19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.

- (20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
- (21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 519-531.
- (22) Brain, P., und Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Bei dieser Prüfmethode werden die folgenden Begriffsbestimmungen zugrunde gelegt und folgende Abkürzungen verwendet:

Biomasse: Trockenmasse des in einer Population enthaltenen lebenden Materials; bei diesem Test werden typischerweise Surrogate für die betreffende Biomasse (z. B. Frondzahl oder Frondfläche) gemessen; entsprechend bezieht sich der Begriff „Biomasse“ auch auf diese Surrogatparameter.

Chemikalie: ein Stoff oder eine Mischung.

Chlorose: Gelbfärbung des Blattmaterials.

Klon: ein Organismus oder eine Zelle, der bzw. die durch geschlechtslose Reproduktion aus einem einzelnen Organismus gewonnen wurde; aus demselben Klon gewonnene Organismen sind entsprechend genetisch identisch.

Kolonie: Gesamtheit der miteinander verbundenen Mutter- und Tochter-Fronds (gewöhnlich 2 bis 4); gelegentlich auch als Pflanze bezeichnet.

EC_x: Konzentration der im Prüfmedium aufgelösten Prüfchemikalie, bei der sich binnen einer festgelegten Expositionsdauer eine Reduzierung des Wachstums von *Lemna* um x % (z. B. 50 %) ergibt. (Die Expositionsdauer ist ausdrücklich zu nennen, wenn die Dauer von der vollständigen oder normalen Testdauer abweicht.) Um einen von der Wachstumsrate oder vom Zellertrag abweichenden EC-Wert eindeutig zu kennzeichnen, wird die Bezeichnung „E_rC“ für die Wachstumsrate und „E_yC“ für den Zellertrag jeweils gefolgt von der verwendeten Messvariablen (z. B. E_rC [Frondzahl]) verwendet.

Durchflusstest: ein Test, bei dem die Testlösungen kontinuierlich ersetzt werden.

Frond: eine separate/einzelne „blattartige“ Struktur einer Wasserlinsen-Pflanze; kleinste reproduktionsfähige Einheit (d. h. einzelner Organismus).

Aufwölbungen: Fronds mit einer Wölbung oder Schwellung.

Wachstum: Zunahme der Messvariablen, z. B. Frondzahl, Trockenmasse, Feuchtmasse oder Frondfläche während der Testdauer.

Wachstumsrate (durchschnittliche spezifische Wachstumsrate): logarithmische Zunahme der Biomasse während der Expositionsdauer.

Niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC): niedrigste geprüfte Konzentration, bei der beobachtet wurde, dass die Chemikalie binnen einer bestimmten

Expositionsdauer gegenüber der Kontrollprobe eine statistisch signifikante Wachstumsreduzierung bewirkt (bei $p < 0,05$); allerdings müssen sämtliche Testkonzentrationen über der LOEC schädliche Folgen haben, die mindestens den bei der LOEC beobachteten schädlichen Folgen gleichwertig sind. Wenn diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden können, ist umfassend darzulegen, warum die LOEC (und entsprechend die NOEC) gewählt wurde.

Messvariablen: alle Variablentypen, die gemessen werden, um mit mindestens einer Reaktionsvariablen den Endpunkt des Tests zu beschreiben; Messvariablen bei dieser Methode sind Frondzahl, Frondfläche, Frischmasse und Trockenmasse.

Monokultur: Kultur mit einer Pflanzenart.

Nekrose: totes (d. h. weißes oder mit Wasser durchfeuchtetes) Blattmaterial.

Höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkung (NOEC): Testkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC.

Phänotyp: zu beobachtende Merkmale eines Organismus, die durch Interaktion der Gene dieses Organismus mit seiner Umgebung bestimmt werden.

Reaktionsvariablen: Variablen für die geschätzte Toxizität, abgeleitet aus beliebigen gemessenen Variablen zur Beschreibung der Biomasse durch verschiedene Berechnungsmethoden; bei dieser Prüfmethode sind die Wachstumsraten und der Zellertrag Reaktionsvariablen, die aus Messvariablen wie z. B. Frondzahl, Frondfläche, Frischmasse oder Trockenmasse abgeleitet werden.

Semistatischer (Erneuerungs-)test: Test, bei dem die Testlösung während der Testdauer regelmäßig in bestimmten Intervallen erneuert wird.

Statischer Test: Testmethode, bei der die Testlösung während der Testdauer nicht erneuert wird.

Prüfchemikalie: ein beliebiger Stoff oder eine Mischung, der bzw. die nach dieser Methode geprüft wird.

Endpunkt des Tests: beschreibt den allgemeinen Faktor, der bezogen auf die Kontrolle als Testziel durch die Prüfchemikalie verändert wird; bei dieser Prüfmethode wird als Endpunkt des Tests die Wachstumshemmung angenommen; diese kann durch verschiedene Reaktionsvariablen ausgedrückt werden, die jeweils auf mindestens einer Messvariablen beruhen.

Prüfmedium: gesamtes synthetisches Nährmedium, in dem die zu prüfenden Pflanzen wachsen, wenn sie der Prüfchemikalie ausgesetzt werden; die Prüfchemikalie wird im Allgemeinen im Prüfmedium aufgelöst.

Zellertrag: Wert einer Messvariablen zur Beschreibung der Biomasse am Ende der Expositionsdauer abzüglich der Messvariablen am Anfang der Expositionsdauer.

Anlage 2

Beschreibung *Lemna* spp.

Die gemeinsprachlich als Wasserlinse (*Lemna* spp.) bezeichnete Wasserpflanze zählt zur Familie der Lemnaceae, die weltweit in vier Gattungen mit verschiedenen Arten vorkommt. Das jeweilige Aussehen und die Taxonomie wurden umfassend dokumentiert (1)(2). *Lemna gibba* und *L. minor* sind für gemäßigte Regionen typische Arten; diese Arten werden häufig in Toxizitätstests verwendet. Beide Arten besitzen einen treibenden oder auch untergetauchten Stängel (Fronde); von der Mitte der Unterseite der Fronds geht jeweils eine sehr dünne Wurzel aus. *Lemna* spp. bilden selten Blüten aus; die Pflanzen vermehren sich durch Austrieb neuer Fronds (3). Im Vergleich zu älteren Pflanzen sind jüngere Pflanzen eher blasser, besitzen kürzere Wurzeln und bestehen aus zwei bis drei Fronds unterschiedlicher Größe. Dank der geringen Größe, des einfachen Aufbaus, der geschlechtslosen Reproduktion und der kurzen Generationsdauer ist *Lemna* für Labortests in besonderer Weise geeignet (4)(5).

Da von unterschiedlichen Empfindlichkeiten der verschiedenen Arten auszugehen ist, sind ausschließlich Vergleiche der Empfindlichkeit jeweils einer einzigen Art annehmbar.

Beispiele für *Lemna*-Arten, die in Tests verwendet wurden: Artenreferenz

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys.Chem., 29: 935-941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156.8 S.

Association Française de Normalisation (AFNOR).(1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 S.

Swedish Standards Institute (SIS).(1995). Water quality - Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13.15 S. (Schwedisch).

Lemna gibba: ASTM International.(2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (neu genehmigt 1998). S. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156. 8 S.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an

indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481- 483.

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Bezugsquellen für *Lemna*-Arten

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria

Department of Botany, University of Toronto

Toronto, Ontario, Kanada, M5S 3 B2

Telefon: +1-416-978-3641

Telefax: +1-416-978-5878

E-Mail: jacreman@botany.utoronto.ca

North Carolina State University

Forestry Dept

Duckweed Culture Collection

Campus Box 8002

Raleigh, NC 27695-8002

United States

Telefon +1 919 515-7572

astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University

SE -106 91

Stockholm

SCHWEDEN

Telefon: +46 8 674 7240

Fax +46 8 674 7636

Umweltbundesamt (UBA)

FG III 3.4

Schichauweg 58

12307 Berlin

DEUTSCHLAND

E-Mail: Lemna@uba.de

LITERATUR

- (1) Hillman, W.S.(1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *The Botanical Review*, 27:221-287.
- (2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanisches Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Schweiz.
- (3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.
- (4) Wang, W.(1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution, Ser B*, 11:1-14.
- (5) Wang, W.(1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research*, 52:7-22.

Anlage 3

Haltung der Stammkultur

Die Stammkulturen können über längere Zeiträume bei niedrigeren Temperaturen (4-10 °C) gebrauchsfähig gelagert werden. Das *Lemna*-Nährmedium kann identisch mit dem für die Tests verwendeten Nährmedium sein; für Stammkulturen können jedoch auch andere nährstoffreiche Medien verwendet werden.

Regelmäßig wird eine gewisse Anzahl junger, hellgrüner Pflanzen entnommen und mit einem keimfreien Verfahren in neue Kulturgefäße mit einem frischen Medium gebracht. Unter den hier empfohlenen kühleren Bedingungen können in Intervallen von bis zu drei Monaten Teilkulturen hergestellt werden.

In den Prüfungen werden chemische reine (mit Säure gereinigte) und sterile gläserne Kulturgefäße verwendet, die keimfrei zu handhaben sind. Bei einer Verunreinigung der Stammkultur (z. B. durch Algen oder Pilze) sind entsprechende Schritte zur Entfernung der verunreinigenden Organismen erforderlich. Algen und die meisten sonstigen verunreinigenden Organismen können durch eine Oberflächensterilisation entfernt werden. Von dem verunreinigten Pflanzenmaterial wird eine Probe genommen, und die Wurzeln werden abgeschnitten. Das Material wird kräftig in sauberem Wasser geschüttelt und dann 30 Sekunden bis 5 Minuten in eine 0,5%ige Natriumhypochloridlösung (v/v) getaucht. Danach wird das Pflanzenmaterial mit sterilem Wasser gespült und in mehreren Schritten in Kulturgefäße jeweils mit frischem Nährmedium gebracht. Bei dieser Behandlung werden viele Fronds sterben, besonders bei längerer Expositionsdauer; einige der überlebenden Fronds sollten jedoch frei von Verunreinigungen sein. Diese Fronds können zur Impfung neuer Kulturen verwendet werden.

Anlage 4

Medien

Für *L. minor* und *L. gibba* werden unterschiedliche Nährmedien empfohlen. Für *L. minor* sollte ein modifiziertes schwedisches Standardmedium (SIS) verwendet werden; für *L. gibba* ist das Medium 20X AAP zu empfehlen. Die Zusammensetzungen beider Medien werden im Folgenden beschrieben. Bei der Herstellung dieser Medien sind chemische Stoffe in Reagenzien- oder Analysequalität und entionisiertes Wasser zu verwenden.

Schwedisches Standard-Lemna-Nährmedium (SIS)

- Die Stammlösungen I-V werden durch Autoklavieren (120 °C, 15 Minuten) oder durch Membranfiltration (Porengröße ca. 0,2 µm) sterilisiert.
- Die Stammlösung VI (sowie optional Stammlösung VII) ist ausschließlich durch Membranfiltration zu sterilisieren; diese Lösungen sollten nicht autoklaviert werden.
- Sterile Stammlösungen werden kühl und dunkel gelagert. Die Stammlösungen I-V sind nach sechs Monaten zu entsorgen; die Stammlösung VI (sowie optional Stammlösung VII) kann einen Monat gelagert werden.

Stamm- lösung Nr.	Stoff	Konzentration in der Stammlösung (g/l)	Konzentration im hergestellten Medium (mg/•l)	Hergestelltes Medium	
				Element	Konzentration (mg/•l)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA 2H ₂ O	0,28	1,4	-	-

VII	MOPS (Puffer)	490	490	-	-
-----	---------------	-----	-----	---	---

Um einen Liter SIS-Medium herzustellen, werden die folgenden Inhaltsstoffe zu 900 ml entionisiertem Wasser hinzugegeben:

- 10 ml Stammlösung I
- 5 ml Stammlösung II
- 5 ml Stammlösung III
- 5 ml Stammlösung IV
- 1 ml Stammlösung V
- 5 ml Stammlösung VI
- 1 ml Stammlösung VII (optional)

Hinweis: Bei bestimmten Prüfchemikalien kann eine weitere Stammlösung VII (MOPS-Pufferlösung) erforderlich sein (siehe Nummer 11).

Der pH-Wert wird wahlweise mit 0,1 oder 1 mol HCl oder NaOH auf $6,5 \pm 0,2$ eingestellt; durch Zugabe von entionisiertem Wasser wird ein Volumen von einem Liter hergestellt.

Nährmedium 20X AAP

Die Stammlösungen werden in sterilem destilliertem oder entionisiertem Wasser hergestellt.

Sterile Stammlösungen werden kühl und dunkel gelagert. Unter diesen Bedingungen beträgt die Lagerfähigkeit der Stammlösungen mindestens 6-8 Wochen.

Für das Medium 20X AAP werden fünf Stamm-Nährlösungen (A1, A2, A3, B und C) hergestellt; dabei sind chemische Stoffe mit Reagenzienqualität zu verwenden. Jeweils 20 ml der Stamm-Nährlösungen werden zu etwa 850 ml entionisiertem Wasser hinzugegeben, um das Nährmedium herzustellen. Der pH-Wert wird wahlweise mit 0,1 oder 1 mol HCl oder NaOH auf $7,5 \pm 0,1$ eingestellt; durch Zugabe von entionisiertem Wasser wird ein Volumen von einem Liter hergestellt. Anschließend wird das Medium durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von (etwa) $0,2 \mu\text{m}$ in ein steriles Behältnis gefiltert.

Das für die Prüfung vorgesehene Nährmedium ist 1-2 Tage vor der Verwendung herzustellen, damit sich der pH-Wert stabilisieren kann. Der pH-Wert des Nährmediums muss vor der Verwendung geprüft und ggf. durch Zugabe von 0,1 oder 1 mol NaOH oder HCl wie oben beschrieben korrigiert werden.

Stamm- lösung	Stoff	Konzentration in der	Konzentration im hergestellten	Hergestelltes Medium
------------------	-------	-------------------------	-----------------------------------	----------------------

Nr.		Stammlösung (g/•l)*	Medium (mg/•l)		
				Element	Konzentration (mg/•l)
A1	NaNO ₃	26	510	Na; N	190; 84
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	12	240	Mg	58,08
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.4	90	Ca	24,04
A2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15	290	S	38,22
A3	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,30	6,0	-	-
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	NaHCO ₃	15	300	Na; C	220; 43

* Wenn nicht anders angegeben

Fußnote: Die theoretisch geeignete Bicarbonat-Endkonzentration (bei der eine nennenswerte Anpassung des pH-Werts nicht erforderlich ist) liegt bei 15 mg/l (und nicht bei 300 mg/l). Trotzdem wird das Medium 20X-AAP – auch im Ringtest dieser Leitlinie – in einer Konzentration von 300 mg/l verwendet. (I. Sims, P. Whitehouse und R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003.WRc plc - Environment Agency.)

STEINBERG-Medium (nach ISO 20079)

Konzentrationen und Stammlösungen

Das modifizierte Steinberg-Medium ist in ISO 20079 nur für *Lemna minor* vorgesehen (da dort ausschließlich *Lemna minor* zugelassen wird); in Tests wurden gute Ergebnisse aber auch mit *Lemna gibba* erzielt.

Bei der Herstellung des Mediums werden chemische Stoffe in Reagenzien- oder Analysequalität und entionisiertes Wasser verwendet.

Das Nährmedium ist aus Stammlösungen oder aus dem 10fach konzentrierten Medium herzustellen, damit ohne Ausfällungen eine größtmögliche Konzentration des Mediums erzielt werden kann.

Tabelle 1: STEINBERG-Medium mit stabilisiertem pH-Wert (modifiziert nach Altenburger)

Bestandteil		Nährmedium	
Makroelemente	Molmasse	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46

Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41
Mikroelemente	Molmasse	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
EDTA-Dinatrium-Dihydrat	372,24	1 500,00	4,03

Tabelle 2: Stammlösungen (Makroelemente)

1. Makroelemente (50fach konzentriert)	g/l
Stammlösung 1: KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
Stammlösung 2: MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
Stammlösung 3: Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Tabelle 3: Stammlösungen (Mikroelemente)

2. Mikroelemente (1000fach konzentriert)	mg/l
Stammlösung 4: H ₃ BO ₃	120,0
Stammlösung 5: ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
Stammlösung 6: Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0

Stammlösung 7: MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
Stammlösung 8: FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
EDTA-Dinatrium-Dihydrat	1 500,00

- Die Stammlösungen 2 und 3 sowie getrennt auch die Stammlösungen 4 bis 7 können gepoolt werden. (Dabei sind die jeweils erforderlichen Konzentrationen zu berücksichtigen.)
- Um die Lagerfähigkeit zu verlängern, sind die Stammlösungen 20 Minuten bei 121 °C zu autoklavieren oder einer Sterilfiltration (Porengröße 0,2 µm) zu unterziehen. Für die Stammlösung 8 wird eine Sterilfiltration (0,2 µm) nachdrücklich empfohlen.

Herstellung der Endkonzentration des STEINBERG-Mediums (modifiziert)

- Zu 20 ml der Stammlösungen 1, 2 und 3 (siehe Tabelle 2) werden etwa 900 ml entionisiertes Wasser zugegeben, um eine Ausfällung zu vermeiden.
- Von den Stammlösungen 4, 5, 6, 7 und 8 wird jeweils 1,0 ml hinzugegeben (siehe Tabelle 3).
- Der pH-Wert wird durch Zugabe eines minimalen Volumens einer NaOH- oder HCl-Lösung auf $5,5 \pm 0,2$ eingestellt.
- Anschließend werden die Lösungen mit Wasser auf ein Volumen von 1000 ml aufgefüllt.
- Wenn die Stammlösungen sterilisiert werden und geeignetes Wasser verwendet wird, ist eine weitere Sterilisierung nicht mehr erforderlich. Wird das endgültige Medium sterilisiert, wird nach dem Autoklavieren (20 Minuten bei 121 °C) die Stammlösung 8 hinzugegeben.

Herstellung des 10fach konzentrierten STEINBERG-Mediums (modifiziert) zur Zwischenlagerung

- Zu 20 ml der Stammlösungen 1, 2 und 3 (siehe Tabelle 2) werden etwa 30 ml entionisiertes Wasser zugegeben, um eine Ausfällung zu vermeiden.
- Von den Stammlösungen 4, 5, 6, 7 und 8 wird jeweils 1,0 ml hinzugegeben (siehe Tabelle 3). Anschließend werden die Lösungen mit Wasser auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt.
- Wenn die Stammlösungen sterilisiert werden und geeignetes Wasser verwendet wird, ist eine weitere Sterilisierung nicht mehr erforderlich. Wird das endgültige Medium sterilisiert, wird nach dem Autoklavieren (20 Minuten bei 121 °C) die Stammlösung 8 hinzugegeben.
- Der pH-Wert des Mediums in der Endkonzentration beträgt $5,5 \pm 0,2$.

- (6) Die folgenden Kapitel C.31 bis C.46 werden angefügt:

**„C.31. Wachstumstest bei Landpflanzen:
Untersuchung von Auflauf und Wachstum von Keimlingen**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 208 (2006). Die Prüfmethode werden regelmäßig unter Berücksichtigung des wissenschaftlichen Fortschritts und der Anwendbarkeit in Rechtsvorschriften überarbeitet und aktualisiert. Diese aktualisierte Prüfmethode dient zur Beurteilung potenzieller Auswirkungen von Chemikalien auf das Auflaufen und das Wachstum von Keimlingen. Insoweit erstreckt sie sich weder auf chronische Wirkungen noch auf Wirkungen auf die Reproduktion (d. h. Samenansatz, Blütenbildung, Reifung der Früchte). Die Expositionsbedingungen und die Eigenschaften der zu prüfenden Chemikalie müssen berücksichtigt werden, um sicherzustellen, dass geeignete Prüfmethode verwendet werden. (Bei der Prüfung von Metallen/Metallverbindungen sind die Wirkung des pH-Wertes und entsprechender Gegenionen zu berücksichtigen) (1). Diese Prüfmethode ist nicht für Pflanzen vorgesehen, die Chemikaliendämpfen ausgesetzt sind. Sie ist anzuwenden bei allgemeinen Chemikalien, Bioziden und Pflanzenschutzprodukten (auch als Pflanzenschutzmittel oder Pestizide bezeichnet). Die Methode wurde ausgehend von bestehenden Methoden entwickelt (2)(3)(4)(5)(6)(7). Außerdem wurden verschiedene weitere Quellen im Zusammenhang mit Prüfungen an Pflanzen berücksichtigt (8)(9)(10). Definitionen der verwendeten Begriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

2. Mit der Prüfung werden die Wirkungen auf den Saatauflauf und das frühe Wachstum höherer Pflanzen beurteilt, die im Boden (oder in einer sonstigen geeigneten Bodenmatrix) der Prüfchemikalie ausgesetzt waren. Saatgut wird mit dem mit der Prüfchemikalie behandelten Boden in Berührung gebracht und gewöhnlich 14 bis 21 Tage nach dem Auflauf von 50 % der Samen in der Kontrollgruppe auf Wirkungen untersucht. Die gemessenen Endpunkte bestehen in der visuellen Beurteilung des Auflaufs, der Ermittlung der Sprossstrockenmasse (alternativ der Sprossfrischmasse) sowie in manchen Fällen der Sprosslänge und in einer Bewertung der sichtbaren schädlichen Wirkungen auf verschiedene Teile der Pflanze. Diese Messungen und Beobachtungen werden mit denen bei unbehandelten Kontrollpflanzen verglichen.
3. Je nach erwartetem Expositionspfad wird die Prüfchemikalie entweder in den Boden (bzw. in eine künstliche Bodenmatrix) eingearbeitet oder auf die Bodenoberfläche aufgebracht, so dass der potenzielle Expositionspfad der Chemikalie angemessen nachgebildet wird. Die Prüfchemikalie wird in

Sammelboden eingearbeitet. Nach der Einarbeitung wird der Boden in Töpfe gefüllt; anschließend wird das Saatgut der betreffenden Pflanzenarten gesät. Bei der Applikation auf die Oberfläche wird die Chemikalie auf den in die Töpfe eingefüllten Boden ausgebracht, in den bereits die Samen gesät wurden. Danach werden die Versuchseinheiten (Kontrollen und behandelte Böden mit Saatgut) unter Bedingungen gehalten, die die Keimung/das Wachstum der Pflanzen fördern.

4. Je nach Ziel der Untersuchung kann die Prüfung zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve oder als Limit-Test mit nur einer Konzentration/Dosierung durchgeführt werden. Wenn die Ergebnisse des auf eine einzige Konzentration/Dosierung beschränkten Tests ein bestimmtes Toxizitätsniveau überschreiten (z. B. wenn Wirkungen von mehr als x % beobachtet werden), wird ein Vorversuch zur Bestimmung der Ober- und der Untergrenze der Toxizität durchgeführt. Darauf folgt ein Test mit mehreren Konzentrationen/Dosierungen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Mit einer geeigneten statistischen Analyse werden die wirksame Konzentration EC_x oder die wirksame Dosierung ER_x (z. B. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) für die empfindlichsten relevanten Parameter bestimmt. Außerdem können mit diesem Test die höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkung (NOEC) und die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC) berechnet werden.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

5. Die folgenden Informationen sind hilfreich zur Bestimmung des voraussichtlichen Expositionspfads der jeweiligen Chemikalie und zur Konzeption der Prüfung: Strukturformel, Reinheit, Wasserlöslichkeit, Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, 1-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient, Sorptionsverhalten des Bodens, Dampfdruck, chemische Beständigkeit gegen Wasser und Licht und biologische Abbaubarkeit.

VALIDITÄT DES TESTS

6. Damit ein Test als gültig gewertet werden kann, müssen die Kontrollen die folgenden Kriterien erfüllen:
 - Es muss eine Auflauftrate von mindestens 70 % erzielt werden.
 - Die Keimlinge weisen keine sichtbaren phytotoxischen Wirkungen auf (z. B. Chlorose, Nekrose, Welken, Verformungen von Blättern und Stängeln), und bei den Pflanzen treten hinsichtlich Wachstumsentwicklung und Morphologie nur solche Unterschiede auf, die für die jeweilige Art normal sind.
 - Die mittlere Überlebensrate der aufgelaufenen Kontrollkeimlinge liegt während der Dauer der Untersuchung bei mindestens 90 %.
 - Die Umweltbedingungen für alle Pflanzen einer bestimmten Art sind identisch, und die Nährmedien enthalten die gleiche Menge Bodenmatrix, Trägermaterial oder Substrat derselben Herkunft.

REFERENZCHEMIKALIE

7. Eine Referenzchemikalie kann regelmäßig getestet werden, um sicherzustellen, dass sich die Leistungsfähigkeit des Tests, die Reaktion der jeweiligen Testpflanzen und die Testbedingungen im Laufe der Zeit nicht erheblich geändert haben. Die Leistungsfähigkeit des Prüfsystems in bestimmten Labors kann auch anhand historischer Messungen der Biomasse und des Wachstums von Kontrollpflanzen beurteilt werden; diese Messungen können auch als laborinterne Qualitätskontrollmaßnahme dienen.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Naturboden – künstliches Substrat

8. Pflanzen können in Töpfen mit sandigem Lehm, lehmigem Sand oder sandiger Lehm-/Tonerde mit einem Anteil von bis zu 1,5 % organischem Kohlenstoff (ca. 3 % organische Bestandteile) gezogen werden. Alternativ können auch handelsübliche Pflanzenerde oder eine künstliche Bodenmischung mit bis zu 1,5 % organischem Kohlenstoff verwendet werden. Tonböden sollten nicht verwendet werden, wenn bekannt ist, dass die Prüfchemikalie eine hohe Tonaffinität besitzt.. Feldboden ist bis auf eine Teilchengröße von 2 mm zu sieben, um eine gleichmäßige Struktur herzustellen und grobe Partikel abzutrennen. Art und Beschaffenheit, der prozentuale Anteil an organischem Kohlenstoff, der pH-Wert und der Salzgehalt (gemessen an der elektrischen Leitfähigkeit des fertig aufbereiteten Bodens) werden erfasst. Der Boden ist nach einer Standard-Klassifizierung einzustufen (11). Um die Wirkung von im Boden befindlichen Erregern zu reduzieren, kann der Boden pasteurisiert oder wärmebehandelt werden.
9. Naturboden kann wegen unterschiedlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften und unterschiedlicher Mikrobenpopulationen die Interpretation der Ergebnisse erschweren und zu stärkeren Schwankungen führen. Diese Variablen wirken sich auf die Fähigkeit des Bodens zur Aufnahme von Feuchtigkeit, auf die chemische Bindungsfähigkeit, auf die Belüftung sowie auf den Gehalt an Nährstoffen und Spurenelementen aus. Über diese Unterschiede bei den physikalischen Faktoren hinaus bestehen Unterschiede auch im Hinblick auf chemische Eigenschaften wie z. B. den pH-Wert und das Redoxpotenzial, die die Bioverfügbarkeit der Prüfchemikalie beeinträchtigen können (12)(13)(14).
10. Für Untersuchungen von Pflanzenschutzprodukten werden in der Regel keine künstlichen Substrate verwendet; sie können aber bei der Untersuchung allgemeiner Chemikalien hilfreich sein sowie dann, wenn die Unterschiede natürlicher Böden minimiert und eine bessere Vergleichbarkeit der Testergebnisse erzielt werden sollen. Die verwendeten Substrate müssen aus inertem Material bestehen, bei dem es nur zu minimalen Wechselwirkungen mit der Prüfchemikalie und/oder dem Lösungsmittelträger kommt. Mit Säure gereinigter Quarzsand, Mineralwolle und Glasperlen (z. B. mit einem Durchmesser von 0,35 bis 0,85 mm) haben sich als geeignete inerte Materialien erwiesen, die die Prüfchemikalie nur minimal absorbieren (15) und eine maximale Verfügbarkeit der Chemikalie zur Aufnahme

durch die Wurzeln des Keimlings gewährleisten. Vermiculit, Perlit oder sonstige stark absorbierende Materialien sind ungeeignet. Um Stress durch Nährstoffmangel zu vermeiden, sind Nährstoffe zur Förderung des Pflanzenwachstums bereitzustellen; hierzu sollten nach Möglichkeit chemische Analysen durchgeführt oder Kontrollpflanzen visuell geprüft werden.

Kriterien für die Auswahl von Arten für die Prüfungen

11. Die ausgewählten Arten müssen in Bezug auf ihre taxonomische Diversität im Pflanzenreich, ihre Verbreitung, ihre Abundanz, die artenspezifischen Lebenszyklusmerkmale und ihren natürlichen Lebensraum ein angemessen breites Spektrum abdecken, um eine entsprechende Reihe von Reaktionen zu ermitteln (8)(10)(16)(17)(18)(19)(20). Bei der Auswahl sind folgende Merkmale der möglicherweise im Test zu verwendenden Arten zu berücksichtigen:

- die Arten haben einheitliche Samen, die aus zuverlässigen Standardquellen für Saatgut leicht zu beschaffen sind und die regelmäßig, zuverlässig und gleichmäßig keimen; die Keimlinge wachsen einheitlich;
- die Pflanzen sind für Labortests geeignet und führen zu verlässlichen und reproduzierbaren Ergebnissen innerhalb von Testanlagen sowie in unterschiedlichen Testanlagen;
- die Empfindlichkeit der geprüften Arten muss sich mit den Reaktionen der Pflanzen decken, die in der durch die jeweilige Chemikalie belasteten Umgebung vorkommen;
- die Arten wurden in gewissem Umfang bereits in anderen Toxizitätstests verwendet und ihr Verhalten in Herbizid-Bioassays, Schwermetall-Screenings, Tests auf Salz- oder Mineralienbelastung oder in Allelopathie-Untersuchungen deutet auf Empfindlichkeit gegenüber vielfältigen Belastungsfaktoren hin;
- sie sind mit den Wachstumsbedingungen der Prüfung kompatibel;
- sie erfüllen die Validitätskriterien der Prüfung.

Anlage 2 enthält einige in Tests bislang am häufigsten verwendeten Arten, Anlage 3 eine Liste potenzieller Nichtkulturpflanzen.

12. Wie viele Arten zu prüfen sind, hängt von den jeweiligen Regulierungsanforderungen ab; daher enthält diese Prüfmethode hierzu keine Angaben.

Applikation der Prüfchemikalie

13. Die Chemikalie wird in einen geeigneten Träger (z. B. Wasser, Aceton, Ethanol, Polyethylenglykol, Gummiarabikum oder Sand) gegeben. Gemische (Fertigprodukte oder Formulierungen) mit Wirkstoffen und mit verschiedenen Hilfsstoffen können ebenfalls geprüft werden.

Einarbeitung in den Boden/in künstliches Substrat

14. In Wasser lösliche oder suspendierbare Chemikalien können in Wasser gegeben werden; anschließend wird die Lösung mithilfe einer geeigneten Mischvorrichtung mit dem Boden vermischt. Dieser Prüfungstyp kommt dann in Betracht, wenn eine Belastung durch die Chemikalie über den Boden oder über im Boden enthaltenes Porenwasser gegeben ist und die Gefahr der Aufnahme über die Wurzeln besteht.

Die zugegebene Menge der Prüfchemikalie darf die Wasserhaltekapazität des Bodens nicht überschreiten. Bei allen Testkonzentrationen muss das gleiche Volumen Wasser zugegeben werden, jedoch nur so viel, dass das Bodensubstrat nicht verklumpt.

15. Schlecht wasserlösliche Chemikalien sind in einem geeigneten flüchtigen Lösungsmittel (z. B. Aceton oder Ethanol) aufzulösen und mit Sand zu mischen. Das Lösungsmittel kann dann aus dem Sand abgetrennt werden, indem ein Luftstrom auf den kontinuierlich durchmischten Sand geleitet wird. Der so behandelte Sand wird mit dem für den Versuch vorgesehenen Boden gemischt. Eine zweite Kontrolle wird ausschließlich aus Sand und Lösungsmittel hergestellt. Bei allen Dosierungsstufen und bei der zweiten Kontrolle werden gleiche Mengen Sand, dem zunächst Lösungsmittel beigemischt und dann entzogen wurde, hinzugegeben. Für feste, unlösliche Prüfchemikalien wird trockener Boden in einer geeigneten Mischvorrichtung mit der Chemikalie gemischt. Anschließend wird der Boden in Töpfe gefüllt, und das Saatgut wird umgehend eingesät.
16. Wenn anstelle von Naturboden ein künstliches Substrat verwendet wird, können wasserlösliche Chemikalien unmittelbar vor Beginn des Tests in der Nährlösung aufgelöst werden. Chemikalien, die nicht wasserlöslich sind, aber mit einem Lösungsmittelträger in Wasser suspendiert werden können, sind mit dem Träger zur Nährlösung hinzuzugeben. Nicht wasserlösliche Chemikalien, für die es auch keinen nicht toxischen wasserlöslichen Träger gibt, sind in einem geeigneten flüchtigen Lösungsmittel aufzulösen. Die Lösung wird mit Sand oder Glasperlen gemischt und in einem Vakuum-Rotationstrockner verdampft, so dass eine gleichmäßige Schicht der Chemikalie auf dem Sand oder den Perlen verbleibt. Vor der Befüllung der Töpfe ist eine gewogene Menge der Perlen mithilfe desselben organischen Lösungsmittels zu extrahieren und auf die Chemikalie zu prüfen.

Ausbringung auf die Oberfläche

17. Im Fall von Pflanzenschutzprodukten wird die Prüfchemikalie häufig ausgebracht, indem die Oberfläche des Bodens mit der Testlösung besprüht wird. Die gesamte bei den Tests verwendete Ausrüstung einschließlich der Ausrüstung zur Herstellung und Applikation der Prüfchemikalie muss eine solche Konstruktion und Kapazität aufweisen, dass die Tests mit der betreffenden Ausrüstung in der erforderlichen Genauigkeit und mit reproduzierbarer Abdeckung ausgeführt werden können. Die Bodenoberfläche muss gleichmäßig abgedeckt werden. Insbesondere ist darauf zu achten, dass Chemikalien nicht von der Ausrüstung adsorbiert werden und nicht mit der Ausrüstung reagieren können (z. B. Kunststoffschläuche und lipophile Chemikalien oder Stahlbauteile und Komponenten). Die Prüfchemikalie wird in gleicher Weise wie bei einem typischen Sprühbehälter auf die Bodenoberfläche aufgesprüht. Im Allgemeinen bewegen sich die Sprühvolumina im Bereich der normalen landwirtschaftlichen Praxis, und die Volumina (Wassermenge usw.) sind zu protokollieren.) Die Düsen sind so zu wählen, dass der Boden gleichmäßig abgedeckt wird. Wenn Lösungsmittel und Träger verwendet werden, ist eine zweite Gruppe von Kontrollpflanzen ausschließlich mit dem Lösungsmittel/Träger zu behandeln. Bei Pflanzenschutzprodukten, die als Formulierungen geprüft werden, ist dies nicht erforderlich.

Verifizierung der Konzentration/Dosierung der Prüfchemikalie

18. Die angewendeten Konzentrationen/Dosierungen sind durch eine geeignete Analyse zu bestätigen. Bei löslichen Chemikalien können sämtliche Testkonzentrationen/-dosierungen bestätigt werden, indem die Testlösung mit der höchsten Konzentration analysiert wird und Aufzeichnungen über anschließende Verdünnungen und über die Verwendung kalibrierter Ausrüstung (z. B. kalibrierter Glasgeräte oder kalibrierte Sprühausrüstung) geführt werden. Bei unlöslichen Chemikalien muss das Gewicht der in den Boden eingebrachten Prüfchemikalie zugrunde gelegt werden. Wenn ein Homogenitätsnachweis erforderlich ist, muss der Boden unter Umständen analysiert werden.

VERFAHREN

VERSUCHSAUFBAU

19. Saatgut derselbe Art wird in Töpfe eingesät. Die Anzahl der Samen pro Topf hängt von der Art, der Größe des Topfs und der Testdauer ab. In den Töpfen sollten sich so viele Pflanzen befinden, dass angemessene Wachstumsbedingungen gegeben sind und die Töpfe während der Testdauer nicht zu voll werden. Die maximale Dichte dürfte je nach Samengröße bei drei bis zehn Samen pro 100 cm² liegen. Zu empfehlen sind beispielsweise ein bis zwei Mais-, Soja-, Tomaten-, Gurken- oder Zuckerrübenpflanzen pro 15-cm-Topf, drei Raps- oder Erbsenpflanzen pro 15-cm-Topf und fünf bis zehn Zwiebeln oder Weizenhalme oder sonstige Pflanzen mit kleinen Samen pro 15-cm-Topf. Die Anzahl der Töpfe mit dem Saatgut und die der Replikate (ein Replikat ist als ein Topf definiert, deshalb stellen Pflanzen in demselben Topf kein Replikat dar) muss für eine optimale statistische Analyse ausreichend sein (21). Wenn im Test Arten mit wenigen großen Samen je Topf (Replikat) verwendet werden, ist eine größere Variabilität zu erwarten als bei Arten, bei denen eine größere Anzahl kleiner Samen pro Topf gesät werden kann. Diese Variabilität kann minimiert werden, indem in alle Töpfe die gleiche Anzahl Samen gesät wird.
20. Mit Kontrollgruppen wird sichergestellt, dass die beobachteten Wirkungen ausschließlich mit der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie in Zusammenhang stehen bzw. ausschließlich der Prüfchemikalie zuzurechnen sind. Die Kontrollgruppe muss mit Ausnahme der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie in jeder Hinsicht mit der Prüfgruppe identisch sein. In einem Test müssen alle verwendeten Pflanzen einschließlich der Kontrollen aus derselben Quelle stammen. Um Verzerrungen zu vermeiden, sind Test- und Kontrolltöpfe zu randomisieren.
21. Mit einem Insektizid oder einem Fungizid behandeltes Saatgut (d. h. gebeiztes Saatgut) darf nicht verwendet werden. Einige Regulierungsbehörden erlauben jedoch die Verwendung bestimmter nicht systemischer Kontaktfungizide (z. B. Captan, Thiram) (22). Wenn Bedenken hinsichtlich der Eintragung von Erregern über das Saatgut bestehen, kann das Saatgut kurz in eine schwache Hypochloritlösung (5 %) gegeben, gründlich unter fließendem Wasser gewaschen und getrocknet werden. Es dürfen keine Behandlungen mit anderen

Pflanzenschutzprodukten vorgenommen werden.

Prüfbedingungen

22. Die Prüfbedingungen müssen etwa den Bedingungen entsprechen, die für ein normales Wachstum der geprüften Arten und Sorten erforderlich sind. (Beispiele für Prüfbedingungen sind Anlage 4 zu entnehmen.) Die auflaufenden Pflanzen sind entsprechend guter gärtnerischer Praxis in Klimakammern, Phytotronanlagen oder Gewächshäusern zu halten. In Pflanzenwachstumsanlagen umfasst diese gute Praxis beispielsweise die Regelung sowie die Aufzeichnung von Temperatur, Feuchtigkeit, Kohlendioxid-Konzentration, Lichtverhältnissen (Intensität, Wellenlänge, photosynthetisch aktive Strahlung), Beleuchtungsdauer und Bewässerung in angemessener Häufigkeit (z. B. täglich), um ein gutes Wachstum der Pflanzen (gemessen an der Entwicklung der Kontrollpflanzen der ausgewählten Arten) sicherzustellen. Die Temperaturen in Gewächshäusern müssen durch Belüftungs-, Heiz- und/oder Kühlsysteme geregelt werden. Für Tests in Gewächshäusern werden im Allgemeinen die folgenden Bedingungen empfohlen:

- Temperatur: 22 ± 10 °C;
- Feuchtigkeit: 70 ± 25 %;
- Photoperiode: mindestens 16 Stunden;
- Lichtintensität: 350 ± 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Zusätzliche Beleuchtung kann erforderlich sein, wenn die Intensität unter 200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, Wellenlänge 400 - 700 nm, absinkt (außer bei bestimmten Arten mit geringerem Lichtbedarf).

Im Laufe der Prüfung sind die Umgebungsbedingungen zu überwachen und zu protokollieren. Die Pflanzen müssen in nicht porösen Kunststofföpfen oder in glasierten Töpfen mit einer Schale oder einem Untersetzer unter dem Topf gezogen werden. Die Töpfe können regelmäßig umgestellt werden, um Wachstumsunterschiede (infolge unterschiedlicher Prüfbedingungen in den Wachstumsanlagen) zu minimieren. Außerdem müssen die Töpfe so groß sein, dass die Pflanzen normal wachsen können.

23. Zur Erhaltung der Wuchskraft können den Böden bei Bedarf Nährstoffe zugeführt werden. Notwendigkeit und Zeitpunkt der Gabe zusätzlicher Nährstoffe lassen sich durch Beobachtung der Kontrollpflanzen ermitteln. Die Testbehältnisse sollten von unten bewässert werden (z. B. mit Glasfaserdochten). Anfänglich kann aber auch von oben bewässert werden, um die Keimung anzuregen und um bei Oberflächenapplikation das Eindringen der Chemikalie in den Boden zu erleichtern.

24. Die spezifischen Wachstumsbedingungen sollten für die zu prüfende Art und die jeweilige Prüfchemikalie angemessen sein. Die Pflanzen der Kontrollgruppe und die behandelten Pflanzen sind unter den gleichen Umgebungsbedingungen zu halten; es sollten jedoch geeignete Maßnahmen getroffen werden, um Kreuzexpositionen (z. B. gegen flüchtige Chemikalien) zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen sowie der Kontrollgruppen gegen die Prüfchemikalie zu vermeiden.

Prüfung mit einer einzigen Konzentration/Dosierung

25. Bei der Bestimmung der Konzentration/Dosierung einer Chemikalie zur Durchführung eines Tests mit einer einzigen Konzentration/Dosierung (Challenge- oder Limit-Test) sind eine Reihe von Faktoren zu beachten. Bei allgemeinen Chemikalien gehören dazu die physikalisch-chemischen Eigenschaften der betreffenden Chemikalie. Bei Pflanzenschutzprodukten sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften und die Art der Verwendung der Prüfchemikalie, die maximale Konzentration/Dosierung, die Anzahl der Aufbringungen pro Saison und/oder die Persistenz der Prüfchemikalie zu berücksichtigen. Um festzustellen, ob eine allgemeine Chemikalie phytotoxische Eigenschaften besitzt, kann eine Prüfung mit maximal 1000 mg/kg trockenem Boden angemessen sein.

Vorversuch

26. Erforderlichenfalls kann ein Vorversuch durchgeführt werden, um die in der definitiven Dosis-Wirkungs-Studie zu testenden Konzentrationen/Dosierungen zu bestimmen. Im Vorversuch sollten die Testkonzentrationen/-dosierungen weit auseinander liegen (z. B. 0,1, 1,0, 10, 100 and 1000 mg/kg trockener Boden). Im Fall von Pflanzenschutzprodukten kann von der empfohlenen oder maximalen Konzentration oder Dosierung ausgegangen werden (z. B. 1/100, 1/10, 1/1 der empfohlenen/maximalen Konzentration oder Dosierung).

Prüfung mit mehreren Konzentrationen/Dosierungen

27. Ziel der Prüfung mit mehreren Konzentrationen/Dosierungen sind entsprechend den Anforderungen der Regulierungsbehörden die Feststellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung und die Bestimmung eines EC_x - bzw. ER_x -Werts für Auflauf, Biomasse und/oder sichtbare Wirkungen im Vergleich zu nicht exponierten Kontrollen.
28. Die Abstände zwischen den Konzentrationen oder Dosierungen und ihre Anzahl sollten hinreichend sein, um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zuverlässig feststellen, eine Regressionsgleichung aufstellen und die Werte für EC_x oder ER_x bestimmen zu können. Die ausgewählten Konzentrationen/Dosierungen müssen die zu ermittelnden EC_x - oder ER_x -Werte einschließen. Wenn beispielsweise ein EC_{50} -Wert benötigt wird, sollten die Prüfungen bei Dosierungen durchgeführt werden, bei denen eine Wirkung im Bereich von 20-80 % zu erwarten ist. Hierzu werden mindestens fünf Testkonzentrationen/-dosierungen mit einer geometrischen Reihe sowie eine unbehandelte Kontrolle empfohlen, wobei sich die Konzentrationen/Dosierungen höchstens um den Faktor 3 unterscheiden sollten. Für jede Behandlungsgruppe und für jede Kontrollgruppe sind mindestens vier Replikate vorzusehen, und insgesamt sind mindestens 20 Samen zu verwenden. Bei bestimmten Pflanzen mit schlechter Keimung oder unterschiedlicher Wachstumsentwicklung sind unter Umständen auch mehr Replikate erforderlich, um die statistische Aussagekraft der Prüfung zu erhöhen. Wenn eine größere Anzahl an Testkonzentrationen/-dosierungen verwendet wird, kann die Anzahl der Replikate reduziert werden. Muss die NOEC bestimmt werden, sind unter Umständen mehr Replikate erforderlich, um die erwünschte statistische Aussagekraft zu erzielen (23).

Beobachtungen

29. Während der Beobachtungsdauer (d. h. 14 bis 21 Tage nach Auflauf von 50 % der Kontrollpflanzen sowie gegebenenfalls auch der Kontrollen mit Lösungsmitteln) werden die Pflanzen häufig (mindestens wöchentlich, möglichst sogar täglich) auf Auflaufen und sichtbare Anzeichen von Phytotoxizität und Mortalität kontrolliert. Am Ende der Prüfung werden der Prozentanteil der aufgelaufenen Pflanzen und die Biomasse der überlebenden Pflanzen sowie sichtbare Schädigungen an verschiedenen Pflanzenteilen protokolliert. Zu Letzteren zählen Anomalien im Aussehen der aufgelaufenen Keimlinge, Wachstumshemmungen, Chlorose, Entfärbungen, Mortalität und Wirkungen auf die Entwicklung der Pflanzen. Die endgültige Biomasse kann anhand der endgültigen durchschnittlichen Spross-Trockenmasse der überlebenden Pflanzen ermittelt werden, indem die Pflanzen am Boden abgeschnitten und dann bei 60 °C auf ein konstantes Gewicht getrocknet werden. Alternativ kann die endgültige Biomasse auch anhand der Spross-Frischmasse bestimmt werden. Die Länge der Triebe kann ein weiterer Endpunkt sein, wenn von den Regulierungsbehörden gefordert. Es muss ein einheitliches System für die Beurteilung sichtbarer Schäden verwendet werden, um feststellbare toxische Reaktionen bewerten zu können. Beispiele für qualitative und quantitative visuelle Beurteilungen sind den Quellen (23) und (24) zu entnehmen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Statistische Analyse

Prüfung mit einer einzigen Konzentration/Dosierung

30. Für jede Pflanzenart sind die ermittelten Daten mithilfe einer geeigneten statistischen Methode zu analysieren (21). Die Wirkung bei der Testkonzentration/-dosierung ist ebenso zu protokollieren wie gegebenenfalls die Tatsache, dass bei der Testkonzentration/-dosierung eine bestimmte Wirkung nicht eintritt (z. B. festgestellte Wirkung $<x$ % bei Konzentration oder Dosierung y).

Prüfung mit mehreren Konzentrationen/Dosierungen

31. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung wird mithilfe einer Regressionsgleichung aufgestellt. Dabei können verschiedene Modelle zur Anwendung kommen. Für die Bestimmung der EC_x - oder ER_x -Werte (etwa EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} oder ER_{50}) und der entsprechenden Konfidenzgrenzen für das Auflaufen als quantale Daten beispielsweise könnten u. a. das Logit-, das Probitmodell, die Weibull-, die Spearman-Kärber- oder die Trimmed Spearman-Kärber-Methode geeignet sein. Das Wachstum der Keimlinge (Gewicht und Länge) als kontinuierliche Endpunkte EC_x oder ER_x und die entsprechenden Konfidenzgrenzen können mit geeigneten Regressionsanalysen (z. B. durch nicht lineare Regressionsanalyse nach Bruce-Versteeg (25)) bestimmt werden. Nach Möglichkeit sollte R^2 bei den empfindlichsten Arten mindestens 0,7 betragen, und die Testkonzentrationen/-dosierungen sollten Wirkungen im Bereich von 20-80 % einschließen. Zur Ermittlung der NOEC sind leistungsfähige statistische Tests zu empfehlen, die auf Basis der Datenverteilung ausgewählt werden sollten (21) (26).

Prüfbericht

32. Der Prüfbericht muss die Ergebnisse der Untersuchungen sowie eine detaillierte Beschreibung der Prüfbedingungen, eine eingehende Diskussion der Ergebnisse, eine Datenanalyse und die Schlussfolgerungen der Analyse enthalten. Eine tabellarische Übersicht und eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist beizufügen. Der Bericht muss folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- chemische Kenndaten, relevante Eigenschaften der geprüften Chemikalie (z. B. log P_{ow} , Wasserlöslichkeit, Dampfdruck und gegebenenfalls Angaben zum Verbleib und zum Verhalten in der Umwelt);
- Angaben zur Herstellung der Testlösung und zur Verifizierung von Testkonzentrationen wie unter Nummer 18 beschrieben.

Im Test verwendete Art:

- Angaben zum Testorganismus; Art/Sorte, Pflanzenfamilien, wissenschaftliche und allgemeine Bezeichnung, möglichst genaue Angaben zu Quelle und Herkunft des Saatguts (d. h. Name des Lieferanten, Keimrate, Größenklasse der Samen, Chargen- oder Losnummer, Saatjahr oder Wachstumsaison, Datum der Bewertung der Keimung), Lebensfähigkeit usw.;
- Anzahl der geprüften ein- und zweikeimblättrigen Arten;
- Gründe für die Auswahl der Arten;
- Beschreibung der Lagerung, der Behandlung und der Erhaltung des Saatguts.

Prüfbedingungen:

- Prüfanlage (z. B. Wachstumskammer, Phytotron und Gewächshaus);
- Beschreibung des Prüfsystems (z. B. Abmessungen der Töpfe, Topfmaterial und Bodenmenge);
- Merkmale des Bodens (Textur oder Typ: Partikelverteilung und Klassifizierung, physikalische und chemische Eigenschaften einschließlich Prozentanteil organischer Materie und organischen Kohlenstoffs sowie pH-Wert);
- Vorbereitung des Bodens/Substrats vor der Prüfung (natürlicher und künstlicher Boden, Sand usw.);
- Beschreibung des Nährmediums, falls verwendet;
- Applikation der Prüfchemikalie: Beschreibung der Applikationsmethode, Beschreibung der Ausrüstung, der Exposition (Dosierung und Volumina) einschließlich chemischer Verifizierung, Beschreibung der Kalibrierungsmethode und der Umgebungsbedingungen während der Applikation;
- Wachstumsbedingungen: Lichtintensität (z. B. photosynthetisch aktive Strahlung), Photoperiode, Temperaturen (max./min.), Bewässerungsplan und -methode, Düngung;
- Anzahl der Samen pro Topf, Anzahl der Pflanzen pro Dosis, Anzahl der Replikate (Töpfe) pro Expositionsrunde;
- Typ und Anzahl der Kontrollen (negative und/oder positive Kontrollen sowie Lösungsmittelkontrollen, falls verwendet);
- Dauer der Prüfung.

Ergebnisse:

- Tabelle mit allen Endpunkten für alle Replikate, Testkonzentrationen/-dosierungen und Arten;
- Anzahl und Prozentsatz aufgelaufener Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen;
- Messungen der Biomasse (Spross-Trockenmasse oder -Frischmasse) der Pflanzen ausgedrückt als Prozentsatz der Kontrollen;
- Länge der Pflanzentriebe als Prozentsatz der Kontrollen, falls gemessen;
- Prozentanteil sichtbarer Schäden sowie qualitative und quantitative Beschreibung der sichtbaren Schäden (Chlorose, Nekrose, Welken, Verformungen von Blättern und Stängeln sowie gegebenenfalls des Ausbleiben von Wirkungen) durch die Prüfchemikalie im Vergleich zu Kontrollpflanzen;
- Beschreibung der Skala zur Beurteilung sichtbarer Schäden, wenn eine visuelle Beurteilung vorliegt;
- bei Untersuchungen mit einer einzigen Dosierung ist der Prozentanteil der Schäden zu protokollieren;
- EC_x - oder ER_x -Werte (z. B. EC_{50} , ER_{50} , EC_{25} , ER_{25}) und entsprechende Konfidenzgrenzen. Wenn Regressionsanalysen vorgenommen werden, sind der Standardfehler für die Regressionsgleichung und der Standardfehler der einzelnen Parameterschätzungen (z. B. Steigung und Schnittpunkt) anzugeben;
- NOEC (und LOEC), falls berechnet;
- Beschreibung der statistischen Verfahren und der zugrunde gelegten Annahmen;
- grafische Darstellung dieser Daten und der Dosis-Wirkungs-Beziehung der im Test verwendeten Art;

Abweichungen von den für diese Prüfmethode beschriebenen Verfahren und außergewöhnliche Vorkommnisse während der Prüfung.

LITERATUR

- (1) Schrader, G., Metge, K., und Bahadir, M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. *Applied Soil Ecology*, 7, 189-193.
- (2) Internationale Organisation für Normung (1993). ISO 11269-1. Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora - Teil 1: Verfahren zur Messung der Wurzelwachstumshemmung.
- (3) Internationale Organisation für Normung (1995). ISO 11269-2. Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora - Teil 2: Wirkung von verunreinigten Böden auf Saataufgang und frühes Wachstum höherer Pflanzen.
- (4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
- (5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.
- (6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:
 - 850.4000: Background - Non-target Plant Testing;
 - 850.4025: Target Area Phytotoxicity;
 - 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);
 - 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;
 - 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;
 - 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.
- (7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesure de l'inhibition de la croissance des racines.
- (8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Kanada.

- (9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., und Zwerger, P. (1997). Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Nichtzielorganismen. Diskussionspapier zur Risikoabschätzung und Risikominimierung für terrestrische Nichtzielorganismen (Flora und Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. Nr. 48.
- (10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., und Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario, Kanada.
- (11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- (12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. *In*: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, S. 163-206.
- (13) Beall, M.L., Jr., und Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.
- (14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R., und Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.
- (15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 S., FDA, Washington, DC.
- (16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L., und Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174.
- (17) Boutin, C.; Elmegaard, N., und Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.
- (18) Boutin, C., und Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides – An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.
- (19) Boutin, C., und Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

- (20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P., und Maguire, R.J. (2000). Effects of the sulfonyleurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Envir. Toxicol. Chem.* 19 (10): 2532-2541.
- (21) OECD (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (22) Hatzios, K.K., und Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. *Rev. Weed Sci.* 1:1-63.
- (23) Hamill, P.B., Marriage, P.B., und G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. *Weed Science* 25:386-389.
- (24) Frans, R.E., und Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. *In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science*, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.
- (25) Bruce, R.D., und Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1485-1492.
- (26) Kapitel C.33: Reproduktionstest mit Regenwürmern (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Wirkstoff: ein Stoff, mit dem eine bestimmte biologische Wirkung erzielt werden soll (z. B. Bekämpfung von Insekten, Pflanzenkrankheiten oder Unkräutern im jeweils behandelten Bereich); auch als Wirkstoff technischer Qualität bezeichnet.

Chemikalie: ein Stoff oder eine Mischung.

Pflanzenschutzmittel oder Pestizide: Stoffe mit spezifischer biologischer Wirkung, die gezielt zum Schutz von Pflanzen gegen Schädlinge (z. B. Pilze, Insekten und konkurrierende Pflanzen) eingesetzt werden.

EC_x, Konzentration mit einer Wirkung von x %, oder ER_x, Dosis mit einer Wirkung von x %: die Konzentration oder Dosis, bei der es in einem Test zu einer unerwünschten Änderung des Endpunkts um x % gegenüber der jeweiligen Kontrolle kommt (z. B. Reduzierung des Auflaufs, des Sprossgewichts, der endgültigen Anzahl vorhandener Pflanzen oder Zunahme sichtbarer Schäden um 25 % oder 50 %, entsprechend einer EC₂₅/ER₂₅ bzw. EC₅₀/ER₅₀).

Auflauf: Austreten der Koleoptile (Keimscheide) oder der Kotyledone (Keimblatt) aus dem Boden.

Formulierung: für den Handel hergestelltes Produkt mit dem Wirkstoff; auch als Endpräparat¹ oder für den typischen Verwendungszweck bestimmtes Endprodukt bezeichnet.

LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*): niedrigste geprüfte Konzentration der Prüfchemikalie, bei der eine Wirkung beobachtet wurde. Bei dieser Prüfung hat die der LOEC entsprechende Konzentration innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle eine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$) und ist höher als die NOEC.

Nichtzielpflanzen: Pflanzen außerhalb des Zielpflanzenbereichs. Bei Pflanzenschutzmitteln bezieht diese Bezeichnung sich gewöhnlich auf Pflanzen außerhalb des behandelten Bereichs.

¹ Endpräparat: im Handel angebotenes formuliertes Produkt mit dem Wirkstoff.

NOEC (*No observed Effect Concentration*): Die höchste Konzentration der Prüfchemikalie, bei der keine Wirkung beobachtet wurde. Bei diesem Test hat die der NOEC entsprechende Konzentration innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$).

Phytotoxizität: in Messungen und visuellen Prüfungen festgestellte schädliche Abweichungen vom normalen Aussehen und Wachstum der Pflanzen aufgrund der Wirkung einer bestimmten Chemikalie.

Replikat: Versuchseinheit, die die Kontrollgruppe und/oder die Behandlungsgruppe repräsentiert. Bei diesen Untersuchungen ist der Topf als Replikat definiert.

Visuelle Prüfung: Beurteilung des sichtbaren Schadens anhand von Beobachtungen zur Haltung der Pflanze, zur Wuchskraft, zu Missbildungen, Chlorose, Nekrose sowie zum Gesamteindruck im Vergleich zu einer Kontrolle.

Prüfchemikalie: ein Stoff oder eine Mischung, der bzw. die nach dieser Methode geprüft wird.

Anlage 2

LISTE DER ÜBLICHERWEISE FÜR PFLANZENTESTS VERWENDETEN ARTEN

Familie	Art	Gewöhnliche Bezeichnung
<i>DICOTYLEDONAE</i>		
Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Möhre
Asteraceae (Compositae)	<i>Helianthus annuus</i>	Sonnenblume
Asteraceae (Compositae)	<i>Lactuca sativa</i>	Gartensalat
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Weißer Senf
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Chinakohl
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Raps
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Kohl
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Rübsen
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Gartenkresse
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	Rettich

(Cruciferae)		
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Rübe
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Gurke
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Glycine max (G. soja)</i>	Sojabohne
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Mungobohne
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gartenbohne
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Erbse
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Bockshornklee
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Gewöhnlicher Hornklee
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Wiesenklee
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Futterwicke
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Flachs
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Buchweizen
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicon</i>	Tomate
<i>MONOCOTYLEDONAE</i>		
Liliaceae (Amarylladaceae)	<i>Allium cepa</i>	Zwiebel

Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Hafer
Poaceae (Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Gerste
Poaceae (Gramineae)	<i>Lolium perenne</i>	Deutsches Weidelgras
Poaceae (Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Reis
Poaceae (Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Roggen
Poaceae (Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Körner-Sorghum, Mohrenhirse
Poaceae (Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Weichweizen
Poaceae (Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Mais

Anlage 3

LISTE POTENZIELLER NICHTKULTURPFLANZEN

OECD-Liste potenzieller Arten für Toxizitätsprüfungen an Pflanzen

HINWEIS: Die folgende Tabelle enthält Informationen zu 52 Nichtkulturpflanzen (Literaturangaben sind jeweils in Klammern nachgestellt). Die genannten Auflaufzeiten stammen aus der veröffentlichten Literatur und dienen nur als Anhaltspunkt. In Abhängigkeit von der Herkunft des Saatguts und anderen Faktoren kann es im Einzelfall zu Abweichungen kommen.

FAMILIE Botanischer Name der Art (gemeiner deutscher Name)	Lebensdauer ¹ und Lebensraum	Samengewicht (mg)	Photo- periode für Keimung oder Wachstum ²	Saattiefe (mm) ³	Keimzeit (Tage) ⁴	Spezialbehandlungen ⁵	Toxizitätstest ⁶	Saatgut- Anbieter ⁷	Sonstige Literatur ⁸
APIACEAE <i>Torilis japonica</i> (Gewöhnlicher Klettenkerbel)	A, B gestörte Flächen, Hecken, Weiden (16, 19)	1,7 - 1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	Stratifikation (Kälte) (7, 14, 18, 19); unter Umständen ist eine Reifung erforderlich (19); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1, 19); keine Spezialbehandlungen (5)	NACH (5)		
ASTERACEAE <i>Bellis perennis</i> (Gänseblümchen)	P Grasflächen, Äcker, Rasen (16, 19)	0,09-0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (18, 19); keine Spezialbehandlungen (4, 14)	NACH (4)	A, D, F	7

<i>Centaurea cyanus</i> (Kornblume)	A Felder, Straßenränder, offene Lebensräume (16)	4,1-4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	keine Spezialbehandlungen (2, 4)	NACH (2,4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (Schwarze Flockenblume)	P Felder, Straßenränder, offene Lebensräume (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	Reifung kann erforderlich sein (18, 19); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (19); keine Spezialbehandlungen (5, 14, 26)	NACH (5, 22, 26)	a	
<i>Inula helenium</i> Alant	P feuchte, gestörte Standorte (16)	1 - 1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		keine Spezialbehandlungen (4)	NACH (4)	A, F	
<i>Leontodon hispidus</i> (Steifhaariger Löwenzahn)	P Felder, Straßenränder, gestörte Flächen (16, 19)	0,85 -1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	Keimung durch Bestrahlung gehemmt (17, 18, 19); keine Spezialbehandlungen (5, 23)	NACH (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (Rudbeckie)	B, P gestört (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	keine Spezialbehandlungen (4, 14, 33)	NACH (4, 33)	C, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> Kanadische Goldrute	P Weiden, offene Flächen (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	zu gleichen Teilen mit Sand mischen und 24 h in 500 ppm GA einweichen (11); keine Spezialbehandlungen (4)	NACH (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicum</i> (Spitzklette)	A Felder, offene Lebensräume (16)	25-61 (14, 29)		0(1) 5(29)		Keimung kann durch Dunkelheit gehemmt werden (1); 12 h in warmem Wasser einweichen (29)	VOR UND NACH (31)	a	
<i>Xanthium spinosum</i> (Dornige Spitzklette)	A offene Lebensräume	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		Skarifikation (14); keine Spezialbehandlungen (6)	VOR UND NACH (6)	a	

	(16)								
<i>Xanthium strumarium</i> (Gewöhnliche Spitzklette)	A Felder, offene Lebensräume (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		keine Spezialbehandlungen (6, 14, 21)	VOR UND NACH (6, 21, 28, 31)	a	
BRASSICACEAE <i>Cardamine pratensis</i> (Wiesenschaumkraut)	P Felder, Straßenränder, Rasen (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	Keimung durch Bestrahlung gehemmt (18, 19); keine Spezialbehandlungen (5, 14, 22)	NACH (5, 22)	F	
CARYOPHYLLACEAE <i>Lychnis flos-cuculi</i> (Kuckucks-Lichtnelke)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	Reifung kann erforderlich sein (18); keine Spezialbehandlungen (5, 14, 15, 22-26)	NACH (5, 15, 22- 26)	F	
Chenopodiaceae <i>Chenopodium album</i> (Weißer Gänsefuß)	a Feldränder, gestörte Flächen (16, 19)	0,7-1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	Behandlung je nach Farbe der Samen unterschiedlich (19); trockene Keimruhe (19); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1, 18, 19); Stratifikation (Kälte) (18); keine Spezialbehandlungen (14, 34)	VOR UND NACH (28, 31, 34)	a	32
CLUSIACEAE <i>Hypericum perforatum</i> (Echtes Johanniskraut)	P Felder, Äcker, offene Lebensräume (16, 19)	0,1-0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90%) (18)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1, 18, 19) keine Spezialbehandlungen (5, 14, 15, 25, 27)	NACH (5, 15, 25, 27)	A, E, F	

CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (Efeu-Prunkwinde)	a Straßenränder, offene Lebensräume, Maisfelder (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1) keine Spezialbehandlungen (6, 21)	VOR UND NACH (6, 12, 21, 28)	a	
CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (Knolliges Zypergras)	P Äcker, Weiden, Straßenränder (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1) keine Spezialbehandlungen (6, 10, 14)	VOR UND NACH (6, 28, 31)	B	7
FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (Gewöhnlicher Hornklee)	P Grasflächen, Straßenränder, offene Lebensräume (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	Skarifikation (14, 19) Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (18, 19); keine Spezialbehandlungen (23, 25)	NACH (5, 23, 25)	A, D, E, F	
<i>Senna obtusifolia</i> (Senna)	A feuchte Wälder (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		Samen 24 h in Wasser einweichen (9) Skarifikation (14); je nach Farbe unterschiedliche Lebensfähigkeit der Samen (1); keine Spezialbehandlungen (6)	NACH (6,9)	a	

<i>Sesbania exaltata</i> (Hanf)	A Schwemmboden (16)	11-13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		Samen 24 h in Wasser einweichen (9) Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1); keine Spezialbehandlungen (21)	VOR UND NACH (9, 21, 28, 31)	a	
<i>Trifolium pratense</i> (Wiesenklees)	P Felder, Straßenränder, Äcker (16, 19)	1,4-1,7 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	Skarifikation (14, 18) unter Umständen Reifung erforderlich (19); Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1, 19); keine Spezialbehandlungen (5)	NACH (5)	A, E, F	
LAMIACEAE <i>Leonurus cardiaca</i> (Echtes Herzgespann)	P offene Flächen (16)	0,75-1,0 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		keine Spezialbehandlungen (4, 14)	NACH (4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (Grüne Minze)	P feuchte Gebiete (16)	2,21 (4)		0 (4)		keine Spezialbehandlungen (4)	NACH (4)	F	
<i>Nepeta cataria</i> (Echte Katzenminze)	P gestörte Flächen (16)	0,54 (4, 14)	L = D (14)	0 (4)		keine Spezialbehandlungen (2, 4, 14)	NACH (2,4)	F	

<i>Prunella vulgaris</i> (Gewöhnliche Braunelle)	P Äcker, Grasflächen, gestörte Standorte (16, 19)	0,58 -1,2 (4, 14, 19)	L= D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (18, 19) stärkere Keimung bei größeren Samen (1); keine Spezialbehandlungen (4, 14, 22)	NACH (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (Echte Betonie)	P Grasflächen, Feldränder (19)	14-18 (14, 19)	L= D (14)		7 (50 %) (19)	keine Spezialbehandlungen (5, 14, 22)	NACH (5, 22)	F	
MALVACEAE <i>Abutilon theophrasti</i> (Europäische Samtpappel)	A Felder, offene Lebensräume (16)	8,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	Skarifikation (14) keine Spezialbehandlungen (5, 10, 21)	VOR UND NACH (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> Sida spinosa	a Felder, Straßenränder (16)	3,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 21)		Skarifikation (14) Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1); keine Spezialbehandlungen (6, 21)	VOR UND NACH (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE <i>Papaver rhoeas</i> (Klatschmohn)	a Felder, Äcker, gestörte Standorte (16, 19)	0,1 -0,3 (4, 14, 19, 29)	L= D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	Stratifikation (Kälte) und Skarifikation (1, 19, 32) keine Spezialbehandlungen (4, 14, 29)	NACH (4)	A, D, E, F, G	

POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (Rotes Straußgras)	Rasen, Weiden (16)	0,07 (14)	L > D (10)	20 (10)	10 (62 %) (10)	Keimung durch Bestrahlung gehemmt (1, 17-19); keine Spezialbehandlungen (10)	NACH (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (Acker-Fuchsschwanzgras)	A Felder, offene Lebensräume (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	Skarifikation (14); Behandlung mit 101 mg/l KNO ₃ (14); Stratifikation (Wärme) (1) Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1); keine Spezialbehandlungen (34)	VOR UND NACH (28, 34)	a	32
<i>Avena fatua</i> (Flughäfer)	A Anbaugelände, offene Lebensräume (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	Skarifikation (7, 32); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1) Stratifikation (Kälte) (1, 18); keine Spezialbehandlungen (6, 10, 14)	VOR UND NACH (6, 10, 28, 31)	a	
<i>Bromus tectorum</i> (Dach-Trespe)	A Felder, Straßenränder, Äcker (16)	0,45-2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		Reifungsperiode (1, 7, 32); Keimung durch Licht gehemmt (1); keine Spezialbehandlungen (14)	VOR UND NACH (28, 31)	a	
<i>Cynosurus cristatus</i> (Kammgras)	P Felder, Straßenränder, offene Lebensräume (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (19); keine Spezialbehandlungen (14, 29)	NACH (5)	a	
<i>Digitaria sanguinalis</i> (Blutrote Fingerhirse)	A Felder, Rasen, offene Lebensräume (16)	0,52-0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) (7) 14 (94 %) (7)	Skarifikation, Stratifikation (Kälte) und Reifung (1, 7, 14, 32); Behandlung mit 101 mg/l KNO ₃ (14); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1); keine Spezialbehandlungen (21)	VOR UND NACH (18, 25, 31)	a	
<i>Echinochloa crusgalli</i> (Hühnerhirse)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		Skarifikation (7, 32); Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1); keine	VOR UND NACH (3, 21, 28, 31)	a	

						Spezialbehandlungen (3, 14, 21)			
<i>Elymus canadensis</i> (Kanada-Quecke)	P Uferzonen, gestörte Standorte (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	keine Spezialbehandlungen (2, 11)	NACH (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (Wiesenschwingel)	P Felder, feuchte Gebiete (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	keine Spezialbehandlungen (10, 19)	NACH (10)	a	7
<i>Hordeum pusillum</i> (Gerste)	A Weiden, Straßenränder, offene Lebensräume (16)	3,28 (14)				Stratifikation (Wärme) (1); Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1)	VOR (31)		7
<i>Phieum pratense</i> (Wiesenlieschgras)	P Weiden, Äcker, gestörte Standorte (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (19); Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (17); keine Spezialbehandlungen (10, 14, 17, 19)	NACH (10)	A, E	
POLYGONACEAE <i>Polygonum convolvulus</i> (Windknöterich)	A offene Lebensräume, Straßenränder (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		Stratifikation (Kälte) über 4-8 Wochen (1, 2, 4, 20, 29); Keimung durch Bestrahlung nicht gehemmt (1)	VOR UND NACH (1, 2, 20, 28, 31)	a	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (Ampfer-Knöterich)	A feuchter Boden (16)	1,8-2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (18); Stratifikation (Kälte) (1); keine Spezialbehandlungen (5)	VOR UND NACH (6)	A, E	
<i>Polygonum pennsylvanicum</i>	A Felder, offene	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		Stratifikation (Kälte) über 4 Wochen bei 0-5 °C (1, 29);	VOR (31)	A, E	

(Vogelknöterich)	Lebensräume (16)					Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1)			
<i>Polygonum periscaria</i> (Floh-Knöterich)	A gestörte Flächen, Äcker (16, 19)	2,1 -2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	<14 (13) 2 (50 %) (19)	Skarifikation, Stratifikation (Kälte), Behandlung mit GA (14); Stratifikation (Kälte), Reifung (17-19); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (19); keine Spezialbehandlungen (13)	NACH (13)	a	32
<i>Rumex crispus</i> (Krauser Ampfer)	P Äcker, Straßenränder, offene Flächen (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (18, 19); Reifung kann erforderlich sein (18); keine Spezialbehandlungen (4, 14, 33)	NACH (4, 33)	A, E	32
PRIMULACEAE <i>Anagallis arvensis</i> (Acker-Gauchheil)	A Äcker, Grasflächen, gestörte Standorte (16, 19)	0,4-0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	Stratifikation (Kälte), Behandlung mit GA (1,14, 18, 19, 32); Licht zur Keimung erforderlich (1); keine Spezialbehandlungen (2, 4)	NACH (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE <i>Ranunculus acris</i> (Scharfer Hahnenfuß)	P Äcker, Straßenränder, offene Flächen (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 -56 (19, 29)	keine Spezialbehandlungen (5, 14, 22, 24 -26)	NACH (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE <i>Geum urbanum</i> (Echte Nelkenwurz)	P Hecken, feuchte Gebiete (16, 19)	0,8-1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (18, 19); Stratifikation (Wärme) (1); keine Spezialbehandlungen (5, 14, 22, 25, 26)	NACH (5, 22, 25, 26)	a	
RUBIACEAE <i>Galium aparine</i> (Kletten- Labkraut)	a Äcker, feuchte Gebiete, gestörte Standorte (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	Stratifikation (Kälte) (1, 18, 19); Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (18, 19); Keimung durch Licht gehemmt	VOR UND NACH (6, 28)	a	32

						(1); keine Spezialbehandlungen (6, 14)			
<i>Galium mollugo</i> (Wiesen-Labkraut)	P Wallhecken, offene Flächen (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		keine Spezialbehandlungen (5, 14, 22, 24, 26, 29)	NACH (5, 22, 24, 26)	a	
SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (Roter Fingerhut)	B, P Hecken, offene Flächen (16, 19)	0,1-0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1, 17-19); keine Spezialbehandlungen (4, -26, 22)	NACH (4, 22-26)	D, G, F	
<i>Veronica persica</i> (Persischer Ehrenpreis)	A Äcker, Grasflächen, gestörte Standorte (16, 19)	0,5-0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (18, 19); Stratifikation (Kälte) (18); keine Spezialbehandlungen (14)	VOR UND NACH (28)	a	32

¹ A = einjährig, B = zweijährig, P = ausdauernd.

² Die Quellen 11, 14 und 33 beziehen sich auf das Licht (L) und die Dunkelheit (D), die zur Keimung benötigt werden. Die Quellen 3, 6, 9, 10, 13 und 20 haben die Wachstumsbedingungen in Gewächshäusern zum Gegenstand.

³ 0 mm bedeutet, dass die Samen auf die Oberfläche des Bodens gesät wurden oder dass zur Keimung Licht benötigt wird.

⁴ Die Zahlen bezeichnen die Anzahl der Tage, nach denen der genannten Quelle zufolge ein bestimmter Prozentanteil der Samen gekeimt ist (z. B. 3 Tage Keimrate 50 % (Quelle 19)).

⁵ Angaben zur Dauer der Reifung und/oder Stratifikation sind nicht immer verfügbar. Außer wenn eine Kältebehandlung erforderlich ist, werden die Temperaturbedingungen nicht angegeben, da die Temperatur bei Prüfungen in Gewächshäusern nur in eingeschränktem Umfang geregelt werden kann. Die meisten Samen keimen bei den normalen Temperaturfluktuationen in Gewächshäusern.

⁶ Die betreffende Art wurde einer Vorauflauf- (VOR) und/oder Nachauflaufprüfung auf Phytotoxizität mit Herbiziden unterzogen.

⁷ Beispiele gewerblicher Saatgutanbieter.

⁸ Zwei alternative Quellen, die ebenfalls berücksichtigt wurden.

Genannte Saatgutanbieter

Anbieter	Anbieterinformationen
A	<p><u>Herbiseed</u> New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ, ENGLAND +44 1189 349 464 www.herbiseed.com</p>
B	<p><u>Tropilab Inc.</u> 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948, USA +1 727 344 - 4050 www.tropilab.com</p>
C	<p><u>Pterophylla - Native Plants & Seeds</u> #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0, KANADA +1 519 586 – 3985</p>
D	<p><u>Applewood Seed Co.</u> 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002, USA +1 303 431 - 7333 www.applewoodseed.com</p>
E	<p><u>Ernst Conservation Seeds</u> 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335, USA +1 800 873 - 3321 www.ernstseed.com</p>
F	<p><u>Chiltern Seeds</u> Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB, ENGLAND +44 1229 581137 www.chiltemseeds.co.uk</p>
G	<p><u>Thompson & Morgan</u> P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7, KANADA</p>

	<p>+1 800 274 - 7333</p>
--	--------------------------

www.thompson-morgan.com

LITERATUR

- (1) Baskin, C.C., und Baskin, J.M. 1998. *Seeds*. Academic Press, Toronto
- (2) Blackburn, L.G., und Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). *Ecotoxicology*, 12:271-285.
- (3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., und Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 19(10):2532-2541.
- (4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. *Ecotoxicology*, 13:349-369.
- (5) Breeze, V., Thomas, G., und Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. *Annals of Applied Biology*, 121:669-677.
- (6) Brown, R.A., und Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. *In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume*. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, und M.A. Lewis, Hrsg. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. S. 197-208.
- (7) Buhler, D.D., und Hoffman, M.L., 1999. *Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants*. Weed Science Society of America, Lawrence, K.
- (8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., und Warburg, E.F. 1981. *Excursion flora of the British Isles*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge
- (9) Clay, P.A., und Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. *Weed Science*, 48:481-486.
- (10) Cole, J.F.H., und Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. *BCPC – Weeds*. S. 151-156.

- (11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)
- (12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., und McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 9:769-776.
- (13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., und Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 15(7):1189-1196.
- (14) Flynn, S., Turner, R.M., und Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgekew.org.uk/data/sid)
- (15) Franzaring, J., Kempenaar, C., und van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. *Environmental Pollution*, 114:21-28.
- (16) Gleason, H.A., und Cronquist, A. 1991. *Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada*, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY
- (17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. *Annals of Applied Biology*, 98:555-558.
- (18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., und Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology*, 69:1017-1059.
- (19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., und Hunt, R. 1988. *Comparative plant ecology: a functional approach to common British species*. Unwin Hyman Ltd., London
- (20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (*Polygonum convolvulus* L.). *Weed Research*, 34:453-459.
- (21) Klingaman, T.E., King, C.A., und Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. *Weed Science*, 40:227-232.

- (22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., und Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environmental Pollution*, 59:71-86.
- (23) Marrs, R.H., Frost, A.J., und Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. *Environmental Pollution*, 69:223-235.
- (24) Marrs, R.H., Frost, A.J., und Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. *Environmental Pollution*, 73:25-42.
- (25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., und Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. *Agriculture, Ecosystems, & Environment*, 45:283-293.
- (26) Marrs, R.H., und Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. *Journal of Environmental Management*, 50:369-388.
- (27) Marshall, E.J.P. und Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. *BCPC – Weeds*. S. 1021-1028.
- (28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., und Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. *Pest Management Science*, 58:1161-1174.
- (29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (<http://www.herbiseed.com>)
- (30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA
- (31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

- (32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.
- (33) White, A. L., und Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Persönliche Auskunft.
- (34) Zwerger, P., und Pestemer, W., 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh.*, 17:711-718.

Anlage 4

BEISPIELE FÜR GEEIGNETE WACHSTUMSBEDINGUNGEN FÜR BESTIMMTE PFLANZENARTEN

Die folgenden Bedingungen haben sich für zehn Pflanzenarten als geeignet erwiesen und können als Orientierung auch für Prüfungen bestimmter anderer Arten in Wachstumskammern dienen:

Kohlendioxid-Konzentration: 350 ± 50 ppm;

Relative Feuchte: $70 \% \pm 5 \%$ in Lichtperioden und $90 \% \pm 5 \%$ in Dunkelperioden

Temperatur: 25 ± 3 °C am Tag und 20 ± 3 °C in der Nacht;

Photoperiode: 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit; Licht mit einer Wellenlänge von durchschnittlich 400 bis 700 nm;

Licht: Leuchtdichte 350 ± 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, gemessen an der Vegetationsoberfläche.

Die Kulturpflanzenarten sind:

- Tomate (*Solanum lycopersicon*);
- Gurke (*Cucumis sativus*);
- Salat (*Lactuca sativa*);
- Sojabohne (*Glycine max*);
- Kohl (*Brassica oleracea var. capitata*);
- Möhre (*Daucus carota*);
- Hafer (*Avena sativa*);
- Deutsches Weidelgras (*Lolium perenne*);
- Mais (*Zea mays*);
- Zwiebel (*Allium cepa*).

C.32. Enchytraeen-Reproduktionstest

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 220 (2004). Sie soll eingesetzt werden, um die Wirkung von Chemikalien auf die Reproduktionsleistung von Enchytraeen (*Enchytraeus albidus*, Henle 1873) im Boden zu beurteilen. Die Prüfung beruht im Wesentlichen auf einer vom deutschen Umweltbundesamt entwickelten (1) und in einem Ringtest (2) geprüften Methode. Darüber hinaus wurden noch weitere Methoden zur Untersuchung der Toxizität von Chemikalien für Enchytraeen und Regenwürmer in Betracht gezogen (3)(4)(5)(6)(7)(8).

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

2. Bodenbewohnende Anneliden der Gattung *Enchytraeus* sind ökologisch relevante Arten für Ökotoxizitätsprüfungen. Enchytraeen kommen zwar häufig in Böden vor, in denen auch Regenwürmer leben; bei vielen Böden treten sie aber auch dann in großer Anzahl auf, wenn keine Regenwürmer vorkommen. Enchytraeen können sowohl in Labortests als auch in Halbfreiland- und in Freilandtests verwendet werden. Aus praktischer Sicht ist festzustellen, dass viele *Enchytraeus*-Arten leicht zu handhaben und zu züchten sind; außerdem ist ihre Regenerationszeit erheblich kürzer als die von Regenwürmern. Ein Reproduktionstest mit Enchytraeen dauert nur bis 6 Wochen (gegenüber 8 Wochen bei Regenwürmern (*Eisenia fetida*)).
3. Allgemeine Informationen zur Ökologie und zur Ökotoxikologie von Enchytraeen in der terrestrischen Umwelt sind den Quellen (9), (10), (11) und (12) zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

4. Adulte Enchytraeen werden verschiedenen Konzentrationen der in künstlichen Boden gemischten Prüfchemikalie ausgesetzt. Die Prüfung kann in zwei Schritte unterteilt werden: a) einen Vorversuch (falls keine hinreichenden Informationen verfügbar sind), in dem die Mortalität nach zweiwöchiger Exposition als wesentlicher Endpunkt beurteilt wird, und b) einen definitiven Reproduktionstest, bei dem die Gesamtzahl an juvenilen Tieren eines Elterntiers und das Überleben der Elterntiere bewertet werden. Der definitive Test dauert sechs Wochen. Nach den ersten drei Wochen werden die adulten Würmer herausgenommen und die morphologischen Änderungen protokolliert. Nach weiteren drei Wochen werden die juvenilen Tiere gezählt, die aus den von den adulten Tieren hergestellten Kokons geschlüpft sind. Die Reproduktionsleistung der Tiere, die der Prüfchemikalie ausgesetzt waren, wird mit der Reproduktionsleistung der Kontrollgruppe(n) verglichen, um i) die NOEC (höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete

schädliche Wirkung) und/oder (mithilfe eines Regressionsmodells) ii) mit dem EC_x-Wert (z. B. EC₁₀ oder EC₅₀) die Konzentration zu ermitteln, bei der die Reproduktionsleistung um x % reduziert wird. Die Testkonzentrationen müssen den EC_x-Bereich einschließen (z. B. EC₁₀ und EC₅₀), damit der EC_x-Wert nicht durch Extrapolation ermittelt werden muss, sondern durch Interpolation bestimmt werden kann.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

5. Die Wasserlöslichkeit, der log-K_{ow}-Wert, der Boden-Wasser-Verteilungskoeffizient (z. B. Kapitel C.18 oder C.19) und der Dampfdruck der Prüfchemikalie sollten bekannt sein. Wünschenswert sind zudem Informationen über die Persistenz der Chemikalie im Boden (z. B. die Photolyse- und die Hydrolyserate).
6. Die Prüfmethode kann sowohl für wasserlösliche als auch für nicht lösliche Chemikalien verwendet werden. Allerdings ist die Prüfchemikalie entsprechend unterschiedlich einzubringen. Für flüchtige Chemikalien ist die Prüfmethode nicht geeignet (d. h. für Chemikalien, bei denen die Henry-Konstante oder der Luft-Wasser-Verteilungskoeffizient größer als eins ist, oder für Chemikalien, bei denen der Dampfdruck bei 25 °C mehr als 0,0133 Pa beträgt).

VALIDITÄT DES TESTS

7. Damit ein Test als gültig gewertet werden kann, sollten die Kontrollen die folgenden Kriterien erfüllen:
 - Die Mortalität der adulten Tiere darf am Ende des Vorversuchs und nach den ersten drei Wochen des Reproduktionstests nicht mehr als 20 % betragen;
 - wenn bei der Vorbereitung des Tests 10 adulte Tiere pro Gefäß verwendet wurden, sollten sich am Ende des Tests durchschnittlich mindestens 25 juvenile Tiere pro Gefäß entwickelt haben;
 - der Variationskoeffizient um die durchschnittliche Anzahl an juvenilen Tieren sollte am Ende des Reproduktionstests höchstens 50 % betragen.

Wenn ein Test die genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, ist er zu beenden, sofern keine besonderen Gründe für seine Fortsetzung vorliegen. Die Begründung ist in den Prüfbericht aufzunehmen.

REFERENZCHEMIKALIE

8. Eine Referenzchemikalie ist entweder regelmäßig zu prüfen oder in jeden einzelnen Test mit einzubeziehen, um sicherzustellen, dass sich die Reaktion der Testorganismen im Laufe der Zeit nicht signifikant geändert hat. Eine geeignete Referenzchemikalie ist Carbendazim, denn es hat sich gezeigt, dass diese Chemikalie die Lebens- und Reproduktionsfähigkeit von Enchytraeen beeinträchtigt

(13)(14); außerdem können Chemikalien mit bekannten Toxizitätsdaten verwendet werden. AgrEvo Company (Frankfurt, Deutschland) bietet unter dem Handelsnamen Derosal™ eine Carbendazim-Formulierung mit einem Wirkstoffanteil von 360 g/l (32,18 %) an. Diese Formulierung wurde in einem Ringtest verwendet (2). Der im Ringtest ermittelte EC₅₀-Wert der Reproduktionsleistung lag bei 1,2 ± 0,8 mg Wirkstoff/kg Trockenmasse (2). Wenn ein positiver toxischer Standard in die Testreihe aufgenommen wird, ist eine einzige Konzentration zu verwenden, und die Anzahl der Replikate muss mit der Anzahl der Kontrollen übereinstimmen. Bei Carbendazim wird die Prüfung von 1,2 mg Wirkstoff/kg Trockenmasse (getestet in einer flüssigen Formulierung) empfohlen.

BESCHREIBUNG DES TESTS

Ausrüstung

9. Die Prüfgefäße müssen aus Glas oder einem sonstigen chemisch inertem Material bestehen. Geeignet sind Glasgefäße (z. B. mit einem Volumen von 0,20 bis 0,25 l und einem Durchmesser von ≈ 6 cm). Die Gefäße müssen transparente Deckel haben (z. B. aus Glas oder Polyethylen), die so ausgeführt sind, dass sie die Wasserverdampfung reduzieren und gleichzeitig den Gasaustausch zwischen dem Bodensubstrat und der Atmosphäre erlauben. Die Deckel müssen transparent sein, damit die erforderliche Lichtdurchlässigkeit gegeben ist.
10. Es wird eine übliche Laborausrüstung insbesondere mit folgenden Bestandteilen benötigt:
 - Trockenschrank;
 - Stereomikroskop;
 - pH-Messgerät und Photometer;
 - Waagen mit geeigneter Genauigkeit;
 - geeignete Vorrichtungen zur Temperaturregelung;
 - geeignete Ausrüstung zur Feuchtigkeitsregelung (bei Expositionsgefäßen mit Deckel nicht wesentlich);
 - Inkubator oder kleiner Raum mit Klimaanlage;
 - Pinzette, Haken oder Schlaufen;
 - Fotobecken.

Herstellung des künstlichen Bodens

11. In diesem Test wird künstlicher Boden (5)(7) mit folgender Zusammensetzung verwendet (bezogen auf Trockenmassen, bei 105 °C bis zur Massekonstanz getrocknet):
 - 10 % Sphagnum-Torf, luftgetrocknet und fein gemahlen (eine Partikelgröße von 2 ± 1 mm ist annehmbar); vor der Verwendung in einem Test sollte sichergestellt werden,

dass mit einer frischen Torf-Charge hergestellter Boden für die Zucht der Würmer geeignet ist;

- 20 % Kaolin-Ton (Kaolinit-Anteil vorzugsweise über 30 %);
- ca. 0,3 bis 1,0 % Calciumcarbonat (CaCO_3 , pulverisiert, Analysequalität), um einen pH-Wert von $6,0 \pm 0,5$ zu erzielen; wie viel Calciumcarbonat hinzuzugeben ist, kann vor allem von der Qualität/Beschaffenheit des Torfs abhängen;
- ca. 70 % luftgetrockneter Quarzsand (je nach erforderlichem CaCO_3 -Anteil), hauptsächlich Feinsand mit mehr als 50 % Partikeln mit einer Größe von 50 bis 200 μm .

Vor der Verwendung eines künstlichen Bodens in einem definitiven Test ist seine Eignung für die Zucht von Würmern und zur Erfüllung der Validitätskriterien des Tests nachzuweisen. Die entsprechende Prüfung wird insbesondere empfohlen, um sicherzustellen, dass die Aussagekraft des Tests bei reduziertem Kohlenstoffgehalt des künstlichen Bodens, z. B. durch Verringerung des Torfanteils auf 4-5 % und entsprechende Erhöhung des Sandanteils, nicht beeinträchtigt wird. Durch eine solche Reduzierung des Gehalts an organischem Kohlenstoff kann die Bindung der Prüfchemikalie an den Boden (d. h. an organischen Kohlenstoff) verringert werden und die Verfügbarkeit der Prüfchemikalie für die Würmer zunehmen. Es wurde nachgewiesen, dass *Enchytraeus albidus* den Validitätskriterien hinsichtlich der Vermehrung bei Versuchen mit Feldeböden mit geringerem Gehalt an organischem Kohlenstoff als oben angegeben (z. B. 2,7 % (15)) genügen, und es gibt (wenngleich in begrenztem Umfang) Hinweise darauf, dass diese Ergebnisse auch mit künstlichem Boden mit 5%igem Torfanteil erzielt werden können.

Hinweis: Wenn in weiteren (z. B. höherstufigen) Tests natürlicher Boden verwendet wird, sind auch die Eignung dieses Bodens und die Erfüllung der Validitätskriterien des Tests nachzuweisen.

12. Die trockenen Bestandteile des Bodens werden gründlich gemischt (z. B. in einem großen Labormischer). Der Mischvorgang wird mindestens eine Woche vor Prüfbeginn durchgeführt. Der gemischte Boden muss zwei Tage ruhen, damit sich der Säurepegel ausgleichen/stabilisieren kann. Zur Bestimmung des pH-Werts wird eine Bodenmischung mit 1 M Kaliumchloridlösung (KCl) oder 0,01 M Calciumchloridlösung (CaCl_2) im Verhältnis 1:5 verwendet (siehe (16) und Anlage 3). Wenn der Säuregrad des Bodens außerhalb des spezifizierten Bereichs liegt (siehe Nummer 11), kann der pH-Wert durch Zugabe einer geeigneten Menge CaCO_3 eingestellt werden. Ist der Boden zu alkalisch, kann der pH-Wert durch Zugabe eines größeren Anteils des Gemischs (siehe Nummer 11) ohne CaCO_3 eingestellt werden.
13. Die maximale Wasserhaltekapazität des künstlichen Bodens wird mit den in Anlage 2 beschriebenen Verfahren ermittelt. Ein oder zwei Tage vor Beginn des Tests wird der trockene künstliche Boden mit so viel entionisiertem Wasser befeuchtet, dass etwa die Hälfte des endgültigen Wassergehalt erreicht wird (40-60 % der maximalen Wasserhaltekapazität). Zu Beginn des Tests wird der

befeuchtete Boden entsprechend der Anzahl der im Test zu verwendenden Testkonzentrationen (sowie gegebenenfalls der Referenzchemikalie) und Kontrollen aufgeteilt. Der Feuchtegehalt wird auf 40-60 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt, indem die Lösung mit der Prüfchemikalie und/oder destilliertes oder entionisiertes Wasser hinzugegeben wird (siehe Nummern 19, 20 und 21). Der Feuchtegehalt wird zu Beginn und am Ende des Tests ermittelt (durch Trocknen bei 105 °C bis zur Massekonstanz) und sollte im optimalen Bereich für die Lebensfähigkeit der Würmer liegen. Für eine grobe Prüfung des Feuchtegehalts des Bodens kann der Boden vorsichtig in der Hand gedrückt werden; bei richtigem Feuchtegehalt sollten Wassertröpfchen zwischen den Fingern austreten.

Auswahl und Vorbereitung der Versuchstiere

14. Die empfohlene Art für den Test ist *Enchytraeus albidus* (Henle 1837, weißer Topfwurm), ein Mitglied der Familie *Enchytraeidae* (Ordnung *Oligochaeta*, Stamm *Annelida*). *E. albidus* ist eine der größten Enchytraeen-Arten; bei einzelnen Exemplaren wurde eine Länge von bis zu 35 mm gemessen (17)(18). *E. albidus* ist weltweit in marinen, limnischen und terrestrischen Habitaten zu finden, hauptsächlich in faulem organischem Material (Seetang, Kompost), seltener auch in Wiesen (9). Die breite ökologische Toleranz und gewisse morphologische Variationen deuten darauf hin, dass es unterschiedliche Rassen geben könnte.
15. *E. albidus* wird im Handel als Fischfutter angeboten. Es ist zu prüfen, ob die Kultur durch andere, normalerweise kleinere Arten kontaminiert ist (1) (19). Ist dies der Fall, sind alle Würmer in einer Petrischale mit Wasser zu waschen. Mithilfe eines Stereomikroskops werden große adulte Exemplare von *E. albidus* für eine neue Kultur aussortiert, und alle anderen Würmer sind zu verwerfen. *E. albidus* lässt sich leicht in einer Vielzahl organischer Materialien züchten (siehe Anlage 4). Der Lebenszyklus von *E. albidus* ist kurz, da die Tiere ihre Geschlechtsreife zwischen dem 33. Lebenstag (bei 18 °C) und dem 74. Lebenstag (bei 12 °C) erreichen. Für die Prüfung sollten ausschließlich Wurmulturen verwendet werden, die mindestens fünf Wochen lang (eine Generation) ohne Probleme im Labor gehalten wurden.
16. Andere *Enchytraeus*-Arten kommen ebenfalls in Betracht; z. B. *E. buchholzi* (Vejdovsky 1879) oder *E. crypticus* (Westheide und Graefe 1992) (siehe Anlage 5). Werden andere *Enchytraeus*-Arten verwendet, so sind diese eindeutig zu identifizieren, und die Wahl der Art ist zu begründen.
17. Für die Tests sind adulte Tiere zu verwenden. In der Clitellum-Region sollten Eier (weiße Flecken) erkennbar sein, und die Tiere müssen alle etwa gleich groß sein (ca. 1 cm lang). Die Zuchtkultur braucht nicht synchronisiert zu werden.
18. Wenn die Enchytraeen nicht in demselben Bodentyp und unter denselben Bedingungen (einschließlich Fütterung) gezogen werden wie im endgültigen Test nicht vermehren, muss eine Akklimatisierung erfolgen (mindestens 24 Stunden bis drei Tage). Zunächst sollten mehr adulte Tiere als zur Durchführung des Tests benötigt akklimatisiert werden, damit beschädigte oder anderweitig ungeeignete

Exemplare verworfen werden können. Am Ende des Akklimatisierungszeitraums werden für den Test ausschließlich Würmer ausgewählt, die Eier enthalten und keine Verhaltensauffälligkeiten zeigen (z. B. Versuche, den Boden zu verlassen). Die Würmer werden mit einer Juwelierpinzette, mit Haken oder Schlaufen vorsichtig herausgenommen und in eine Petrischale mit einer kleinen Menge Süßwasser gesetzt. Für diesen Zweck ist rekonstituiertes Süßwasser zu empfehlen, wie in Kapitel C.20 (*Daphnia Magna*, Reproduktionstest) beschrieben, da entionisiertes oder entmineralisiertes Wasser oder Leitungswasser für die Würmer schädlich sein könnte. Die Würmer werden unter einem Stereomikroskop untersucht, und Würmer ohne Eier werden verworfen. Es ist sorgfältig darauf zu achten, dass auch Milben und Springschwänze entfernt und verworfen werden, die in die Kulturen geraten sein könnten. Für den Test nicht benötigte gesunde Würmer werden in die Stammkultur zurückgegeben.

Herstellung der Testkonzentrationen

Wasserlösliche Prüfchemikalie

19. Eine Lösung der Prüfchemikalie wird in entionisiertem Wasser in ausreichender Menge für alle Replikate einer Testkonzentration hergestellt. Vorzugsweise sollte eine angemessene Menge Wasser verwendet werden, um den erforderlichen Feuchtegehalt (d. h. 40 bis 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität (siehe Nummer 13)) zu erzielen. Jede Lösung mit der Prüfchemikalie wird gründlich mit einer Charge des angefeuchteten Bodens gemischt und dann in das Prüfgefäß gegeben.

Wasserunlösliche Prüfchemikalien

20. Chemikalien, die in Wasser unlöslich, aber in organischen Lösungsmitteln löslich sind, können in der kleinstmöglichen Menge eines geeigneten Trägerstoffs (z. B. Aceton) gelöst werden. Hierzu sind ausschließlich flüchtige Lösungsmittel zu verwenden. Der Trägerstoff wird auf eine kleine Menge (z. B. 2,5 g) Quarzsand gesprüht oder mit dem Sand vermischt. Anschließend wird der Trägerstoff mindestens eine Stunde unter einem Abzug gestellt, damit das Lösungsmittel verdunsten kann. Diese Mischung aus Quarzsand und Prüfchemikalie wird zum angefeuchteten Boden hinzugegeben und nach Hinzugabe von entionisiertem Wasser in ausreichender Menge gründlich gemischt, um den erforderlichen Feuchtegehalt zu erzielen. Die endgültige Mischung wird in die Prüfgefäße gegeben.
21. Bei Chemikalien, die sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln schlecht löslich sind, wird das Äquivalent von 2,5 g fein gemahlenem Quarzsand pro Prüfgefäß mit der Menge der Prüfchemikalie vermischt, die erforderlich ist, um die gewünschte Testkonzentration zu erhalten. Diese Mischung aus Quarzsand und Prüfchemikalie wird zum angefeuchteten Boden hinzugegeben und nach Hinzugabe von entionisiertem Wasser in ausreichender Menge gründlich vermischt, um den erforderlichen Feuchtegehalt zu erzielen. Die endgültige Mischung wird auf die

Prüfgefäße verteilt. Dieses Verfahren wird für alle Testkonzentrationen wiederholt, und es wird eine geeignete Kontrolle hergestellt.

22. Die Chemikalien werden im Allgemeinen höchstens bis zu einer Konzentration von 1000 mg/kg Boden (Trockenmasse) geprüft. Je nach Zielsetzung eines bestimmten Tests können Prüfungen allerdings auch mit höheren Konzentrationen vorgenommen werden.

DURCHFÜHRUNG DER TESTS

Test- und Kontrollgruppen

23. Für jede Testkonzentration werden 20 g (Trockenmasse) Testboden in das Prüfgefäß gegeben (siehe Nummern 19, 20 und 21). Außerdem werden Kontrollen ohne die Prüfchemikalie hergestellt. In alle Prüfgefäße wird Futter gegeben, wie unter Nummer 29 beschrieben. In jedes Prüfgefäß werden zehn zufällig ausgewählte Würmer gesetzt. Die Würmer werden vorsichtig in die einzelnen Prüfgefäße gegeben und auf dem Boden abgesetzt (z. B. mit einer Juwelierpinzette, mit Haken oder mit Schlaufen. Die Anzahl der Replikate der Testkonzentrationen und der Kontrollen hängt vom jeweiligen Prüfprotokoll ab (siehe Nummer 34). Die Prüfgefäße werden nach dem Zufallsprinzip in den Testinkubator gestellt, und die Positionen werden wöchentlich neu randomisiert.
24. Wenn zur Applikation der Prüfchemikalie ein Trägerstoff verwendet wird, ist zusätzlich zu den Testreihen eine Kontrollreihe mit Quarzsand mit aufgesprühtem oder untergemischtem Lösungsmittel zu prüfen. Die Konzentration des Lösungsmittels oder des Dispergiermittels muss mit der Konzentration übereinstimmen, die auch in den Prüfgefäßen mit der Prüfchemikalie verwendet wird. Bei Chemikalien, die gemäß den unter Nummer 21 beschriebenen Verfahren zu applizieren sind, muss eine Kontrollreihe mit zusätzlichem Quarzsand (2,5 g pro Gefäß) geprüft werden.

Prüfbedingungen

25. Die Testtemperatur beträgt 20 ± 2 °C. Damit die Würmer den Boden nicht verlassen, wird die Prüfung bei einem geregelten Licht-Dunkel-Zyklus (vorzugsweise 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit) mit einer Lichtstärke von 400 bis 800 lx im Bereich der Prüfgefäße durchgeführt.
26. Um die Feuchte des Bodens zu ermitteln, werden die Gefäße zu Beginn des Tests und danach jeweils einmal pro Woche gewogen. Gewichtsverluste werden durch Zugabe von entionisiertem Wasser in ausreichender Menge aufgefüllt. Wasserverluste können durch Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit (> 80 %) im Testinkubator reduziert werden.
27. Der Feuchtegehalt und der pH-Wert sind jeweils zu Beginn und am Ende sowohl des Vorversuchs als auch des definitiven Tests zu messen. Die Messungen sind an

allen Kontrollen und an allen mit der Prüfchemikalie (in allen Konzentrationen) behandelten Bodenproben vorzunehmen, die zwar in der gleichen Weise wie die Testkulturen hergestellt und gehandhabt werden, aber keine Würmer enthalten. Zu diesen Bodenproben ist nur zu Beginn des Tests Futter hinzuzugeben, um die Aktivität der vorhandenen Mikroorganismen anzuregen. Es sollte die gleiche Menge Futter hinzugegeben werden, wie zu den Testkulturen. Während des Tests braucht in diese Gefäße allerdings kein weiteres Futter mehr gegeben zu werden.

Fütterung

28. Es wird Futter verwendet, das die Lebensfähigkeit der Enchytraeen-Population gewährleistet. Haferflocken, vorzugsweise vor der Verwendung autoklaviert, um Verunreinigungen durch Mikroorganismen zu verhindern (auch Erwärmung ist möglich), haben sich als geeignetes Futter erwiesen.
29. Bei der ersten Fütterung werden 50 mg gemahlene Haferflocken mit dem Boden in jedem Gefäß vermischt, bevor die Würmer eingesetzt werden. Anschließend wird bis zum 21. Tag Futter einmal wöchentlich hinzugegeben. An Tag 28 wird nicht gefüttert, da die adulten Tiere in diesem Stadium bereits herausgenommen wurden und die juvenilen Würmer ab diesem Zeitpunkt verhältnismäßig wenig zusätzliches Futter brauchen. Die Fütterung während des Tests besteht aus 25 mg gemahlener Haferflocken pro Gefäß, die vorsichtig auf die Bodenoberfläche gelegt werden, damit die Würmer nicht verletzt werden. Um Schimmelpilzbefall zu verhindern, sind die Haferflocken mit Boden zu bedecken. Wenn das Futter nicht aufgezehrt wird, sollte die Futtermenge verringert werden.

Protokoll des Vorversuchs

30. Wenn erforderlich, wird ein Vorversuch beispielsweise mit fünf Konzentrationen der Prüfchemikalie (0,1, 1,0, 10, 100 und 1000 mg/kg (Boden Trockenmasse)) vorgenommen. Ein Replikat für jede Behandlung und jede Kontrolle ist ausreichend.
31. Der Vorversuch dauert zwei Wochen. Am Ende des Versuchs wird die Mortalität der Würmer ermittelt. Ein Wurm wird dann als tot erfasst, wenn er am vorderen Ende nicht mehr auf mechanische Reize reagiert. Über die Mortalität hinaus können auch weitere Informationen hilfreich sein, um die im definitiven Test zu verwendenden Konzentrationen festzulegen. Änderungen im Verhalten der adulten Würmer (die Würmer können sich nicht mehr in den Boden eingraben, sie liegen reglos an der Glaswand des Prüfgefäßes usw.) sowie morphologische Änderungen (z. B. offene Wunden) sind daher ebenso zu protokollieren wie das Vorhandensein juveniler Würmer. Letzteres kann mit der in Anlage 6 beschriebenen Färbemethode ermittelt werden.
32. Der ungefähre LC_{50} -Wert kann bestimmt werden, indem der geometrische Mittelwert der Mortalitätsdaten berechnet wird. Bei der Festlegung des Konzentrationsbereichs für den definitiven Test wird davon ausgegangen, dass die

Wirkungen auf die Reproduktionsleistungen maximal um den Faktor 10 geringer sind als der LC_{50} -Wert. Dies ist jedoch eine empirische Beziehung; jeder Einzelfall kann anderes aussehen. Weitere Beobachtungen im Vorversuch (z. B. das Vorkommen juveniler Tiere) können helfen, den Konzentrationsbereich der Prüfchemikalie für den definitiven Test noch genauer einzugrenzen.

33. Um den LC_{50} -Wert genau zu bestimmen, wird empfohlen, den Test mit mindestens vier Replikaten für jede Konzentration der Prüfchemikalie und mit einer geeigneten Anzahl Konzentrationen zu wiederholen, damit sich mindestens vier statistisch signifikante mittlere Reaktionen für die jeweiligen Konzentrationen ergeben. Eine ähnliche Anzahl an Konzentrationen und Replikaten ist gegebenenfalls auch für die Kontrollen zu verwenden.

Protokoll des definitiven Reproduktionstests

34. Entsprechend den Empfehlungen aufgrund eines Ringtests werden drei Protokolle vorgeschlagen (2):

- Zur Bestimmung der NOEC sind mindestens fünf Konzentrationen in einer geometrischen Reihe zu prüfen. Zu empfehlen sind vier Replikate je Testkonzentration und acht Kontrollen. Die Konzentrationen dürfen sich maximal um den Faktor 1,8 unterscheiden.
- Zur Ermittlung des EC_x -Werts (z. B. EC_{10} oder EC_{50}) müssen mindestens fünf Konzentrationen geprüft werden; diese Konzentrationen müssen den EC_x einschließen, damit der EC_x interpoliert werden kann und nicht extrapoliert werden muss. Mindestens vier Replikate je Testkonzentration und vier Kontrollreplikate werden empfohlen. Der Abstandsfaktor kann unterschiedlich sein (d. h. im erwarteten Wirkungsbereich maximal 1,8 und bei den höheren und niedrigeren Konzentrationen mehr als 1,8).
- Ein kombinierter Ansatz ermöglicht die Bestimmung sowohl der NOEC als auch des EC_x -Werts. Es sind acht Behandlungskonzentrationen in einer geometrischen Reihe zu verwenden. Zu empfehlen sind vier Replikate je Behandlung und acht Kontrollen. Die Konzentrationen dürfen sich maximal um den Faktor 1,8 unterscheiden.

35. Pro Prüfgefäß sind zehn adulte Würmer zu verwenden (siehe Nummer 23). Zu Beginn des Tests und danach einmal wöchentlich bis zum 21. Tag einschließlich wird Futter in die Prüfgefäße gegeben (siehe Nummer 29). An Tag 21 werden die Bodenproben sorgfältig manuell abgesucht, und die lebenden adulten Würmer werden erfasst und gezählt; Verhaltensänderungen (die Würmer graben sich nicht mehr in den Boden; sie liegen reglos an der Glaswand des Prüfgefäßes usw.) und morphologische Veränderungen (z. B. offene Wunden) werden protokolliert. Anschließend werden alle adulten Würmer aus den Prüfgefäßen und aus dem Boden herausgenommen. Der Testboden mit etwa gebildeten Kokons wird nochmals drei Wochen unter den genannten Prüfbedingungen inkubiert, wobei allerdings nur noch einmal an Tag 35 gefüttert wird (25 mg gemahlene Haferflocken pro Gefäß).

36. Nach sechs Wochen werden die neu geschlüpften Würmer gezählt. Hierzu wird die auf der Färbung mit Bengalrot beruhende Methode (siehe Anlage 6) empfohlen,

wenngleich sich auch andere Verfahren zur Entnahme und Flotation unter Zufuhr von Flüssigkeit (und nicht von Wärme) als geeignet erwiesen haben (4)(10)(11)(20). Die Einfärbung mit Bengalrot wird empfohlen, weil die Nassextraktion aus einem Bodensubstrat durch Trübungen aufgrund suspendierter Tonpartikel erschwert sein könnte.

Limit-Test

37. Wenn im Vorversuch auch bei der höchsten Konzentration (d. h. bei 1000 mg/kg) keine Wirkungen festzustellen sind, kann der Reproduktionstest als Limit-Test durchgeführt werden, bei dem mit einer Konzentration von 1000 mg/kg nachgewiesen wird, dass die NOEC im Hinblick auf die Reproduktionsleistung noch über diesem Wert liegt.

Zusammenfassung und Zeitplan des Tests

38. Im Einzelnen umfasst der Test folgende Schritte:

Zeitpunkt	Vorversuch	Definitiver Test
Tag -7 oder früher	- Herstellen des künstlichen Bodens (Mischen trockener Bestandteile)	- Herstellen des künstlichen Bodens (Mischen trockener Bestandteile)
Tag -5	- Prüfung des pH-Werts des künstlichen Bodens - Messung der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens	- Prüfung des pH-Werts des künstlichen Bodens - Messung der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens
Tag -5 bis -3	- Sortieren der Würmer zur Akklimatisierung	- Sortieren der Würmer zur Akklimatisierung
Tag - 3 bis 0	- Akklimatisieren der Würmer über mindestens 24 Stunden	- Akklimatisieren der Würmer über mindestens 24 Stunden
Tag -1	- Befeuchten des künstlichen Bodens und Aufteilung in Chargen	- Befeuchten des künstlichen Bodens und Aufteilung in Chargen
Tag 0	- Herstellen der Stammlösungen - Applikation der Prüfchemikalie - Einwiegen des Prüfsubstrats in die Prüfgefäße - Einmischen des Futters - Einsetzen der Würmer - Messung pH-Werts und des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens	- Herstellen der Stammlösungen - Applikation der Prüfchemikalie - Einwiegen des Prüfsubstrats in die Prüfgefäße - Einmischen des Futters - Einsetzen der Würmer - Messung des pH-Werts und des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens
Tag 7	- Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens	- Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens - Füttern
Tag 14	- Bestimmen der Mortalität der adulten Tiere	- Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens

	- Schätzung der Anzahl der juvenilen Tiere - Messung des pH-Werts und des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens	- Füttern
Tag 21		- Beobachten des Verhaltens der adulten Tiere - Entnahme der adulten Tieren - Bestimmung der Mortalität der adulten Tiere - Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens - Füttern
Tag 28		- Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens - Keine Fütterung
Tag 35		- Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens - Füttern
Tag 42		- Zählen der juvenilen Würmer - Messung des pH-Werts und des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

39. Anlage 7 enthält zwar eine Übersicht, doch bei dieser Prüfmethode ist keine statistische Vorgehensweise für die Analyse der Prüfergebnisse vorgeschrieben.
40. Der wesentliche Endpunkt des Vorversuchs ist die Mortalität. Änderungen im Verhalten der adulten Würmer (die Würmer können sich nicht mehr in den Boden eingraben, sie liegen reglos an der Glaswand des Prüfgefäßes usw.) sowie morphologische Änderungen (z. B. offene Wunden) sind jedoch ebenso zu protokollieren wie das Vorhandensein juveniler Würmer. Der LC_{50} -Wert wird normalerweise mit Probit-Analysen (21) oder durch logistische Regressionsanalysen bestimmt. Wenn diese Analysemethode jedoch ungeeignet ist (z. B. weil weniger als drei Konzentrationen verfügbar sind, bei denen ein Teil der Tiere gestorben ist), können auch alternative Methoden verwendet werden. In Betracht kommen etwa gleitende Durchschnitte (22), die Trimmed-Spearman-Kärber-Methode (23) oder eine einfache Interpolation (z. B. geometrischer Mittelwert von LC_0 und LC_{100} , berechnet als Quadratwurzel von LC_0 multipliziert mit LC_{100}).
41. Endpunkt beim definitiven Test ist die Vermehrungsrate (d. h. die Anzahl der entstandenen juvenilen Tiere). Ebenso wie im Vorversuch sind jedoch im Abschlussbericht auch alle Anzeichen für sonstige schädliche Wirkungen zu erfassen. Für die statistische Analyse müssen für jede Textkonzentration und jede Kontrolle im Reproduktionstest das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet werden.

42. Wenn eine Varianzanalyse vorgenommen wurde, können die Standardabweichung, s , und die Freiheitsgrade, df , durch die nach der ANOVA geschätzte gepoolte Varianz bzw. durch die entsprechenden Freiheitsgrade ersetzt werden (wenn die Varianz nicht von der Konzentration abhängig ist). In diesem Fall sind die einzelnen Varianzen der Kontrollen und der Gefäße mit den Testkonzentrationen zu verwenden. In der Regel werden die betreffenden Werte mit kommerzieller Statistik-Software berechnet, wobei die Ergebnisse der einzelnen Gefäße als Replikate angenommen werden. Wenn die Zusammenfassung von Daten der negativen Kontrollen und der Lösungsmittelkontrollen sinnvoller erscheint als die Prüfung mit einer einzelnen Kontrolle, werden die Kontrollen getestet, um sicherzustellen, dass sich die Ergebnisse nicht signifikant unterscheiden (entsprechende Tests siehe Nummer 45 und Anlage 7).
43. Ob weitere statistische Tests vorzunehmen und statistische Rückschlüsse zu ziehen sind, hängt davon ab, ob bei den Replikaten eine Normalverteilung und eine homogene Varianz der Werte gegeben ist.

Schätzung der NOEC

44. Vorzugsweise sollten leistungsfähige Tests durchgeführt werden. Dabei könnten Informationen (z. B. frühere Erfahrungen mit Ringtests oder sonstige historische Daten) herangezogen werden, um zu beurteilen, ob die Daten in etwa normal verteilt sind. Entscheidender ist die Varianzhomogenität (Homoskedastizität). Erfahrungsgemäß steigt die Varianz häufig mit zunehmendem Mittelwert. In diesem Fall könnte eine Datentransformation eine Homoskedastizität zur Folge haben. Eine entsprechende Transformation sollte aber eher auf Erfahrungen mit historischen Daten als auf den Daten der aktuellen Untersuchung beruhen. Bei homogenen Daten sind multiple t-Tests (z. B. ein Williams-Test ($\alpha = 0,05$, einseitig) (24)(25) oder in bestimmten Fällen auch ein Dunnett-Test (26)(27)) durchzuführen. Bei uneinheitlichen Replikaten müssen die t-Werte in der Tabelle korrigiert werden, wie von Dunnett und Williams empfohlen. Bei einer starken Variation steigen/sinken die Ergebnisse nicht regelmäßig. Bei derart starken Monotonieabweichungen ist der Dunnett-Test besser geeignet. Bei Abweichungen von der Homoskedastizität kann es angebracht sein, mögliche Wirkungen in Bezug auf Varianzen näher zu untersuchen, um dann zu entscheiden, ob die t-Tests durchgeführt werden können, ohne zu viel an Aussagekraft einzubüßen (28). Alternativ kann ein multipler U-Test (z. B. der Bonferroni-U-Test nach Holm (29)) oder – wenn bei diesen Daten zwar eine Homoskedastizität festzustellen ist, die Daten ansonsten aber mit der zugrunde liegenden monotonen Dosis-Wirkungs-Kurve übereinstimmen – ein weiterer nicht parametrischer Test (z. B. Jonckheere-Terpstra (30)(31) oder Shirley) (32)(33) vorgenommen werden; dies wäre im Allgemeinen sinnvoller als t-Tests für ungleiche Varianzen (siehe auch Flussdiagramm in Anlage 7).
45. Wenn ein Limit-Test durchgeführt wurde und die Voraussetzungen für parametrische Prüfverfahren (Normalität, Homogenität) erfüllt sind, kann der paarige Student-t-Test verwendet werden; ansonsten ist der -U-Test nach Mann und Whitney durchzuführen (29).

Schätzung von EC_x

46. Zur Berechnung eines EC_x-Werts wird eine Regressionsanalyse (linear oder nicht linear) mit den Mittelwerten aus der Vorbehandlung vorgenommen, nachdem eine geeignete Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt wurde. Für das Wachstum der Würmer als kontinuierliche Reaktion können EC_x-Werte aufgrund einer geeigneten Regressionsanalyse geschätzt werden (35). Geeignete Funktionen für quantale Daten (Mortalität/Überleben und Anzahl der Nachkommen) sind die normale sigmoide Funktion, die Logit- oder die Weibull-Funktion mit zwei bis vier Parametern, die teilweise auch hormetische Effekte abbilden können. Wenn eine Dosis-Wirkungs-Funktion mithilfe einer linearen Regressionsanalyse angepasst wurde, müssten in der Regressionsanalyse ein signifikanter r²-Wert (Bestimmungskoeffizient) und/oder eine Steigung festzustellen sein; anschließend wird der EC_x-Wert abgeschätzt, indem in die nach der Regressionsanalyse erstellte Gleichung ein Wert entsprechend x % des Mittelwerts der Kontrollgruppe eingesetzt wird. 95%-Konfidenzintervalle werden nach Fieller (zitiert in Finney (21)) oder mit sonstigen modernen geeigneten Methoden berechnet.
47. Alternativ wird die Reaktion als Anteil oder Prozentanteil eines Modellparameters nachgebildet, der dann als mittlere Reaktion der Kontrollgruppe angenommen wird. In diesen Fällen kann die normale (Logit, Weibull) sigmoide Kurve häufig leicht durch eine Probit-Regression an die Ergebnisse angepasst werden (21). In diesen Fällen ist die Gewichtungsfunktion entsprechend den metrischen Antworten anzupassen, wie bei Christensen (36) beschrieben. Wenn allerdings eine Hormesis festgestellt wurde, ist die Probit-Analyse durch eine 4-Parameter-Funktion (Logit oder Weibull) zu ersetzen, die mit einem nicht linearen Regressionsverfahren angepasst wird (36). Kann keine geeignete Dosis-Wirkungs-Funktion an die Daten angepasst werden, können alternative Methoden zur Abschätzung von EC_x und der entsprechenden Konfidenzintervalle verwendet werden (beispielsweise gleitende Durchschnitte nach Thompson (22) und das Trimmed-Spearman-Kärber-Verfahren (23)).

PRÜFBERICHT

48. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfchemikalie:

- physikalische Beschaffenheit und – wenn relevant – physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. Wasserlöslichkeit oder Dampfdruck);
- chemische Bezeichnung der Prüfchemikalie nach der IUPAC-Nomenklatur, CAS-Nummer, Charge, Los, Strukturformel und Reinheit;
- Verfallsdatum der Probe;

Im Test verwendete Art:

- eingesetzte Testtiere: Art, wissenschaftlicher Name, Bezugsquelle der Testorganismen

und Zuchtbedingungen.

Prüfbedingungen:

- Bestandteile und Herstellung des künstlichen Bodens;
- Methode der Applikation der Prüfchemikalie;
- Beschreibung der Prüfbedingungen (Temperatur, Feuchtegehalt, pH-Wert usw.);
- vollständige Beschreibung des Prüfprotokolls und der Verfahren.

Prüfergebnisse:

- Mortalität adulter Würmer nach zwei Wochen und Anzahl der juvenilen Tiere am Ende des Vorversuchs;
- Mortalität adulter Würmer nach dreiwöchiger Exposition und vollständige Anzahl der juvenilen Tiere am Ende des definitiven Tests;
- alle beobachteten physischen oder pathologischen Symptome und Verhaltensänderungen der Testorganismen;
- der LC_{50} -Wert, die NOEC und/oder der EC_x -Wert (z. B. EC_{50} oder EC_{10}) für die Reproduktionsleistung, gegebenenfalls mit Konfidenzintervallen, und eine Grafik des angepassten Modells der Berechnung sowie sämtliche Informationen und Feststellungen, die für die Interpretation der Ergebnisse hilfreich sein können;

Abweichungen von den für diese Prüfmethode beschriebenen Verfahren und außergewöhnliche Vorkommnisse während der Prüfung.

LITERATUR

- (1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. Abschlussbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.
- (2) Römbke, J., und Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 S.
- (3) Westheide, W., und Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Hrsg. Esser, G., und Overdieck, D., S. 497-508. Elsevier, Amsterdam.
- (4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R., und Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 S.
- (5) Kapitel C.8: Toxizität bei Regenwürmern.
- (6) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1993). Bodenbeschaffenheit - Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*) - Teil 1: Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität unter Verwendung von künstlichem Bodensubstrat, Nr. 11268-1. ISO, Genf.
- (7) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1996). Bodenbeschaffenheit - Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer – Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*, Nr. 11268-2. ISO, Genf.
- (8) Rundgren, S., und A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H., und C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.
- (9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23, 217-232.
- (10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

- (11) Dunger, W., und Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- (12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37, 2-29.
- (13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen – Prüfungskategorien der Forschung. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.
- (14) Römbke, J., und Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.
- (15) Römbke, J., Riepert, F. und Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. *In: Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. und Eisentraeger, A. (Hrsg.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (16) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1994). Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des pH-Wertes, Nr. 10390. ISO, Genf.
- (17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. *Ann. Mus. Novitat.* 1902, 1-13.
- (18) Nielsen, C.O. und Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. *Natura Jutlandica* 8-9, 1-160.
- (19) Bouguenec, V., und Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. *Remarques sur le genre Enchytraeus*. *Ann. Limnol.* 23, 9-22.
- (20) Korinkova, J., und Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, *Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke* 32, 300-305.
- (21) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.), S. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (22) Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. - Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (23) Hamilton, M.A., Russo R.C. und Thurston R.V. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction *Environ. Sci. Technol.* 12(1978), 417.

- (24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- (25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.
- (26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- (28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355-361
- (29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, *Biometrika* 41, 133-145.
- (31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, *Applied Statistics* 28, 144-151.
- (33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, *Biometrics* 42, 183-186.
- (34) Sokal, R.R., and F.J. Rohlf. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research.* 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- (35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (36) Van Ewijk, P.H., and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Für diese Prüfmethode gelten folgende Begriffsbestimmungen:

Chemikalie: ein Stoff oder eine Mischung.

EC_x (Konzentration mit einer Wirkung von x %): Konzentration, bei der es innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle zu einer Wirkung von x % auf die Testorganismen kommt; bei diesem Test werden die Wirkungskonzentrationen als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens ausgedrückt.

LC₀ (Konzentration ohne letale Wirkung): die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der Testorganismen innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer nicht getötet werden; bei diesem Test wird LC₀ als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens ausgedrückt.

LC₅₀ (mediane letale Konzentration): die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer 50 % der Testorganismen getötet werden; bei diesem Test wird LC₅₀ als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens ausgedrückt.

LC₁₀₀ (absolut tödliche Konzentration): die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer 100 % der Testorganismen getötet werden; bei diesem Test wird LC₁₀₀ als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens ausgedrückt.

LOEC (niedrigste Konzentration, bei der noch eine schädliche Wirkung zu beobachten ist): niedrigste Konzentration der Prüfchemikalie mit statistisch signifikanter Wirkung ($p < 0,05$); bei diesem Test wird die LOEC als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens ausgedrückt. Bei allen Testkonzentrationen oberhalb der LOEC müsste normalerweise eine Wirkung auftreten, die sich statistisch von der jeweiligen Kontrolle unterscheidet. Alle Abweichungen von den vorstehenden Beschreibungen bei der Ermittlung der LOEC sind im Prüfbericht zu begründen.

NOEC (höchste Konzentration ohne beobachtete Wirkung): Die höchste Konzentration der Prüfchemikalie unmittelbar unterhalb der LOEC, bei der keine Wirkung beobachtet wird; bei diesem Test hat die der NOEC entsprechende Konzentration innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$).

Reproduktionsrate: mittlere Anzahl der juvenilen Würmer, die im Testzeitraum aus einer bestimmten Anzahl an adulten Tieren hervorgegangen sind.

Prüfchemikalie: ein Stoff oder eine Mischung, der bzw. die nach dieser Methode geprüft wird.

Anlage 2

BESTIMMUNG DER MAXIMALEN WASSERHALTEKAPAZITÄT

Bestimmung der Wasserhaltekapazität des künstlichen Bodens

Die folgende Methode hat sich als geeignet erwiesen. Eine nähere Beschreibung ist ISO DIS 11268-2 Anhang C zu entnehmen.

Mit einer geeigneten Vorrichtung (Stechzylinder usw.) eine bestimmte Menge (z. B. 5 g) des Prüfbodens entnehmen. Den Zylinder auf der Unterseite mit Filterpapier abdecken, anschließend mit Wasser füllen und auf einem Gestell in ein Wasserbad setzen. Den Zylinder allmählich eintauchen, bis der Boden durch das Wasser bedeckt ist, und etwa drei Stunden im Wasser belassen. Da nicht alles durch die Bodenkapillare aufgenommene Wasser im Substrat gehalten werden kann, den Zylinder mit der Bodenprobe zur Entwässerung für zwei Stunden in einem geschlossenen Gefäß (um eine Austrocknung zu verhindern) auf sehr feuchten, fein gemahlten Quarzsand stellen. Anschließend wird die Probe gewogen und bei 105 °C auf eine konstante Masse getrocknet. Die Wasserhaltekapazität (WHC = Water Holding Capacity) kann dann wie folgt berechnet werden:

$$\text{WHC (in \% Trockenmasse)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Dabei sind:

S = das wassergesättigte Substrat + Masse des Zylinders + Masse des Filterpapiers

T = Tara (Masse des Zylinders + Masse des Filterpapiers)

D = Trockenmasse des Substrats

LITERATUR:

ISO (Internationale Organisation für Normung) (1996). Bodenbeschaffenheit - Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer – Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von Eisenia fetida/Eisenia andrei, Nr. 11268-2. ISO, Genf.

Anlage 3

BESTIMMUNG DES PH-WERTES VON BÖDEN

Die folgende Methode zur Bestimmung des pH-Wertes von Böden beruht auf der Beschreibung in ISO 10390 (Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des pH-Wertes).

Eine gegebene Menge Boden mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur trocknen. Eine Suspension aus (mindestens 5 g) Boden in einer 1-M-Lösung analysenreines Kaliumchlorid (KCl) oder einer 0,01-M-Lösung analysenreines Calciumchlorid (CaCl₂) im Verhältnis 1:5 herstellen. Anschließend die Suspension fünf Minuten kräftig schütteln und dann mindestens 2, aber nicht länger als 24 Stunden ruhen lassen. Der pH-Wert der flüssigen Phase wird mit einem pH-Meter gemessen, das vor jeder Messung mit einer geeigneten Reihe an Pufferlösungen (z. B. pH 4,0 und 7,0) kalibriert wurde.

LITERATUR

ISO (Internationale Organisation für Normung) (1994).
Bodenbeschaffenheit – Bestimmung des pH-Wertes, Nr. 10390. ISO, Genf.

Anlage 4

KULTURBEDINGUNGEN FÜR *ENCHYTRAEUS SP.*

Enchytraeen der Art *Enchytraeus albidus* (und anderer *Enchytraeus*-Arten) können in großen Kunststoffkästen (z. B. 30 x 60 x 10 cm) gezüchtet werden, die mit einer Mischung aus künstlichem Boden und natürlicher, nicht kontaminierter Gartenerde im Verhältnis 1:1 gefüllt werden. Kompostmaterial könnte toxische Chemikalien (etwa Schwermetalle) enthalten und ist daher zu vermeiden. Vor der Verwendung des Bodens ist sämtliche Fauna zu entfernen (z. B. durch Gefrieren). Es kann auch ein Substrat ausschließlich aus künstlichem Boden verwendet werden, aber die Reproduktionsrate ist dann unter Umständen geringer als in einem gemischten Bodensubstrat. Der pH-Wert des Substrats muss im Bereich von $6,0 \pm 0,5$ liegen.

Die Kultur wird bei einer Temperatur von 15 bis 20 ± 2 °C im Dunkeln aufbewahrt. Temperaturen über 23 °C sind zu vermeiden. Der Boden muss feucht gehalten werden, darf aber nicht nass sein. Die richtige Feuchte ist dann gegeben, wenn bei vorsichtigem Ausdrücken des Bodens zwischen den Fingern kleine Wassertropfen austreten. Die Entstehung anoxischer Bedingungen ist zu vermeiden, indem sichergestellt wird, dass die Abdeckungen der Kulturgefäße einen angemessenen Gasaustausch mit der Atmosphäre ermöglichen. Um die Belüftung des Substrats zu erleichtern, ist der Boden wöchentlich vorsichtig zu lockern.

Die Würmer können mit Haferflocken gefüttert werden. Diese sind in verschlossenen Behältnissen zu lagern und vor Gebrauch zu autoklavieren oder zu erwärmen, um Befall mit Mehlmilben (z. B. *Glyzyphagus sp.*, *Astigmata*, *Acarina*) oder Raubmilben (z. B. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*) zu vermeiden. Nach der Wärmebehandlung wird das Futter gemahlen, damit es leichter auf dem Boden ausgestreut werden kann. Von Zeit zu Zeit können die Haferflocken mit Vitaminen, Milch und Lebertran angereichert werden. Als Futter kommen auch Backhefe und das Fischfutter „TetraMin“ in Betracht.

Die Fütterung erfolgt etwa zweimal pro Woche. Eine angemessene Menge Haferflocken wird auf dem Boden ausgestreut oder beim Lockern des Bodens zur besseren Belüftung vorsichtig in das Substrat gemischt. Die absolute Futtermenge hängt von der Anzahl Würmer im Substrat ab. Allgemein gilt, dass die Futtermenge zu erhöhen ist, wenn das gesamte Futter binnen eines Tages nach Bereitstellung aufgezehrt ist. Wenn dagegen bei der zweiten Fütterung (nach einer Woche) noch Futter auf der Bodenoberfläche liegt, muss die Futtermenge reduziert werden. Futter mit Schimmelpilzbefall ist zu entfernen und zu ersetzen. Nach drei Monaten sind die Würmer in frisch hergestelltes Substrat umzusetzen.

Die Kulturbedingungen gelten als zufriedenstellend, wenn die Würmer a) nicht versuchen, das Bodensubstrat zu verlassen, b) sich rasch im Boden bewegen, c) eine glänzende Oberfläche haben, an der keine Bodenpartikel anhaften, d) eine mehr oder

weniger weißliche Farbe haben, e) in unterschiedlichen Altersstufen in der Kultur vertreten sind und f) sich kontinuierlich vermehren.

Anlage 5

DURCHFÜHRUNG DER PRÜFUNG MIT ANDEREN *ENCHYTRAEUS*-ARTEN

Wahl der Arten

Außer *E. albidus* können auch andere Arten verwendet werden, dann sind Prüfverfahren und Validitätskriterien entsprechend anzupassen. Da viele *Enchytraeus*-Arten leicht zu beschaffen sind und im Labor gut gehalten werden können, sind die wichtigsten Kriterien für die Auswahl einer anderen Art als *E. albidus* die ökologische Relevanz und die Empfindlichkeit der jeweiligen Art. Es kann allerdings auch praktische Gründe für die Umstellung auf eine andere Art geben. In Ländern beispielsweise, in denen *E. albidus* nicht vorkommt und auch nicht eingeführt werden darf (z. B. aufgrund von Quarantänebestimmungen) müssen andere *Enchytraeus*-Arten verwendet werden.

Beispiele für geeignete alternative Arten)

- *Enchytraeus crypticus* (Westheide und Graefe 1992): Diese Art wurde in den letzten Jahren häufig in ökotoxologischen Untersuchungen verwendet, weil sie sich leicht züchten und untersuchen lässt. Die Würmer sind allerdings klein und entsprechend schwieriger zu handhaben als *E. albidus* (besonders in den Phasen vor Durchführung der Färbemethode). Das Vorkommen von *E. crypticus* im Freiland konnte nicht sicher nachgewiesen werden, da diese Art bisher nur in Zusammenhang mit Regenwurmkulturen beschrieben wurde. Seine ökologischen Anforderungen sind daher nicht bekannt.
- *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Unter dieser Bezeichnung wird vermutlich eine Gruppe eng verwandter Arten erfasst, die morphologisch schwer voneinander zu unterscheiden sind. Diese Art sollte nur dann für Prüfungen verwendet werden, wenn die für eine Untersuchung vorgesehenen Tiere jeweils einer bestimmten Art zugeordnet werden können. *E. buchholzi* kommt gewöhnlich in Wiesen und an gestörten Standorten (z. B. an Straßenrändern) vor.
- *Enchytraeus luxuriosus*: Diese Art wurde ursprünglich als *E. „minutus“* bezeichnet; sie wurde erst vor Kurzem näher beschrieben (1). *E. minutus* wurde von U. Graefe (Hamburg) erstmals in einer Wiese in der Nähe von St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein) entdeckt. *E. luxuriosus* ist etwa halb so groß wie *E. albidus*, aber größer als die übrigen hier behandelten Arten. Insoweit könnte diese Art eine gute Alternative zu *E. albidus* darstellen.
- *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen und Christensen 1963): Bislang wurde diese Art in mineralischen Böden in Deutschland und in Spanien dokumentiert, wo sie allgemein verbreitet ist, aber keine sehr großen Populationen aufweist. Im Vergleich zu anderen kleinen Arten dieser Gattung ist diese Art verhältnismäßig leicht zu bestimmen. Über ihr Verhalten in Laborversuchen oder über ihre Empfindlichkeit gegenüber Chemikalien ist nichts bekannt. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Art leicht zu kultivieren ist (E. Belotti, persönliche Mitteilung).

Zuchtbedingungen

Alle oben genannten *Enchytraeus*-Arten können in den Substraten kultiviert werden, die auch für *E. albidus* verwendet werden. Wegen der geringeren Größe der Tiere können auch die Kulturgefäße kleiner sein, und es kann zwar das gleiche Futter verwendet werden, aber die Futtermengen sind zu reduzieren. Der Lebenszyklus dieser Arten ist kürzer als der von *E. albidus*, und die Tiere müssen häufiger gefüttert werden.

Prüfbedingungen

Im Allgemeinen werden die Prüfungen unter den gleichen Bedingungen vorgenommen wie bei *E. albidus*; die folgenden Unterschiede sind allerdings zu beachten:

- Die Prüfgefäße können (müssen aber nicht) kleiner sein;
- der Reproduktionstest kann (muss aber nicht) verkürzt werden (etwa von sechs Wochen auf vier Wochen); die Dauer eines Vorversuchs sollte allerdings nicht geändert werden;
- in Anbetracht der geringen Größe der juvenilen Tiere wird nachdrücklich die Färbemethode zum Zählen der Tiere empfohlen;
- das Validitätskriterium bezüglich der „Anzahl der juvenilen Tiere pro Prüfgefäß in der Kontrollgruppe“ ist auf „50“ zu ändern.

LITERATUR

- (1) Schmelz, R.M, und Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57, 93-100.

Anlage 6

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ENTNAHMEVERFAHREN

Färbung mit Bengalrot

Diese ursprünglich in der limnischen Ökologie (1) entwickelte Methode wurde für die Zählung juveniler Enchytraeen im Enchytraeen-Reproduktionstest erstmals von W. de Coen (Universität Gent, Belgien) beschrieben. Unabhängig davon wurde von RIVM Bilthoven eine modifizierte Version entwickelt (Bengalrot gemischt mit Formaldehyd statt mit Ethanol) (2)(3).

Am Ende des definitiven Tests (d. h. nach sechs Wochen) wird der Boden aus den Prüfgefäßen in ein flaches Behältnis umgefüllt. Geeignet ist beispielsweise ein Bellaplast-Gefäß oder ein Fotoschale mit geripptem Boden, weil die Rippen die Beweglichkeit der Würmer im Beobachtungsbereich einschränken. Die juvenilen Tiere werden mit Ethanol fixiert (ca. 5 ml pro Replikat). Anschließend werden die Gefäße 1-2 cm hoch mit Wasser befüllt. Einige Tropfen (200-300 µl) Bengalrot (1%ige Lösung in Ethanol) werden hinzugegeben (alternativ 0,5 % Eosin), und die beiden Bestandteile werden sorgfältig gemischt. Nach zwölf Stunden sollten die Würmer eine rötliche Farbe aufweisen und leicht zu zählen sein, weil sie auf der Oberfläche des Substrats liegen. Alternativ kann die Substrat-Alkoholmischung durch ein Sieb gegeben werden (Maschenweite 0,250 mm), bevor die Würmer gezählt werden. Bei diesem Verfahren werden Kaolinit, Torf und (teilweise) Sand ausgewaschen; die rötlich eingefärbten Würmer sind dann leichter zu erkennen und zu zählen. Die Verwendung beleuchteter Lupen (Größe der Lupe mindestens 100 x 75 mm mit 2- oder 3-facher Vergrößerung) erleichtert das Zählen ebenfalls.

Die Färbetechnik verkürzt den Zeitaufwand beim Zählen auf wenige Minuten pro Gefäß; in der Regel müsste eine Person alle in einem Test verwendeten Gefäße in höchstens zwei Tagen auszählen können.

Nassextraktion

Mit der Nassextraktion sollte unmittelbar nach Testende begonnen werden. Der Boden aus den Prüfgefäßen wird in Kunststoffsiebe mit einer Maschenweite von etwa 1 mm gegeben. Anschließend werden die Siebe so auf Kunststoffschalen gesetzt, dass sie den Boden nicht berühren. Die Schalen werden vorsichtig mit Wasser gefüllt, bis die Proben in den Sieben vollständig von Wasser bedeckt sind. Um eine Wiederfindungsrate von mehr als 90 % aller vorhandenen Würmer sicherzustellen, ist für die Entnahme eine Zeitraum von 3 Tagen bei 20 ± 2 °C vorzusehen. Am Ende des Extraktionszeitraums werden die Siebe herausgenommen, und das Wasser wird (bis auf einen kleinen Anteil) langsam dekantiert, wobei darauf zu achten ist, dass die Sedimente am Boden der Gefäße nicht aufgewirbelt werden. Die Kunststoffschalen werden dann leicht geschwenkt, um die Sedimente im Überstandswasser zu suspendieren. Danach wird das

Wasser in eine Petrischale gegeben. Nach dem Absetzen der Bodenpartikel sind die Enchytraeen erkennbar und können mit einer Stahlpinzette mit weichen Spitzen unter einem Stereomikroskop gezählt werden.

Flotation

Eine Flotationsmethode wurde in einem Vermerk Anmerkung von R. Kuperman (4) beschrieben. Nach dem Fixieren des Inhalts eines Prüfgefäßes mit Ethanol wird der Boden bis zu einer Höhe von 10-15 mm über der Bodenoberfläche mit kolloidalem Siliciumdioxid Ludox AM-30 (30 Gew.-% Suspension in Wasser) bedeckt. Nachdem der Boden 2-3 Minuten gründlich mit dem Flotationsmittel gemischt wurde, können die auf der Oberfläche schwimmenden juvenilen Würmer leicht gezählt werden.

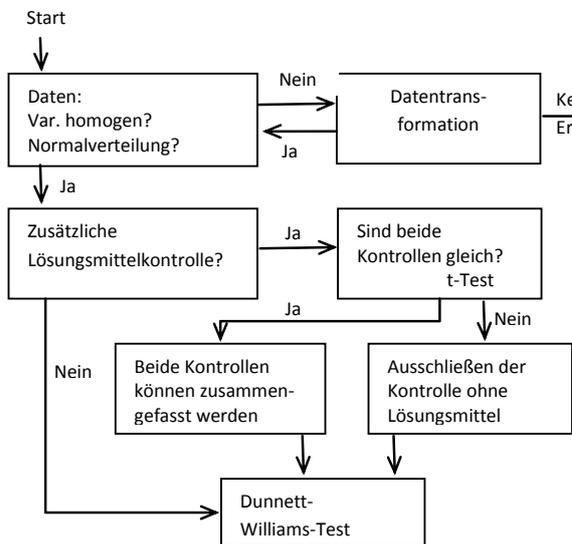
Literatur

- (1) Korinkova, J., und Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, *Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke* 32, 300-305.
- (2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R., und Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 S.
- (3) Posthuma, aL., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M., und Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotox. Envir. Safety* 38, 108-121.
- (4) Phillips, C.T., Checkai, R.T., und Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, S. 157.

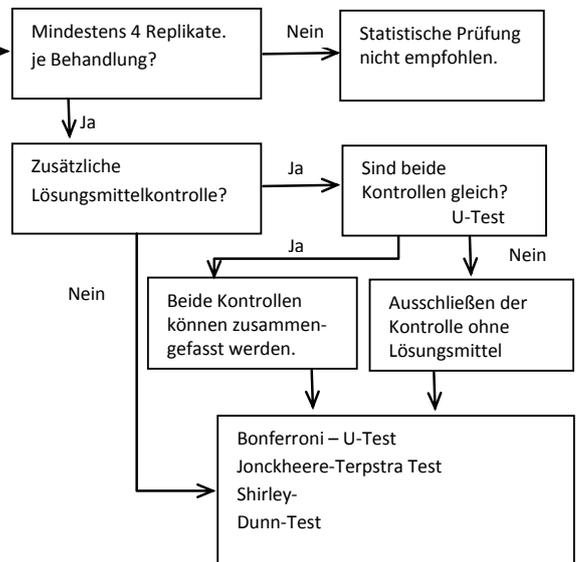
Anlage 7

ÜBERBLICK ÜBER DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG DER DATEN (NOEC-BESTIMMUNG)

Parametrische Prüfung



Nicht parametrische Prüfung



C.33. Reproduktionstest mit Regenwürmern (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*)

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 222 (2004). Sie wird zur Beurteilung der Wirkungen von Chemikalien im Boden auf die Reproduktionsleistung (sowie zur Beurteilung sonstiger subletaler Endpunkte) der Regenwurm-Arten *Eisenia fetida* (Savigny 1826) und *Eisenia andrei* (Andre 1963) verwendet (1)(2). Die Methode wurde einem Ringtest unterzogen (3). Eine Methode zur Prüfung der akuten Toxizität bei Regenwürmern ist verfügbar (4). Außerdem wurde eine Reihe weiterer internationaler und nationaler Leitlinien zur Prüfung der akuten und der chronischen Toxizität bei Regenwürmern veröffentlicht (5)(6)(7)(8).
2. *Eisenia fetida* /*Eisenia andrei* werden als Vertreter der Bodenfauna und insbesondere der Familie der Regenwürmer betrachtet. Hintergrundinformationen zur Ökologie der Regenwürmer und ihre Verwendung bei Ökotoxizitätsprüfungen sind verfügbar (7)(9)(10)(11)(12).

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

3. Adulte Würmer werden einer Reihe von Konzentrationen der entweder in den Boden gemischten oder – bei Pestiziden – auf den Boden aufgetragenen Prüfchemikalie ausgesetzt; dabei ist entsprechend den Anwendungsformen der jeweiligen Chemikalie zu verfahren. Das Applikationsverfahren hängt von den Prüfzielen ab. Die Konzentrationsspanne wird so gewählt, dass die Konzentrationen abgedeckt sind, bei denen über einen Zeitraum von acht Wochen mit subletalen und letalen Wirkungen zu rechnen ist. Nach vierwöchiger Exposition werden die Wirkungen auf die Mortalität und das Wachstum der adulten Würmer ermittelt. Die adulten Würmer werden aus dem Boden entfernt, und nach weiteren vier Wochen werden durch Auszählen der im Boden vorhandenen juvenilen Tiere die Wirkungen auf die Reproduktionsleistung beurteilt. Die Reproduktionsleistung der Tiere, die der Prüfchemikalie ausgesetzt waren, wird mit der Reproduktionsleistung der Kontrollgruppe(n) verglichen, um (i) die NOEC (höchste messbare Konzentration ohne statistisch signifikante Wirkung) und/oder (ii) mithilfe eines Regressionsmodells den EC_x-Wert (z. B. EC₁₀ oder EC₅₀), d. h. die Konzentration zu ermitteln, bei der die Reproduktionsleistung um x % reduziert wird. Die Testkonzentrationen müssen den EC_x-Bereich einschließen (z. B. EC₁₀ und EC₅₀), damit der EC_x-Wert nicht extrapoliert werden muss, sondern durch Interpolation bestimmt werden kann (Begriffsbestimmungen siehe Anlage 1).

ANGABEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

4. Die folgenden Angaben zur Prüfchemikalie müssen verfügbar sein, um geeignete Prüfverfahren aufstellen zu können:
 - Wasserlöslichkeit,
 - $\log K_{ow}$,
 - Dampfdruck
 - und möglichst Informationen zu Verbleib und Verhalten in der Umwelt (z. B. Photolyse- und Hydrolyserate soweit für die jeweilige Auf- oder Einbringung von Bedeutung).
5. Diese Prüfmethode ist bei allen Chemikalien unabhängig von ihrer Wasserlöslichkeit anzuwenden. Für flüchtige Chemikalien ist die Prüfmethode nicht geeignet (d. h. für Chemikalien, bei denen die Henry-Konstante oder der Luft-Wasser-Verteilungskoeffizient größer als 1 ist, oder für Chemikalien, bei denen der Dampfdruck bei 25 °C mehr als 0,0133 Pa beträgt).
6. Bei dieser Prüfmethode wird ein möglicher Abbau der Prüfchemikalie im Laufe des Versuchs nicht berücksichtigt. Entsprechend kann nicht davon ausgegangen werden, dass die anfänglichen Expositionskonzentrationen während der gesamten Prüfung aufrechterhalten werden. In diesem Fall sind chemische Analysen der Prüfchemikalie zu Beginn und am Ende der Prüfung zu empfehlen.

REFERENZCHEMIKALIE

7. Der NOEC- und/oder der EC_x -Wert einer Referenzchemikalie sind zu ermitteln, um angemessene Bedingungen für den Labortest sicherstellen und nachweisen zu können, dass sich die Reaktion der Testorganismen im Laufe der Zeit nicht statistisch relevant ändert. Referenzchemikalien sollten mindestens einmal jährlich bzw. – wenn die Tests seltener durchgeführt werden – parallel zur Bestimmung der Toxizität einer Prüfchemikalie getestet werden. Bei Carbendazim oder Benomyl wird die Reproduktionsleistung nachweislich beeinträchtigt; entsprechend sind beide Chemikalien als Referenzchemikalien geeignet (3). Signifikante Wirkungen müssten bei (a) 1 bis 5 mg Wirkstoff / kg Trockenmasse oder (b) 250-500 g/ha oder 25-50 mg/m² festzustellen sein. Wenn ein positiver toxischer Standard in die Testreihe aufgenommen wird, ist eine einzige Konzentration zu verwenden, und die Anzahl der Replikate muss mit der Anzahl in den Kontrollen übereinstimmen.

VALIDITÄT DES TESTS

8. Damit ein Testergebnis als gültig gewertet werden kann, müssen die Kontrollen die folgenden Kriterien erfüllen:
 - Aus jedem Replikat (mit jeweils 10 adulten Würmern) müssen bis zum Ende des Tests ≥ 30 juvenile Tiere hervorgegangen sein;
 - der Variationskoeffizient der Reproduktionsleistung liegt bei $\leq 30\%$;
 - die Mortalität adulter Tiere in den ersten vier Wochen des Tests beträgt $\leq 10\%$.

Wenn ein Test die genannten Validitätskriterien nicht erfüllt, ist der Test zu beenden, sofern keine besonderen Gründe für seine Fortsetzung vorliegen. Die Begründung ist in den Bericht aufzunehmen.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Ausrüstung

9. Zu verwenden sind Prüfbehälter aus Glas oder einem sonstigen chemisch inerten Material mit einem Fassungsvermögen von etwa 1 bis 2 l. Die Behälter sollten eine Querschnittsfläche von etwa 200 cm² haben, damit bei Zugabe von 500 bis 600 g Substrat (Trockenmasse) eine Tiefe des feuchten Substrats von etwa 5 bis 6 cm erreicht wird. Die Abdeckung des Behälters muss den Gasaustausch zwischen dem Substrat und der Atmosphäre zulassen, lichtdurchlässig sein (z. B. kann eine perforierte transparente Abdeckung verwendet werden) und ein Entweichen der Würmer verhindern. Wenn erheblich mehr Testsubstrat als die genannten 500 bis 600 g pro Prüfbehälter verwendet wird, ist die Anzahl der Würmer entsprechend zu erhöhen.
10. Es wird eine übliche Laborausrüstung insbesondere mit folgenden Bestandteilen benötigt:
 - Trockenschrank;
 - Stereomikroskop;
 - pH-Messgerät und Photometer;
 - Waagen mit geeigneter Genauigkeit;
 - geeignete Vorrichtungen zur Temperaturregelung;
 - geeignete Ausrüstung zur Feuchtigkeitsregelung (bei Expositionsgefäßen mit Deckel nicht wesentlich);
 - Inkubator oder kleiner Raum mit Klimaanlage;
 - Pinzette, Haken oder Schlaufen;
 - Wasserbad.

Herstellung des künstlichen Bodens

11. In diesem Test wird künstlicher Boden (5)(7) mit folgender Zusammensetzung verwendet (bezogen auf Trockenmassen, bei 105 °C bis zur Massekonstanz getrocknet):
 - 10 % Sphagnum-Torf (pH-Wert möglichst im Bereich 5,5-6,0, keine sichtbaren Pflanzenreste, fein gemahlen und auf einen bestimmten Feuchtegehalt getrocknet);
 - 20 % Kaolin-Ton (Kaolinit-Anteil vorzugsweise über 30 %);
 - 0,3 bis 1,0 % Calciumcarbonat (CaCO₃, pulverisiert, analysenrein), um einen pH-Ausgangswert von 6,0 ± 0,5 zu erzielen;
 - 70 % luftgetrockneter Quarzsand (je nach erforderlichem CaCO₃-Anteil), hauptsächlich Feinsand mit mehr als 50 % Partikeln mit einer Größe von 50-200 µm.

Hinweis 1: Wie viel CaCO_3 benötigt wird, hängt von der Zusammensetzung des Bodensubstrats einschließlich des Futters ab und ist unmittelbar vor der Untersuchung durch Messung von Teilproben des Bodens zu ermitteln. Der pH-Wert in einer gemischten Probe wird in einer Kaliumchlorid-Lösung (1 mol) oder einer Calciumchlorid-Lösung (CaCl_2) (0,01 mol) bestimmt (13).

Hinweis 2: Der Gehalt des künstlichen Bodens an organischem Kohlenstoff kann reduziert werden, z. B. indem der Torfgehalt auf 4 bis 5 % verringert und der Sandanteil entsprechend erhöht wird. Durch eine solche Reduzierung des Gehalts an organischem Kohlenstoff kann die Adsorption der Prüfchemikalie an den Boden (organischen Kohlenstoff) verringert werden und die Bioverfügbarkeit der Prüfchemikalie für die Würmer zunehmen. Es wurde nachgewiesen, dass *Eisenia fetida* den Validitätskriterien hinsichtlich der Vermehrung bei Versuchen mit Feldeböden mit geringerem Gehalt an organischem Kohlenstoff (z. B. 2,7 % (14)) genügt, und es hat sich gezeigt, dass diese Ergebnisse auch mit künstlichem Boden mit 5 %igem Torfgehalt erzielt werden können. Daher ist es zur Erfüllung der Validitätskriterien vor der Verwendung des künstlichen Bodens in einer Hauptprüfung nicht notwendig, seine Eignung für die Prüfung nachzuweisen, wenn der Torfgehalt nicht stärker als oben angegeben reduziert wird.

Hinweis 3: Wenn in weiteren (z. B. höherstufigen) Tests natürlicher Boden verwendet wird, sind auch die Eignung dieses Bodens und die Erfüllung der Validitätskriterien des Tests nachzuweisen.

12. Die trockenen Bestandteile des Bodens werden in einem gut belüfteten Bereich gründlich durchmischt (z. B. in einem großen Labormischer). Vor Prüfbeginn wird der trockene künstliche Boden mit so viel entionisiertem Wasser befeuchtet, bis etwa die Hälfte des endgültigen Wassergehalts erreicht ist, die 40 bis 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität (50 ± 10 % Feuchte bezogen auf die Trockenmasse) entspricht. Dabei entsteht ein Substrat, das kein überstehendes oder freies Wasser mehr enthält (durch Ausdrücken mit der Hand festzustellen). Die maximale Wasserhaltekapazität des künstlichen Bodens wird mit den in Anlage 2, ISO 11274 (15) oder der entsprechenden EU-Norm beschriebenen Verfahren ermittelt.
13. Wird die Prüfchemikalie auf die Bodenoberfläche aufgebracht oder ohne Wasser in den Boden gemischt, so kann die endgültige Menge des Wassers bei der Herstellung des Substrats in den künstlichen Boden gemischt werden. Wird die Prüfchemikalie zusammen mit etwas Wasser in den Boden gemischt, kann das zusätzliche Wasser zusammen mit der Prüfchemikalie hinzugegeben werden (siehe Nummer 19).
14. Der Feuchtegehalt des Bodens wird zu Beginn und am Ende des Tests gemäß ISO 11465 (16) oder nach der entsprechenden EU-Norm und der pH-Wert nach Anlage 3 oder ISO 10390 (13) bzw. der entsprechenden EU-Norm bestimmt. Diese Parameter sind an einer Probe des Kontrollbodens und jeweils an einer Probe des Bodens mit den einzelnen Testkonzentrationen zu ermitteln. Wenn saure oder basische Chemikalien geprüft werden, braucht der pH-Wert des Bodens nicht korrigiert zu werden. Der Feuchtegehalt ist während des gesamten Tests durch

regelmäßiges Wiegen der Behältnisse zu kontrollieren (siehe Nummern 26 und 30).

Auswahl und Vorbereitung der Testtiere

15. Als Testspezies werden *Eisenia fetida* oder *Eisenia andrei* verwendet (1)(2). Für den Prüfbeginn werden adulte, zwei bis zwölf Monate alte Würmer mit Clitellum benötigt. Die Würmer sind aus einer synchronisierten Kultur mit verhältnismäßig homogener Altersstruktur auszuwählen (Anlage 4). Der Altersunterschied zwischen den Tieren einer Testgruppe darf höchstens vier Wochen betragen.
16. Die ausgewählten Würmer werden mindestens einen Tag lang an den für die Prüfung zu verwendenden künstlichen Boden gewöhnt. Sie erhalten dabei das gleiche Futter, das auch im Test verwendet werden soll (siehe Nummern 31-33).
17. Zu Prüfbeginn werden Gruppen von je 10 Würmern einzeln gewogen und nach dem Zufallsprinzip auf die Prüfbehälter verteilt. Vor dem Wiegen werden die Würmer mit entionisiertem Wasser gewaschen und zum Abtropfen kurz auf Filterpapier gesetzt. Die Feuchtmasse der Würmer sollte jeweils zwischen 250 und 600 mg betragen.

Herstellung der Testkonzentrationen

18. Für die Applikation der Prüfchemikalie kommen zwei Methoden in Betracht: Die Prüfchemikalie kann in den Boden gemischt (siehe Nummern 19-21) oder auf die Bodenoberfläche aufgebracht werden (siehe Nummern 22-24). Welche Methode jeweils zu verwenden ist, hängt von den Prüfzielen ab. Im Allgemeinen wird empfohlen, die Prüfchemikalie in den Boden zu mischen. Es können allerdings Applikationsverfahren erforderlich sein, die der gängigen landwirtschaftlichen Praxis (z. B. Aufsprühen einer flüssigen Formulierung oder Verwendung spezieller Pestizidformulierungen wie z. B. Granulate oder Saatgutbeizen) entsprechen. Als Hilfsmittel zur Aufbereitung des Bodens mit der Prüfchemikalie sollten Lösungsmittel ausgewählt werden, die gegenüber Regenwürmern wenig toxisch sind, und im Prüfprotokoll ist eine geeignete Lösungsmittelkontrolle vorzusehen (siehe Nummer 27).

Mischen der Prüfchemikalie in den Boden

Wasserlösliche Prüfchemikalien

19. Unmittelbar vor Prüfbeginn wird eine Lösung der Prüfchemikalie in entionisiertem Wasser in der für alle Replikate einer Testkonzentration erforderlichen Menge hergestellt. Um die Herstellung der Testlösung zu erleichtern, wird unter Umständen ein zweites Lösungsmittel benötigt. Aus praktischen Gründen sollte so viel Lösung hergestellt werden, wie zur Erzielung des endgültigen Feuchtegehalts (40 bis 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität) erforderlich ist. Die Lösung wird gründlich mit dem Bodensubstrat gemischt, bevor die Mischung in die Prüfbehälter gegeben wird.

Wasserunlösliche Prüfchemikalien

20. Die Prüfchemikalie wird in einem kleinen Volumen eines geeigneten organischen Lösungsmittels (z. B. Aceton) gelöst und dann auf eine kleine Menge feinen Quarzsand aufgesprüht oder mit dem Sand vermischt. Anschließend wird sie einige Minuten unter einen Abzug gestellt, damit das Lösungsmittel verdunsten kann. Der so behandelte Sand wird gründlich mit dem angefeuchteten künstlichen Boden gemischt. Danach wird entionisiertes Wasser in der erforderlichen Menge hinzugegeben und mit dem Substrat gemischt, um einen endgültigen Feuchtegehalt von 40 bis 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität zu erzielen. Der Boden kann dann in die Prüfbehälter gegeben werden. Dabei ist zu beachten, dass manche Lösungsmittel für Regenwürmer toxisch sein können.

In Wasser und organischen Lösungsmitteln unlösliche Prüfchemikalien

21. 10 g fein gemahlener Industrie-Quarzsand werden mit der Menge der Prüfchemikalie gemischt, die zur Erzielung der Testkonzentration im Boden benötigt wird. Anschließend wird diese Mischung gründlich mit dem angefeuchteten künstlichen Boden gemischt. Danach wird entionisiertes Wasser in der erforderlichen Menge hinzugegeben und mit dem Substrat gemischt, um einen endgültigen Feuchtegehalt von 40 bis 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität zu erhalten. Der Boden kann dann in die Prüfbehälter gegeben werden.

Applikation der Prüfchemikalie auf die Bodenoberfläche

22. Der Boden wird nach dem Einsetzen der Würmer behandelt. Die Prüfbehälter werden zunächst mit dem angefeuchteten Bodensubstrat gefüllt; anschließend werden die gewogenen Würmer auf die Oberfläche gesetzt. Gesunde Würmer graben sich in der Regel sofort in das Substrat ein; nach 15 Minuten noch an der Oberfläche verbliebene Würmer werden entsprechend als beschädigt betrachtet und sind zu ersetzen. Wenn Würmer ersetzt werden, sind die neuen Würmer und die zu ersetzenden Würmer zu wiegen, damit zu Prüfbeginn das Lebendgewicht der gesamten exponierten Gruppe und das Gesamtgewicht des Behälters mit den Würmern bekannt sind.
23. Danach wird die Prüfchemikalie hinzugegeben. In der ersten halben Stunde nach dem Einsetzen der Würmer (oder wenn sich noch Würmer an der Oberfläche befinden) darf die Prüfchemikalie noch nicht hinzugegeben werden, um einen unmittelbaren Hautkontakt mit der Prüfchemikalie zu vermeiden. Handelt es sich bei der Prüfchemikalie um ein Pestizid, kann es angebracht sein, die Chemikalie auf den Boden aufzusprühen. Die Prüfchemikalie ist mit einem geeigneten Labor-Sprühgerät möglichst gleichmäßig auf den Boden aufzubringen, um die Sprühapplikation im Freiland zu simulieren. Vor der Applikation die Abdeckung des Prüfbehälters abnehmen und den Behälter auskleiden, um die Seitenwände des Behälters vor Spritzern zu schützen. Zur Auskleidung kann ein Prüfbehälter ohne Boden verwendet werden. Die Applikation muss bei einer Temperatur von 20 ± 2 °C und, bei wässrigen Lösungen, Emulsionen oder Dispersionen, mit einem

Wasserdurchsatz von 600-800 $\mu\text{l}/\text{m}^2$ erfolgen. Die Wassermenge ist mit einem geeigneten Kalibrierungsverfahren zu kontrollieren. Spezielle Formulierungen (z. B. Granulate oder Saatgutbeizen) sind entsprechend der landwirtschaftlichen Praxis aufzubringen.

24. Die Prüfbehälter bleiben eine Stunde geöffnet, damit zur Applikation der Prüfchemikalie verwendete flüchtige Lösungsmittel verdunsten können. Dabei ist darauf zu achten, dass in diesem Zeitraum keine Würmer die Prüfgefäße verlassen.

VERFAHREN

Test- und Kontrollgruppen

25. Empfohlen werden 10 Regenwürmer je 500 bis 600 g künstlicher Boden (Trockenmasse) (d. h. 50 bis 60 g Boden pro Wurm). Wenn größere Mengen an Boden verwendet werden (etwa bei der Prüfung von Pestiziden in Verbindung mit besonderen Applikationsverfahren (z. B. bei Saatgutbeizen)) muss das Verhältnis von 50 bis 60 g Boden pro Wurm durch Erhöhung der Anzahl der Würmer ausgeglichen werden. Für jeden Kontrollbehälter und jeden Prüfbehälter 10 Würmer vorbereiten. Die Würmer waschen, abwischen und dann kurz auf saugfähiges Papier legen, um überschüssiges Wasser zu entfernen.
26. Um systematische Fehler beim Verteilen der Würmer auf die Prüfbehälter zu vermeiden, ist die Homogenität der Prüfpopulation zu bestimmen, indem aus der Population, aus der die Versuchstiere zu entnehmen sind, eine Probe von 20 Würmern nach dem Zufallsprinzip entnommen wird. Diese werden einzeln gewogen. Nachdem die nötige Homogenität sichergestellt ist, werden Gruppen von Würmern gebildet, gewogen und nach dem Zufallsprinzip den Prüfbehältern zugeordnet. Nach dem Einsetzen der Versuchstiere ist jeder einzelne Prüfbehälter zu wiegen, um ein Ausgangsgewicht zu erhalten, das als Grundlage für die Überwachung des Feuchtegehalts des Bodens während des gesamten Versuchs dienen kann (siehe Nummer 30). Anschließend werden die Prüfbehälter, wie unter Nummer 9 beschrieben, abgedeckt und in die Prüfkammer gestellt.
27. Für jede der unter den Nummern 18-24 beschriebenen Methoden zur Applikation der Prüfchemikalie werden geeignete Kontrollen hergestellt. Die beschriebenen Verfahren sind auch bei Herstellung der Kontrollen einzuhalten, allerdings wird keine Prüfchemikalie hinzugegeben. Gegebenenfalls werden also organische Lösungsmittel, Quarzsand oder sonstige Trägerstoffe in Konzentrationen/Mengen entsprechend den Anteilen in den Prüfbehältern hinzugegeben. Soweit ein Lösungsmittel oder ein sonstiger Trägerstoff verwendet wird, um eine Prüfchemikalie aufzubringen, ist eine zusätzliche Kontrolle ohne den Trägerstoff und ohne die Prüfchemikalie herzustellen und zu untersuchen, um sicherzustellen, dass der Trägerstoff keine Auswirkungen auf das Ergebnis hat.

Prüfbedingungen

28. Die Testtemperatur beträgt 20 ± 2 °C. Der Test wird bei einem geregelten Licht-Dunkel-Zyklus (vorzugsweise 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit) mit einer Lichtstärke von 400 bis 800 lx im Bereich der Prüfbehälter durchgeführt.
29. Die Prüfbehälter werden während des Versuchs nicht belüftet; die Deckel der Prüfgefäße sollten jedoch so beschaffen sein, dass ein Gasaustausch ermöglicht und die Verdunstung von Feuchtigkeit begrenzt wird (siehe Nummer 9).
30. Der Wassergehalt des Bodensubstrats in den Prüfbehältern ist während des gesamten Versuchs aufrechtzuerhalten, indem die Prüfbehälter (ohne Abdeckung) regelmäßig gewogen und Verluste gegebenenfalls mit entionisiertem Wasser ausgeglichen werden. Der Wassergehalt sollte um höchstens 10 % vom Anfangswassergehalt abweichen.

Fütterung

31. Akzeptabel ist jedes Futter, das nachweislich dafür sorgt, während der Dauer des Versuchs das Gewicht der Würmer aufrechtzuerhalten. Erfahrungsgemäß sind Haferflocken sowie Rinder- und Pferdedung geeignet. Es muss sichergestellt werden, dass die Rinder oder Pferde, von denen der Dung stammt, nicht mit Arzneimitteln oder Chemikalien wie z. B. wachstumsfördernden Mitteln, Nematiziden oder sonstigen veterinärmedizinischen Produkten behandelt wurden, die die Entwicklung der Würmer während des Versuchs beeinträchtigen könnten. Nach Möglichkeit sollte selbstgesammelter Rinderdung verwendet werden, da sich gezeigt hat, dass im Handel als Gartendünger angebotener Rinderdung nachteilige Wirkungen auf die Würmer haben kann. Der Dung sollte luftgetrocknet und fein gemahlen sein und vor seiner Verwendung pasteurisiert werden.
32. Jede frische Futtercharge ist vor der Verwendung im Versuch an eine nicht für den Versuch vorgesehene Wurmkultur zu verfüttern, um sicherzustellen, dass es von geeigneter Qualität ist. Das Wachstum und die Kokonbildung dürfen bei den Würmern im Vergleich zu Würmern in einem Substrat, das kein Futter aus der neuen Charge enthält (Bedingungen siehe Prüfmethode C.8 (4)), nicht beeinträchtigt sein.
33. Das Futter wird erstmals einen Tag nach dem Einsetzen der Würmer und nach Applikation der Prüfchemikalie auf den Boden bereitgestellt. In jedem Behälter werden etwa 5 g des Futters auf der Bodenoberfläche verteilt und mit entionisiertem Wasser befeuchtet (etwa 5 bis 6 ml pro Behälter). Danach wird während der vierwöchigen Testdauer einmal pro Woche frisches Futter hinzugegeben. Wenn das Futter nicht verzehrt wird, ist die Ration zu reduzieren, um Pilz- und Schimmelbildung zu vermeiden. Die adulten Würmer werden an Tag 28 des Versuchs aus dem Boden genommen. Danach werden nochmals weitere 5 g Futter in die Prüfbehälter gegeben. Während der übrigen vier Wochen des Tests wird nicht mehr gefüttert.

Auswahl der Testkonzentrationen

34. Bereits bekannte Informationen über die Toxizität der Prüfchemikalie bieten einen Anhaltspunkt für die Auswahl angemessener Testkonzentrationen (z. B. Erfahrungswerte aus einem Test zur Prüfung der akuten Toxizität (4) und/oder Ergebnisse von Vorversuchen). Wenn erforderlich, wird ein Vorversuch beispielsweise mit fünf Konzentrationen der Prüfchemikalie (0,1, 1,0, 10, 100 und 1000 mg/kg (Trockenmasse des Bodens)) vorgenommen. Ein Replikat pro Gefäß mit Testkonzentration und pro Kontrolle ist ausreichend. Der Vorversuch dauert zwei Wochen; am Ende des Tests wird die Mortalität ermittelt.

Prüfprotokoll

35. Da für diesen Versuch keine allgemeingültige Statistik vorgegeben werden kann, wird im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode die Ermittlung der NOEC- und EC_x -Werte beschrieben. In absehbarer Zukunft werden die zuständigen Behörden wahrscheinlich die Angabe der NOEC vorschreiben. Ebenfalls in näherer Zukunft könnten EC_x -Werte aus statistischen und ökologischen Gründen umfassender berücksichtigt werden. Entsprechend den Empfehlungen aufgrund eines Ringtests im Zusammenhang mit einem Prüfverfahren zur Ermittlung der Reproduktionsleistung von Enchytraeen werden daher drei Protokolle vorgeschlagen (17).
36. Bei der Festlegung der Konzentrationen sind die folgenden Aspekte zu berücksichtigen:
- Zur Bestimmung der NOEC sind mindestens fünf/zwölf Konzentrationen in einer geometrischen Reihe zu prüfen. Zu empfehlen sind vier Replikate je Testkonzentration und acht Kontrollen. Die Konzentrationen dürfen sich maximal um den Faktor 2,0 unterscheiden.
 - Zur Ermittlung der EC_x -Werte (z. B. EC_{10} oder EC_{50}) wird eine angemessene Anzahl an Konzentrationen empfohlen, die mindestens vier statistisch signifikant unterschiedliche mittlere Reaktionen hervorrufen. Zu empfehlen sind mindestens zwei Replikate pro Testkonzentration und sechs Replikate pro Kontrolle. Der Abstandsfaktor kann unterschiedlich sein (d. h. im erwarteten Wirkungsbereich maximal 1,8 und bei den höheren und niedrigeren Konzentrationen mehr als 1,8).
 - Ein kombinierter Ansatz ermöglicht die Bestimmung sowohl der NOEC als auch des EC_x -Werts. Es sind acht Behandlungskonzentrationen in einer geometrischen Reihe zu verwenden. Zu empfehlen sind vier Replikate je Behandlung und acht Kontrollen. Die Konzentrationen dürfen sich maximal um den Faktor 1,8 unterscheiden.

Testdauer und Messungen

37. An Tag 28 werden die lebenden adulten Würmer ermittelt und gezählt. Verhaltensauffälligkeiten bei adulten Tiere (die Tiere können sich nicht mehr in den Boden eingraben oder liegen unbeweglich auf dem Boden) und morphologische Änderungen (z. B. offene Wunden) werden ebenfalls protokolliert. Anschließend werden alle adulten Würmer aus den Prüfgefäßen herausgenommen, gezählt und gewogen. Die Entnahme der adulten Würmer kann erleichtert werden, indem der

Boden mit den Würmern vor der Beurteilung in eine saubere Schale umgefüllt wird. Vor dem Wiegen werden die aus dem Boden entnommenen Würmer gewaschen (mit entionisiertem Wasser); zur Entfernung des überschüssigen Wassers werden die Würmer kurz auf Filterpapier gelegt. Nicht wiedergefundene Würmer sind als tot zu erfassen; es wird davon ausgegangen, dass diese Würmer gestorben sind und sich vor der Bewertung zersetzt haben.

38. Wenn der Boden aus den Behältern genommen wurde, wird er nun (ohne die adulten Würmer, aber gegebenenfalls mit gebildeten Kokons) in die Behälter zurückgegeben. Anschließend wird der Boden weitere vier Wochen unter den genannten Prüfbedingungen inkubiert; gefüttert wird allerdings nur noch einmal zu Beginn dieser Testphase (siehe Nummer 33).
39. Nach Ablauf der zweiten 4-wöchigen Phase werden die Anzahl der aus den in dem Boden befindlichen Kokons geschlüpften juvenilen Tiere und die Anzahl der Kokons mit den in Anlage 5 beschriebenen Verfahren ermittelt. Außerdem sind sämtliche Anzeichen von Beschädigungen oder Verletzungen der Würmer während der Testphase zu erfassen.

Limit-Test

40. Wenn im Vorversuch bei der höchsten Konzentration (1000 mg/kg) keine Wirkungen festzustellen sind, wird der Reproduktionstest als Limit-Test mit der Testkonzentration 1000 mg/kg durchgeführt. Mit einem Limit-Test kann unter Minimierung der im Versuch zu verwendenden Würmer nachgewiesen werden, dass die NOEC für die Reproduktionsleistung größer ist als die Limit-Konzentration. Sowohl für den behandelten Boden als auch für die Kontrollen sind jeweils acht Replikate zu verwenden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

41. Anlage 6 enthält zwar eine Übersicht, doch bei dieser Prüfmethode ist keine statistische Vorgehensweise für die Analyse der Prüfergebnisse vorgeschrieben.
42. Ein Endpunkt ist die Mortalität. Änderungen im Verhalten der adulten Tiere (die Würmer können sich nicht mehr in den Boden eingraben, sie liegen reglos an der Glaswand des Prüfgefäßes usw.) sowie morphologische Änderungen (z. B. offene Wunden) sind jedoch ebenso zu protokollieren wie das Vorhandensein juveniler Würmer. Der LC_{50} -Wert wird normalerweise mit Probit-Analysen (18) oder durch logistische Regressionsanalysen bestimmt. Wenn diese Analysemethode jedoch ungeeignet ist (z. B. wenn weniger als drei Konzentrationen verfügbar sind, bei denen Tiere gestorben sind), können auch alternative Methoden verwendet werden. In Betracht kommen etwa gleitende Durchschnitte (19), die Trimmed-Spearman-Kärber-Methode (20) oder eine einfache Interpolation (z. B. geometrischer Mittelwert von LC_0 und LC_{100} , berechnet als Quadratwurzel von LC_0 multipliziert

mit LC_{100}).

43. Der andere Endpunkt ist die Vermehrungsrate (. h. die Anzahl der entstandenen juvenilen Tiere). Ebenso wie im Vorversuch sind jedoch im Abschlussbericht auch alle sonstigen Anzeichen für schädliche Wirkungen zu erfassen. Für die statistische Analyse müssen für jede Testkonzentration und für jede Kontrolle im Reproduktionstest das arithmetische Mittel \bar{x} und die Standardabweichung berechnet werden.
44. Wenn eine Varianzanalyse vorgenommen wurde, können die Standardabweichung, s , und die Freiheitsgrade, df , durch die nach der ANOVA geschätzte gepoolte Varianz und durch die entsprechenden Freiheitsgrade ersetzt werden (wenn die Varianz nicht von der Konzentration abhängig ist). In diesem Fall sind die einzelnen Varianzen der Kontrollen und der Gefäße mit den Testkonzentrationen zu verwenden. In der Regel werden die betreffenden Werte mit kommerzieller Statistik-Software berechnet, wobei die Ergebnisse der einzelnen Gefäße als Replikate angenommen werden. Wenn die Zusammenfassung von Daten der negativen Kontrollen und der Lösungsmittelkontrollen sinnvoller erscheint als die Prüfung mit einer einzelnen Kontrolle, werden die Kontrollen getestet, um sicherzustellen, dass sich die Ergebnisse nicht signifikant unterscheiden (entsprechende Tests siehe Nummer 47 und Anlage 6).
45. Ob weitere statistische Tests vorzunehmen und statistische Rückschlüsse zu ziehen sind, hängt davon ab, ob bei den Replikaten eine Normalverteilung und eine homogene Varianz der Werte gegeben sind.

NOEC-Schätzung

46. Vorzugsweise sollten leistungsfähige Tests durchgeführt werden. Dabei könnten Informationen (z. B. frühere Erfahrungen mit Ringtests oder sonstige historische Daten) herangezogen werden, um zu beurteilen, ob die Daten in etwa normal verteilt sind. Entscheidend ist die Varianzhomogenität (Homoskedastizität). Erfahrungsgemäß steigt die Varianz häufig mit zunehmendem Mittelwert. In diesem Fall könnte eine Datenumwandlung eine Homoskedastizität zur Folge haben. Eine entsprechende Umwandlung sollte aber eher auf Erfahrungen mit historischen Daten als auf den Daten der aktuellen Untersuchung beruhen. Bei homogenen Daten sind multiple t-Tests (z. B. ein Williams-Test ($\alpha = 0,05$, einseitig) (21)(22) oder in bestimmten Fällen auch ein Dunnett-Test (23)(24)) durchzuführen. Bei uneinheitlichen Replikaten müssen die t-Werte in der Tabelle korrigiert werden, wie von Dunnett und Williams empfohlen. Bei einer starken Variation steigen/sinken die Ergebnisse nicht regelmäßig. Bei derart starken Monotonieabweichungen ist der Dunnett-Test besser geeignet. Bei Abweichungen von der Homoskedastizität kann es angebracht sein, mögliche Wirkungen in Bezug auf Varianzen näher zu untersuchen, um dann zu entscheiden, ob die t-Tests durchgeführt werden können, ohne zu viel an Aussagekraft einzubüßen (25). Alternativ kann ein multipler U-Test (z. B. der Bonferroni-U-Test nach Holm (26)) oder – wenn bei diesen Daten zwar eine Homoskedastizität festzustellen ist, die Daten ansonsten aber mit der zugrunde

liegenden monotonen Dosis-Wirkungs-Kurve übereinstimmen – ein weiterer nicht parametrischer Test (z. B. Jonckheere-Terpstra (27) (28) oder Shirley (29) (30)) vorgenommen werden; dies wäre im Allgemeinen sinnvoller als t-Tests für ungleiche Varianzen (siehe auch Flussdiagramm in Anlage 6).

47. Wenn ein Limit-Test durchgeführt wurde und die Voraussetzungen für parametrische Prüfverfahren (Normalität, Homogenität) erfüllt sind, kann der paarige Student-t-Test verwendet werden; ansonsten ist der U-Test nach Mann und Whitney durchzuführen (31).

EC_x-Schätzung

48. Zur Berechnung eines EC_x-Werts wird eine Regressionsanalyse (linear oder nicht linear) mit den Mittelwerten aus der Vorbehandlung vorgenommen, nachdem eine geeignete Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt wurde. Für das Wachstum der Würmer als kontinuierliche Reaktion können EC_x-Werte aufgrund einer geeigneten Regressionsanalyse geschätzt werden (32). Geeignete Funktionen für quantale Daten (Mortalität/Überleben und Anzahl der Nachkommen) sind die normale sigmoide Funktion, die Logit-Funktion oder die Weibull-Funktion mit zwei bis vier Parametern, die teilweise auch hormetische Effekte abbilden können. Wenn eine Dosis-Wirkungs-Funktion mithilfe einer linearen Regressionsanalyse angepasst wurde, müssten in der Regressionsanalyse ein signifikanter r²-Wert (Bestimmungskoeffizient) und/oder eine Steigung festzustellen sein; anschließend wird der EC_x-Wert abgeschätzt, indem in die nach der Regressionsanalyse erstellte Gleichung ein Wert entsprechend x % des Mittelwerts der Kontrollgruppe eingesetzt wird. 95%-Konfidenzintervalle werden nach Fieller (zitiert in Finney (18)) oder mit sonstigen modernen geeigneten Methoden berechnet.
49. Alternativ wird die Reaktion als Anteil oder Prozentanteil eines Modellparameters nachgebildet, der dann als mittlere Reaktion der Kontrollgruppe angenommen wird. In diesen Fällen kann die normale (Logit, Weibull) Sigmakurve durch eine Probit-Regression häufig leicht an die Ergebnisse angepasst werden (18). In diesen Fällen ist die Gewichtungsfunktion entsprechend den metrischen Antworten anzupassen, wie bei Christensen (33) beschrieben. Wenn allerdings eine Hormesis festgestellt wurde, ist die Probit-Analyse durch eine 4-Parameter-Funktion (Logit oder Weibull) zu ersetzen, die mit einem nicht linearen Regressionsverfahren angepasst wird (34). Kann keine geeignete Dosis-Wirkungs-Funktion an die Daten angepasst werden, können alternative Methoden zur Abschätzung von EC_x und der entsprechenden Konfidenzintervalle verwendet werden (beispielsweise gleitende Durchschnitte nach Thompson (19) und das Trimmed-Spearman-Kärber-Verfahren (20)).

PRÜFBERICHT

50. Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- eine genaue Beschreibung der Prüfchemikalie (Charge, Los, CAS-Nummer und

Reinheit);

- Merkmale der Prüfchemikalie (z. B. $\log K_{ow}$, Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Henry-Konstante (H) und Angaben zu Verbleib und Verhalten).

Testorganismen:

- eingesetzte Testtiere: Art, wissenschaftlicher Name, Bezugsquelle und Zuchtbedingungen;
- Alter, Größenbereich (Masse) der Testorganismen.

Prüfbedingungen

- Angaben zur Herstellung des Prüfbodens;
- maximale Wasserhaltekapazität des Bodens;
- Beschreibung des Verfahrens zur Einbringung der Prüfchemikalie in den Boden;
- nähere Angaben zu chemischen Hilfsstoffen, die zur Applikation der Prüfchemikalie verwendet wurden;
- (gegebenenfalls) Angaben zur Kalibrierung der Sprühvorrichtung;
- Beschreibung des Versuchsaufbaus und des Prüfverfahrens;
- Größe der Prüfbehälter und Volumen des Prüfsubstrats;
- Prüfbedingungen: Lichtintensität, Dauer der Licht-Dunkel-Zyklen, Temperatur;
- Beschreibung der Fütterung; Typ und Menge des im Versuch verwendeten Futters; Zeitpunkte der Fütterung;
- pH-Wert und Wassergehalt des Bodens zu Beginn und am Ende des Versuchs.

Prüfresultate:

- Mortalität der adulten Tiere (%) in jedem Prüfbehälter nach den ersten vier Wochen des Versuchs;
- Gesamtmasse der adulten Würmer in den einzelnen Prüfbehältern zu Beginn des Versuchs;
- Gewichtsveränderungen der lebenden adulten Würmer (% des Ausgangsgewichts) in den einzelnen Prüfbehältern nach den ersten vier Wochen des Versuchs;
- Anzahl der in den einzelnen Prüfbehältern entstandenen juvenilen Tiere am Ende des Versuchs;
- Beschreibung deutlicher oder pathologischer Symptome oder ausgeprägter Verhaltensänderungen;
- Ergebnisse mit der Referenzchemikalie;
- der LC_{50} -Wert, die NOEC und/oder der EC_x -Wert (z. B. EC_{50} oder EC_{10}) für die Reproduktionsleistung, gegebenenfalls mit Konfidenzintervallen, und eine Grafik des angepassten Modells für die Berechnung sowie sämtliche Informationen und Feststellungen, die für die Interpretation der Ergebnisse hilfreich sein könnten;
- grafische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- Ergebnisse der einzelnen Prüfbehälter;

Abweichungen von den für diese Prüfmethode beschriebenen Verfahren und außergewöhnliche Vorkommnisse während der Prüfung.

LITERATUR

- (1) Jaenicke, J. (1982). „*Eisenia fetida*“ is two biological species. *Megadrilogica* 4, 6-8.
- (2) Oien, N. und J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm - III. Electrophoresis reveals that *Eisenia fetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277 - 282.
- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* – comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. *Mitt. Biol. Bundesamt. f. Land- Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, 320, S. 50-82.
- (4) Kapitel C.8 dieses Anhangs; Toxizität für Regenwürmer.
- (5) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1996). Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von *Eisenia fetida/Eisenia andrei*, Nr. 11268-2. ISO, Genf.
- (6) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1993). Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia Fetida*) – Teil 1: Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität unter Verwendung von künstlichem Bodensubstrat, Nr. 11268-1. ISO, Genf.
- (7) SETAC (1998). *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M. und Posthuma, L. (Hrsg.). SETAC Press, 456 S.
- (8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.
- (9) Bouché, M.B. (1972). *Lombriciens de France, Ecologie et systématique*. Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Kommission der Europäischen Gemeinschaften.

- (11) Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J. und Heimbach, F. (Hrsg.) (1992). *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercept.
- (12) Edwards, C.A. und Bohlen, J. P. (1996). *Biology and ecology of Earthworms*, Dritte Ausgabe. Chapman and Hall, London.
- (13) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1994). *Bodenbeschaffenheit – Bestimmung des pH-Wertes*, Nr. 10390. ISO, Genf.
- (14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. und Achazi, R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. und Eisentraeger, A. (Hrsg.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (15) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1992). *Bodenbeschaffenheit - Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens – Laborverfahren*, Nr. 11274. ISO, Genf.
- (16) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1993). *Bodenbeschaffenheit; Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehaltes auf Grundlage der Masse; Gravimetrisches Verfahren*, Nr. 11465. ISO, Genf.
- (17) Römbke, J. und Moser, Th. (1999). *Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test*. UBA-Texte 4/99, S. 150+ 223.
- (18) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (Dritte Ausgabe), S. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. – Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) Hamilton, M.A., Russo, R.C. und Thurston, R.V. (1977). *Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays*. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; berichtigte Fassung *Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (21) Williams, D.A. (1971). *A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control*. *Biometrics* 27, 103-117.
- (22) Williams, D.A. (1972). *The comparison of several dose levels with a zero dose control*. *Biometrics* 28, 519-531.

- (23) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (24) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- (25) Hoeven, N. van der (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? *Ecotoxicology* 7: 355-361.
- (26) Holm, S. (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (27) Jonckheere, A. R. (1954). A distribution-free k-sample test against ordered alternatives. *Biometrika* 41, 133-145.
- (28) Terpstra, T. J. (1952). The asymptotic normality and consistency of Kendall's test against trend, when ties are present in one ranking. *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies. *Applied Statistics* 28, 144-151.
- (30) Williams, D.A. (1986).; A note on Shirley's nonparametric test for comparing several dose levels with a zero-dose control. *Biometrics* 42, 183-186.
- (31) Sokal, R.R. und Rohlf, F.J. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research.* Zweite Ausgabe. W.H. Freeman and Company. New York.
- (32) Bruce, R.D. und Versteeg, D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.
- (33) Christensen, E.R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18, 213-221.
- (34) Van Ewijk, P.H. und Hoekstra, J.A. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Für diese Prüfmethode gelten folgende Definitionen:

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch.

EC_x (Konzentration mit einer Wirkung von x %): Konzentration, bei der es innerhalb einer gegebenen Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle zu einer x %- Wirkung auf die Testorganismen kommt; EC₅₀ beispielsweise ist die Konzentration, bei der bei 50 % einer exponierten Population während einer bestimmten Expositionsdauer von einer Wirkung auf einen Endpunkt der Prüfung ausgegangen wird. Bei diesem Test werden die Wirkungskonzentrationen als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens oder als Masse der Prüfchemikalie pro Flächeneinheit des Bodens ausgedrückt.

LC₀ (Konzentration ohne letale Wirkung): die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der Testorganismen innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer nicht getötet werden; bei diesem Test wird LC₀ als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens ausgedrückt.

LC₅₀ (mittlere letale Konzentration): die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der Testorganismen innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer zu 50 % getötet werden; bei diesem Test wird LC₅₀ als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens oder als Masse der Prüfchemikalie pro Flächeneinheit des Bodens ausgedrückt.

LC₁₀₀ (absolut tödliche Konzentration): die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der Testorganismen innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer zu 100 % getötet werden; bei diesem Test wird LC₁₀₀ als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens ausgedrückt.

LOEC: die niedrigste Konzentration der Prüfchemikalie mit statistisch signifikanter Wirkung ($p < 0,05$); in diesem Test wird die LOEC als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens oder als Masse der Prüfchemikalie pro Flächeneinheit des Bodens ausgedrückt. Bei allen Testkonzentrationen oberhalb der LOEC müsste normalerweise eine Wirkung auftreten, die sich statistisch von der jeweiligen Kontrolle unterscheidet. Jegliche Abweichungen von diesen Vorgaben sind im Prüfbericht zu begründen.

NOEC: die höchste messbare Konzentration der Prüfchemikalie (unmittelbar unterhalb der LOEC) ohne statistisch signifikante Wirkung; bei diesem Test hat die der NOEC entsprechende Konzentration innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$).

Prüfchemikalie: jeder Stoff oder jedes Gemisch, der bzw. das mit dieser Methode geprüft wird.

Reproduktionsrate: durchschnittliche Anzahl der juvenilen Würmer, die im Testzeitraum aus einer bestimmten Anzahl an adulten Tieren hervorgegangen sind.

Anlage 2

BESTIMMUNG DER MAXIMALEN WASSERHALTEKAPAZITÄT DES KÜNSTLICHEN BODENS

Die folgende Methode hat sich zur Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens bewährt. Eine nähere Beschreibung ist ISO DIS 11268-2 (1) Anhang C zu entnehmen.

Mit einer geeigneten Vorrichtung zur Probenahme (Stechzylinder etc.) eine bestimmte Menge (z. B. 5 g) des Prüfbodens entnehmen. Den Zylinder auf der Unterseite mit Filterpapier abdecken, anschließend mit Wasser füllen und auf einem Gestell in ein Wasserbad setzen. Den Zylinder allmählich eintauchen, bis der Boden durch das Wasser bedeckt ist, und etwa drei Stunden im Wasser belassen. Da nicht alles durch die Bodenkapillare aufgenommene Wasser im Substrat gehalten werden kann, den Zylinder mit der Bodenprobe zur Entwässerung für zwei Stunden in einem geschlossenen Gefäß (um eine Austrocknung zu verhindern) auf sehr feuchten, fein gemahlten Quarzsand stellen. Anschließend die Probe wiegen und bei 105 °C bis zur Massekonstanz trocknen. Die Wasserhaltekapazität (*Water Holding Capacity*, WHC) kann dann wie folgt berechnet werden:

$$\text{WHC (in \% Trockenmasse)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Dabei sind:

S = das wassergesättigte Substrat + Masse des Zylinders + Masse des Filterpapiers

T = Tara (Masse des Zylinders + Masse des Filterpapiers)

D = Trockenmasse des Substrats

LITERATUR:

- (1) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1996). Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer – Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*, Nr. 11268-2. ISO, Genf.

Anlage 3

BESTIMMUNG DES PH-WERTES VON BÖDEN

Die folgende Methode zur Bestimmung des pH-Wertes von Böden beruht auf der Beschreibung in ISO DIS 10390: Bodenbeschaffenheit; Bestimmung des pH-Wertes (1).

Eine gegebene Menge Boden mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur trocknen. Eine Suspension aus (mindestens 5 g) Boden in einer 1-M-Lösung analysenreines Kaliumchlorid (KCl) oder einer 0,01-M-Lösung analysenreines Calciumchlorid (CaCl₂) im Verhältnis 1:5 herstellen. Anschließend die Suspension fünf Minuten kräftig schütteln und dann mindestens 2, aber nicht länger als 24 Stunden ruhen lassen. Der pH-Wert der flüssigen Phase wird mit einem pH-Messgerät gemessen, das vor jeder Messung mit einer geeigneten Reihe an Pufferlösungen (z. B. pH 4,0 und 7,0) kalibriert wurde.

LITERATUR:

- (1) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1994). Bodenbeschaffenheit; Bestimmung des pH-Wertes, Nr. 10390. ISO, Genf.

Anlage 4

ANZUCHT VON *EISENIA FETIDA* /*EISENIA ANDREI*

Die Anzucht sollte vorzugsweise in einer Klimakammer bei einer Temperatur von $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ erfolgen. Bei dieser Temperatur und mit hinreichend Futter sind die Würmer nach 2 bis 3 Monaten geschlechtsreif.

Beide Arten können in vielfältigen tierischen Exkrementen angezogen werden. Als Anzuchtmedium wird eine Mischung aus Pferde- oder Rinderdung und Torf im Verhältnis 50:50 empfohlen. Es muss sichergestellt werden, dass die Rinder oder Pferde, von denen der Dung stammt, nicht mit Arzneimitteln oder Chemikalien wie z. B. wachstumsfördernden Mitteln, Nematiziden oder sonstigen veterinärmedizinischen Produkten behandelt wurden, die die Entwicklung der Würmer während des Versuchs beeinträchtigen könnten. Nach Möglichkeit sollte selbstgesammelter Dung „organischer“ Herkunft verwendet werden, da sich gezeigt hat, dass im Handel als Gartendünger angebotener Dung nachteilige Wirkungen auf die Würmer haben kann. Das Medium sollte einen pH-Wert von etwa 6 bis 7 (eingestellt mit Calciumcarbonat) sowie eine niedrige Ionenleitfähigkeit (weniger als 6 mS/cm oder 0,5 % Salzkonzentration) haben und nicht übermäßig mit Ammonium oder tierischem Urin verunreinigt sein. Das Substrat sollte feucht, jedoch nicht zu nass sein. Zur Anzucht eignen sich Kästen mit einem Fassungsvermögen von 10 bis 50 l.

Zur Gewinnung von Würmern gleichen Alters und gleicher Größe (Masse) ist es am besten, die Kultur mit Kokons zu beginnen. Sobald die Kultur etabliert ist, werden zur Aufrechterhaltung der Kultur adulte Würmer zur weiteren Kokonablage für 14 bis 28 Tage in einen Anzuchtkasten mit frischem Substrat gesetzt. Danach werden die adulten Würmer herausgenommen; die aus den Kokons geschlüpften juvenilen Tiere werden als Grundstamm für die nächste Kultur verwendet. Die Würmer werden kontinuierlich mit tierischen Exkrementen gefüttert und von Zeit zu Zeit in frisches Substrat umgesetzt. Erfahrungsgemäß sind luftgetrockneter und fein gemahlener Rinder- und Pferdedung sowie Haferflocken als Futter geeignet. Es ist sicherzustellen, dass die Rinder oder Pferde, von denen der Dung stammt, nicht mit Chemikalien wie z. B. wachstumsfördernden Mitteln behandelt wurden, die in der Langzeitkultur nachteilige Wirkungen auf die Würmer haben könnten. Die aus den Kokons geschlüpften Würmer werden für den Versuch verwendet, wenn sie ein Alter von 2 bis 12 Monaten erreicht haben und als adult gelten.

Die Würmer können als gesund betrachtet werden, wenn sie sich durch das Substrat bewegen, nicht versuchen, das Substrat zu verlassen und sich regelmäßig vermehren. Das Substrat ist dann erschöpft, wenn die Würmer sich sehr langsam bewegen und das hintere Ende gelblich aussieht. In diesem Fall sollte frisches Substrat bereitgestellt und/oder die Besatzdichte verringert werden.

Anlage 5

VERFAHREN ZUM ZÄHLEN DER AUS DEN KOKONS GESCHLÜPFTEN JUVENILEN WÜRMER

Da die Handverlesung von Würmern aus dem Bodensubstrat sehr zeitaufwendig ist, werden zwei alternative Methoden empfohlen:

(a) Die Prüfbehälter werden in ein Wasserbad mit einer Temperatur von anfänglich 40 °C gesetzt, die danach auf 60 °C erhöht wird. Nach etwa 20 Minuten müssten die juvenilen Würmer an die Bodenoberfläche kommen; von dort können sie leicht abgelesen und gezählt werden.

(b) Der Testboden kann nach der von van Gestel u. a. entwickelten Methode (1) durch ein Sieb gespült werden, sofern der Torf, der Dung oder das Haferflockenmehl, der bzw. das dem Boden hinzugegeben wurde, fein gemahlen wurden. Zwei Siebe mit einer Maschenweite von 0,5 mm (Durchmesser 30 cm) werden aufeinander gesetzt. Der Inhalt eines Prüfbehälters wird mit einem kräftigen Leitungswasserstrahl durch die Siebe gespült, wobei die juvenilen Würmer und die Kokons hauptsächlich auf dem oberen Sieb verbleiben. Die gesamte Oberfläche des oberen Siebs ist während des Siebvorgangs feucht zu halten, damit die juvenilen Würmer auf einem Wasserfilm schwimmen und nicht durch die Maschen des Siebs kriechen. Am besten wird dazu ein Brauseaufsatz verwendet.

Nachdem das gesamte Bodensubstrat durch das Sieb gespült wurde, können die juvenilen Tiere und die Kokons vom oberen Sieb in eine Schale gespült werden. Der Inhalt der Schale wird stehen gelassen, damit leere Kokons zur Wasseroberfläche steigen und volle Kokons und juvenile Würmer auf den Boden sinken können. Danach kann das überstehende Wasser abgegossen werden, und die juvenilen Würmer und die Kokons können in eine Petrischale mit etwas Wasser gesetzt werden. Zur Auszählung können die Würmer mit einer Nadel oder einer Pinzette entnommen werden.

Erfahrungsgemäß ist Methode (a) besser für die Entnahme juveniler Würmer geeignet, die sogar durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 0,5 mm gespült werden können.

Grundsätzlich ist zu ermitteln, welche Methode für die Entnahme der Würmer (sowie ggf. der Kokons) aus dem Bodensubstrat geeignet ist. Wenn juvenile Tiere von Hand abgesammelt werden, sollte der Vorgang bei allen Proben zweimal durchgeführt werden.

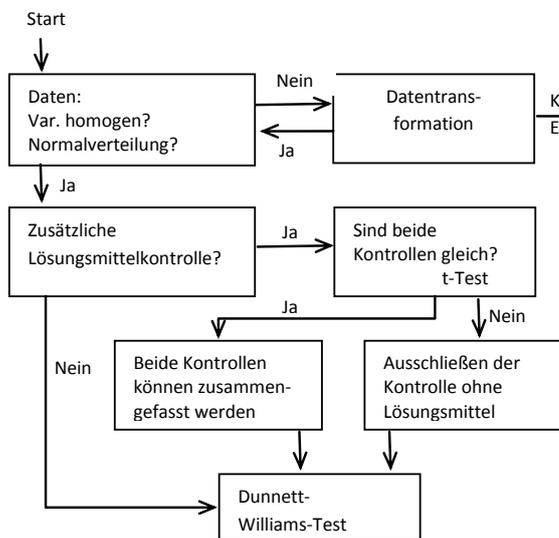
Literatur:

- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.

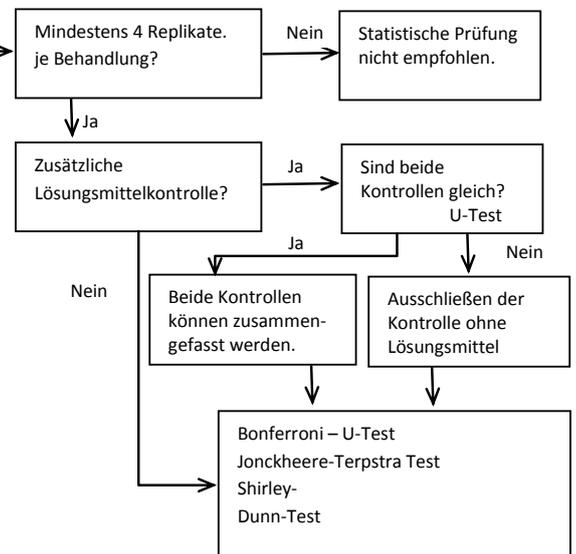
Anlage 6

ÜBERSICHT ÜBER DIE STATISTISCHE AUSWERTUNG DER DATEN (NOEC-BESTIMMUNG)

Parametrische Prüfung



Nicht parametrische Prüfung



C.34. Bestimmung der Hemmwirkung anaerober Bakterien – Hemmung der Gasproduktion von anaerobem Faulschlamm

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 224 (2007). In aquatische Milieu eingeleitete Chemikalien passieren sowohl aerobe als auch anaerobe Zonen, in denen sie abgebaut werden und/oder die Aktivität von Bakterien hemmen können; in bestimmten Fällen können sie über Jahrzehnte oder noch länger ungestört in anaeroben Zonen verbleiben. Bei der Abwasserbehandlung ist die erste Stufe (Vorklärung) in der aufschwimmenden Flüssigkeit aerob und im abgesetzten Schlamm anaerob. Es folgt die zweite Stufe mit einer aeroben Zone im Belebtschlamm-Belüftungsbecken und einer anaeroben Zone im Absetzbecken (Nachklärung). Schlamm aus beiden Stufen wird in der Regel anaerob behandelt; dabei entstehen Methan und Kohlenstoffdioxid, die gewöhnlich zur Stromerzeugung genutzt werden. Was die Umwelt anbelangt, so verbleiben Chemikalien, die Sedimente in Buchten, Ästuarien und im Meer erreichen, wahrscheinlich auf unbestimmte Zeit in diesen anaeroben Zonen, wenn sie nicht biologisch abbaubar sind. Große Teile dieser Chemikalien gelangen hauptsächlich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften (z. B. schlechte Wasserlöslichkeit, starke Adsorption an suspendierte Feststoffe und Unmöglichkeit eines aeroben biologischen Abbaus) in diese Zonen.
2. In die Umwelt eingeleitete Chemikalien sollten zwar sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen abbaubar sein, doch ist es wichtig, dass in beiden Zonen die mikrobielle Aktivität durch diese Chemikalien nicht gehemmt wird. Im Vereinigten Königreich kam es in einigen Fällen zu einer vollständigen Hemmung der Methanproduktion, beispielsweise durch Pentachlorphenol in Industrieabwässern; hier mussten die betreffenden Schlämme aus den Faulbehältern unter hohem Kostenaufwand an „sichere“ Standorte gebracht und es musste gesunder Faulschlamm aus benachbarten Anlagen beschafft werden. Es gab jedoch viele weniger drastische Fälle der Faulhemmung durch andere Chemikalien (wie aliphatische Halogenkohlenwasserstoffe (aus Trockenreinigungen) und Reinigungsmittel), die den Faulungsprozess dennoch erheblich beeinträchtigten).
3. Nur eine Prüfmethode (C.11) (1) befasst sich mit der Hemmung der Bakterienaktivität (Atmung von Belebtschlamm) und bewertet die Wirkung von Prüfchemikalien auf die Sauerstoffzehrung bei Vorhandensein von Substrat. Die Methode wird allgemein angewandt, um möglichst frühzeitig auf die mögliche schädliche Wirkung chemischer Stoffe auf die aerobe Behandlung von Abwässern hinzuweisen und nicht inhibierende Konzentrationen der in den verschiedenen Bioabbaubarkeitstests zu verwendenden Prüfchemikalien aufzeigen. Mit der Prüfmethode C.43 (2) ist es begrenzt möglich, die toxische Wirkung einer Prüfchemikalie auf die Gasproduktion anaeroben Schlamms zu bestimmen, der auf

ein Zehntel seiner normalen Feststoffkonzentration verdünnt wurde, um bei der Bewertung des Zersetzungsprozentsatzes die erforderliche Genauigkeit zu gewährleisten. Da verdünnter Schlamm empfindlicher auf hemmende Chemikalien reagieren könnte, entschied sich die zuständige ISO-Gruppe für die Entwicklung einer Methode mit unverdünntem Schlamm. Mindestens drei Texte wurden geprüft (aus Dänemark, Deutschland und dem Vereinigten Königreich), und schließlich wurden zwei ISO-Normen erarbeitet - eine für unverdünnten Schlamm (ISO 13 641-1) (3) und eine für hundertfach verdünnten Schlamm (ISO 13 641-2) (4), um Schlämme und Sedimente mit geringen Bakterienpopulationen zu repräsentieren. Beide Methoden wurden im Ringtest geprüft (5), wobei Teil 1 als akzeptable Norm bestätigt wurde; bei Teil 2 bestand jedoch Uneinigkeit. Das Vereinigte Königreich war der Auffassung, diese Methode müsse weiter untersucht werden, denn nach Aussagen eines erheblichen Teils der Teilnehmerlabors sei sehr wenig oder keinerlei Gas erzeugt worden, was zum Teil darauf zurückgeführt wurde, dass der Test aufgrund des zu hohen Gasanteils (75 %) nicht empfindlich genug war.

4. In früheren Arbeiten aus dem Vereinigten Königreich (6)(7) wurde ein manometrisches Verfahren beschrieben, bei dem in 500-ml-Gefäßen unverdünnter Faulschlamm (plus roher Klärschlamm als Substrat), verwendet wurde; die Apparatur war sperrig, und der Rohschlamm ging mit einer erheblichen Geruchsbelästigung einher. Später wurde die kompaktere, einfacher zu handhabende Apparatur von Shelton und Tiedje (8) (in der von Battersby und Wilson (9) entwickelten Form) von Wilson et al. (10) erfolgreich angewendet. Kawahara et al. (11) gelang die Laborherstellung weiterer Standardschlämme, die zur Verwendung in Tests auf anaerobe biologische Abbaubarkeit und die Hemmwirkung bestimmter Chemikalien geeignet sind. Außerdem wurde der Rohschlamm als Testsubstrat ersetzt; der Versuch wurde entweder mit anaerobem Schlamm in hundertfacher Verdünnung oder mit Schlämmen, Sedimenten usw. mit niedriger bakterieller Aktivität durchgeführt.
5. Mit dieser Prüfmethode können Daten generiert werden, die für die Prognostizierung der wahrscheinlichen Wirkung einer Prüfchemikalie auf die Gasproduktion in anaeroben Faulbehältern hilfreich sind. Nur Langzeittests, bei denen aktive Faulbehälter genauer simuliert werden, können jedoch Aufschluss darüber geben, ob es zu einer Anpassung der Mikroorganismen an die Prüfchemikalie kommen kann oder ob Chemikalien, bei denen damit zu rechnen ist, dass sie absorbiert und an den Schlamm adsorbiert werden, über einen über die Versuchsdauer hinausgehenden Zeitraum eine toxische Konzentration erreichen können.

PRINZIP DER PRÜFUNG

6. Aliquoten einer Mischung aus anaerobem Faulschlamm (20-40 g/l Gesamtfeststoffgehalt) und einer abbaubaren Substratlösung einzeln und gleichzeitig in verschiedenen Prüfchemikalienkonzentrationen drei Tage lang in verschlossenen Gefäßen inkubieren. Die erzeugte Gasmenge (Methan und

Kohlenstoffdioxid) anhand des Druckanstiegs (Pa) in den Flaschen messen. Die prozentuale Hemmung der Gaserzeugung durch die verschiedenen Prüfchemikalienkonzentrationen anhand der in den jeweiligen Prüf- und Kontrollgefäßen erzeugten Mengen berechnen. Den EC₅₀-Wert und andere Wirkkonzentrationen anhand von Kurven der Hemmungsprozentsätze bezogen auf die verschiedenen Prüfchemikalienkonzentrationen oder (häufiger) ihre Logarithmen berechnen.

ANGABEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

7. Prüfchemikalien sollten im Allgemeinen in der reinsten erhältlichen Form zu verwendet werden; denn Verunreinigungen in bestimmten Chemikalien (z. B. bei Chlorphenolen) können sehr viel toxischer wirken als die Prüfchemikalie als solche. Die Prüfchemikalien sollten jedoch in der Form untersucht werden, in der sie hergestellt/im Handel angeboten werden. Die Verwendung von Fertigprodukten wird in der Regel nicht empfohlen, kann aber bei schlecht löslichen Prüfchemikalien angemessen sein. Folgende Eigenschaften der Prüfchemikalie sollten bekannt sein: Löslichkeit in Wasser und in einigen organischen Lösungsmitteln, Dampfdruck, Adsorptionskoeffizient, Hydrolyse und biologische Abbaubarkeit unter anaeroben Bedingungen.

ANWENDUNGSBEREICH DER METHODE

8. Der Test kann mit wasserlöslichen und nicht wasserlöslichen Chemikalien einschließlich flüchtigen Chemikalien durchgeführt werden. Besondere Sorgfalt ist bei Materialien mit geringer Wasserlöslichkeit (siehe Literaturangabe (12)) und hoher Flüchtigkeit geboten. Es können auch Inokula aus anderen anaeroben Quellen (z. B. Schlämmen, gesättigten Ölen und Sedimenten) verwendet werden. Anaerobe Bakteriensysteme, die zuvor toxischen Chemikalien ausgesetzt waren, können sich so angepasst haben, dass sie auch unter Einwirkung xenobiotischer Chemikalien noch aktiv sind. Inokula aus angepassten Bakteriensystemen können eine höhere Toleranz gegenüber Prüfchemikalien aufweisen als Inokula aus nicht angepassten Systemen.

REFERENZCHEMIKALIEN

9. Zur Verfahrenskontrolle wird eine Referenzchemikalie getestet; dazu werden parallel zu den normalen Testdurchläufen geeignete Gefäße aufgestellt. 3,5-Dichlorphenol hat sich als eine Chemikalie erwiesen, die die anaerobe Gaserzeugung sowie die Sauerstoffzehrung des Belebtschlammes und diverse andere biochemische Reaktionen konsistent hemmt. Es hat sich herausgestellt, dass zwei weitere Chemikalien die Methanerzeugung stärker hemmen als 3,5-Dichlorphenol: Methylen-bis-thiocyanat und Pentachlorphenol. Die mit diesen Chemikalien erzielten Ergebnisse wurden aber noch nicht validiert. Pentachlorphenol wird nicht empfohlen, weil es in reiner Form schwer zu beschaffen ist.

REPRODUZIERBARKEIT VON TESTERGEBNISSEN

10. In einem internationalen Ringtest (5) konnten die 10 beteiligten Labore EC₅₀-Werte der für 3,5-Dichlorphenol und 2-Bromethansulfonsäure nur hinreichend reproduzieren. (Der Bereich für Dichlorphenol lag bei 32-502 mg/l und für Bromethansulfonsäure bei 220-2190 mg/l.)

Zahl der Teilnehmerlabors	mg/l			mg/g Schlamm		
	Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)	Mittelwert	Standardabweichung	VK (%)
10	<u>3,5-Dichlorphenol</u>					
	153	158	103	5	4,6	92
10	<u>2-Bromethansulfonsäure</u>					
	1058	896	85	34	26	76

EC₅₀-Daten aus dem Ringtest – unverdünnter Schlamm

11. Die hohen Koeffizienten der Variation zwischen den Labors spiegeln zu einem großen Teil die unterschiedliche Empfindlichkeit der Schlamm-Mikroorganismen infolge der Präexposition oder einer fehlenden Präexposition gegenüber der Prüfchemikalie oder anderer chemisch verwandter Chemikalien wider. Die Genauigkeit, mit der der EC₅₀-Wert anhand der Schlammkonzentration bestimmt wurde, war kaum besser als der „volumetrische“ Wert (mg/l). Die Variationskoeffizienten (22, 9 und 18 % für EC₅₀ mg/g) der drei Labors, die Angaben zur Genauigkeit ihrer EC₅₀-Werte für 3,5-Dichlorphenol übermittelten, lagen erheblich unter den Mittelwerten der zehn Labors zusammengerechnet. Die jeweiligen Mittelwerte der drei Labors waren 3,1, 3,2 und 2,8 mg/g. Die niedrigeren, annehmbaren Koeffizienten der Variation innerhalb der Labors zeigen im Vergleich zu den erheblich höheren Koeffizienten der Variation zwischen den Labors (9-22 % gegenüber 92 %) erhebliche Unterschiede bei den Eigenschaften der einzelnen Schlämme.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Apparatur

12. Benötigt werden die übliche Laborausrüstung sowie die folgenden Geräte und

Hilfsmittel:

- a) Inkubator – funktionsicher und auf 35 ± 2 °C geregelt;
- b) druckbeständige Prüfgefäße aus Glas in angemessener Nenngröße,¹ jeweils mit gasdicht beschichtetem Septum, belastbar bis zu 2 bar oder 2×10^5 Pa (Beschichtung beispielsweise mit PTFE (Polytetrafluorethen)). Empfohlen werden gläserne Serumflaschen mit einem nominellen Inhalt von 125 ml und einem tatsächlichen Volumen von etwa 160 ml mit Durchstichseptum² und gebördelten Aluminiumringen; es können aber auch Flaschen mit einem Gesamtvolumen von 0,1-1 l verwendet werden;
- c) Präzisionsdruckmesser³ mit Nadelanschluss;
- d) Druckmesser, eingestellt für die Messung und Entlüftung des gesamten erzeugten Gases (Methan und Kohlenstoffdioxid); geeignet ist beispielsweise ein handgeführter Präzisionsdruckmesser mit Spritzenadelanschluss; ein gasdichtes 3-Wege-Ventil erleichtert den Abbau des überschüssigen Drucks (Anlage 1). Das Innenvolumen von Schlauch und Ventil des Druckmessgeräts muss möglichst gering sein, damit Fehler wegen Nichtbeachtung der Volumenvorgaben nicht ins Gewicht fallen;
- e) Isolationsbehälter zum Transportieren des Faulschlammes;
- f) 3-Wege-Druckventile;
- g) Sieb, 1 mm Quadratmaschen;
- h) Behälter zur Aufnahme des Faulschlammes; ein Glas oder eine Flasche aus hochdichtem Polyethylen; Inhalt etwa 5 l, mit Rührer und der Möglichkeit zur Ausleitung von Stickstoffgas (siehe Nummer 13) durch den Kopfraum (*headspace*);
- i) Membranfilter (0,2 µm) zum Sterilisieren des Substrats;
- j) Mikrospritzen zum gasdichten Anschluss des Druckmessgeräts (siehe Nummer

¹ Die empfohlene Größe liegt bei 0,1-1 l.

² Zu empfehlen sind gasdichte Silikon-Septa. Außerdem sollte die Gasdichtheit der Verschlüsse, insbesondere bei Septa aus Butylkautschuk, geprüft werden, denn mehrere im Handel erhältliche Septa sind nicht ausreichend methandicht, und einige Septa bleiben nicht dicht, wenn sie unter Testbedingungen mit einer Nadel durchstochen werden.

- Gasdicht beschichtete Septa werden empfohlen und sind bei flüchtigen Chemikalien unbedingt zu verwenden. (Einige handelsübliche Septa sind verhältnismäßig dünn (weniger als 0,5 cm) und werden undicht, wenn sie mit einer Spritzenadel durchstochen werden.)
- Septa aus Butylkautschuk (etwa 1 cm) werden für nicht flüchtige Prüfchemikalien empfohlen (denn sie bleiben normalerweise auch nach dem Durchstechen gasdicht).
- Vor dem Versuch sind die Septa sorgfältig auf Gasdichtheit nach dem Durchstechen zu prüfen.

³ Der Druckmesser ist nach Herstelleranweisungen zu verwenden und regelmäßig zu kalibrieren. Wird ein Druckmesser der vorgeschriebenen Qualität verwendet (z. B. mit einer Stahlmembran verkapselt), ist eine Kalibrierung im Labor nicht mehr erforderlich. Der Druckmesser sollte allerdings regelmäßig von einem zugelassenen Institut kalibriert werden. Die Genauigkeit der Kalibrierung kann im Labor durch eine punktuelle Messung bei 1×10^5 Pa mit einem Druckmesser mit mechanischer Anzeige geprüft werden. Wenn der betreffende Punkt richtig gemessen wird, bleibt auch die Linearität konstant. Werden sonstige Messgeräte eingesetzt (ohne zertifizierte Herstellerkalibrierung), ist in regelmäßigen Abständen eine Umrechnung über den gesamten Messbereich zu empfehlen (Anlage 2).

- 12(c)) an den Kopfraum in den Flaschen (siehe Nummer 12(b)); auch für die Zugabe nicht löslicher flüssiger Testmaterialien in die Flaschen;
- k) Handschuhkasten (*Glovebox*), optional, aber empfohlen, mit leichtem Stickstoffüberdruck.

Reagenzien

13. Für die Prüfung sind ausschließlich Reagenzien in Analysequalität zu verwenden. Es muss grundsätzlich Stickstoffgas hoher Reinheit mit weniger als 5µl/l Sauerstoff verwendet werden.

Wasser

14. Wenn in einer Prüfungsphase eine Verdünnung vorgenommen werden muss, ist entlüftetes entionisiertes Wasser zu verwenden. Dieses Wasser muss nicht analysiert werden; es ist jedoch sicherzustellen, dass die Entionisierungsvorrichtung regelmäßig gewartet wird. Entionisiertes Wasser wird auch für die Herstellung von Stammlösungen verwendet. Vor der Zugabe des anaeroben Inokulums zu einer Lösung oder zu einer Verdünnung des Prüfmaterials ist sicherzustellen, dass die Lösung bzw. die Verdünnung frei von Sauerstoff ist. Dazu wird eine Stunde vor Zugabe des Inokulums entweder Stickstoffgas durch das Verdünnungswasser (bzw. durch die Verdünnungen) geblasen oder das Verdünnungswasser wird in sauerstofffreier Atmosphäre bis zum Siedepunkt erwärmt, um es dann auf Raumtemperatur abkühlen zu lassen.

Faulschlamm

15. Aktiven Faulschlamm aus einem Faulbehälter einer Kläranlage (oder aus einem Laborfermenter) entnehmen, in der vorwiegend Schlamm aus häuslichen Abwässern behandelt wird. Praktische Informationen zu Schlämmen aus Laborfermentern sind anderen Quellen zu entnehmen (11). Wenn ein adaptiertes Inokulum verwendet werden soll, kann der Faulschlamm auch aus einer Anlage zur Klärung von Industrieabwässern entnommen werden. Zur Entnahme des Schlammes Flaschen mit weitem Hals aus hochdichtem Polyethylen oder ähnlich dehnbarem Material verwenden. Den Schlamm bis zu einer Höhe von etwa 1 cm unter der Oberkante der Flaschen einfüllen; anschließend die Flaschen dicht verschließen, vorzugsweise mit einem Druckventil (Nummer 12(e)), und in isolierte Behälter stellen (Nummer 12(d)), um Temperaturschocks zu minimieren; die Flaschen anschließend bei 35 ± 2 °C inkubieren. Beim Öffnen der Flaschen darauf achten, dass der überschüssige Gasdruck entweder durch vorsichtiges Lösen des Verschlusses oder über das 3-Wege-Druckventil (Nummer 12(e)) entweichen kann. Den Schlamm möglichst innerhalb weniger Stunden nach der Entnahme verwenden; ist dies nicht möglich, kann er bis zu drei Tagen bei 35 ± 2 °C unter einer Stickstoffschicht im Kopfraum aufbewahrt werden. (In dieser Zeit wird die Aktivität der Mikroorganismen normalerweise nicht beeinträchtigt.)

Achtung! – Faulschlamm erzeugt entzündbare Gase, die einen Brand oder eine Explosion auslösen können. Da der Schlamm außerdem potenziell pathogene

Organismen enthält, sind beim Umgang mit Faulschlamm entsprechende Vorsichtsmaßnahmen zu treffen. Aus Sicherheitsgründen dürfen zur Entnahme des Schlammes keine Glasgefäße verwendet werden.

Inokulum

16. Unmittelbar vor der Verwendung den Schlamm vorsichtig umrühren und durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm^2 (Nummer 12(f)) in eine geeignete Flasche passieren (Nummer 12(g)), durch deren Kopfraum ein Stickstoffstrom geführt wird. Für die Messung der Konzentration des gesamten Trockenstoffes (siehe z. B. ISO 11 923 (13) bzw. die entsprechende EU-Norm) eine Probe aufbewahren. Im Allgemeinen wird der Schlamm unverdünnt verwendet. Die Feststoffkonzentration liegt gewöhnlich zwischen 2 und 4 % (w/w). Den pH-Wert des Schlammes prüfen und erforderlichenfalls auf $7 \pm 0,5$ einstellen.

Prüfsubstrat

17. 10 g Nährbouillon (z. B. Oxoid), 10 g Hefeextrakt und 10 g D-Glucose in entionisiertem Wasser lösen und auf 100 ml verdünnen. Die Lösung durch Filtration durch einen $0,2\text{-}\mu\text{m}$ -Membranfilter (Nummer 12(h)) sterilisieren und entweder sofort verwenden oder höchstens einen Tag lang bei 4°C lagern.

Prüfchemikalie

18. Für jede wasserlösliche Prüfchemikalie eine separate Stammlösung, z. B. mit 10 g/l der Chemikalie in sauerstofffreiem Verdünnungswasser, herstellen (Nummer 14). Von dieser Stammlösung geeignete Mengen für die Herstellung der Reaktionsmischungen mit abgestuften Konzentrationen verwenden. Alternativ kann von jeder Stammlösung eine Verdünnungsreihe so hergestellt werden, dass die in die Testflaschen hinzugegebene Menge für alle benötigten Endkonzentrationen gleich ist. Der pH-Wert der Stammlösungen erforderlichenfalls auf $7 \pm 0,2$ einstellen.

19. Bei Prüfchemikalien, die in Wasser nicht hinreichend löslich sind, nach den Anweisungen in ISO 10 634 (12) bzw. der entsprechenden EU-Norm verfahren. Wenn ein organisches Lösungsmittel verwendet werden muss, sind Lösungsmittel wie etwa Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff zu vermeiden, da diese die Methanproduktion erfahrungsgemäß deutlich hemmen. In einem geeigneten flüchtigen Lösungsmittel (z. B. Aceton oder Diethylether) eine Lösung mit einer geeigneten Konzentration einer nicht wasserlöslichen Chemikalie herstellen. In die leeren Testflaschen die benötigten Mengen an Lösungsmittellösung geben (Nummer 12(b)); das Lösungsmittel vor Zugabe des Schlammes verdampfen. Bei anderen Behandlungen gemäß ISO 10 634 (12) bzw. nach der entsprechenden EU-Norm verfahren; dabei ist zu berücksichtigen, dass zur Herstellung von Emulsionen verwendete Tenside die anaerobe Gasproduktion hemmen können. Wenn davon ausgegangen wird, dass das Vorhandensein organischer Lösungsmittel und Emulgatoren Veränderungen hervorrufen könnte, kann die Prüfchemikalie auch als Pulver oder Flüssigkeit direkt in das Prüfgemisch gegeben werden. Flüchtige

Chemikalien und in Wasser nicht lösliche flüssige Prüfchemikalien können mit Mikrospritzen in beimpfte Serumflaschen eingespritzt werden (Nummer 12(i)).

20. Die Prüfchemikalien werden so in den Flaschen hinzugeben, dass sich eine geometrische Konzentrationsreihe ergibt (z. B. 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l and 15,6 mg/l). Wenn der Toxizitätsbereich nicht von sich ähnlich verhaltenden Chemikalien her bekannt ist, zunächst einen Vorversuch mit Konzentrationen von 1000 mg/l, 100 mg/l und 10 mg/l durchführen, um den benötigten Bereich zu ermitteln.

Referenzchemikalie

21. Durch schrittweise Hinzugabe der Mindestmenge von 5 mol/l Natriumhydroxidlösung zu den Feststoffen eine wässrige Lösung mit 3,5-Dichlorphenol (10 g/l) herstellen; dabei die Lösung so lange schütteln, bis sich die Feststoffe aufgelöst haben. Anschließend wird bis zur benötigten Menge sauerstofffreies Verdünnungswasser (Nummer 14) zugeben; der Lösungsvorgang kann durch eine Ultraschallbehandlung unterstützt werden. Sobald der mittlere Bereich der EC₅₀-Werte in mindestens drei Tests mit unterschiedlichen Inokula (unterschiedliche Herkunft oder zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen) bestimmt wurde, können auch andere Referenzchemikalien verwendet werden.

INTERFERENZEN/FEHLER

22. Bei manchen Bestandteilen des Schlamms muss damit gerechnet werden, dass sie mit potenziellen Inhibitoren reagieren, die dann für Mikroorganismen nicht mehr verfügbar sind; die Hemmung wird entsprechend reduziert oder völlig unterbunden. Wenn der Schlamm bereits eine Hemmchemikalie enthält, würde es bei deren Prüfung ebenfalls zu falschen Ergebnissen kommen. Daneben gibt es noch eine Reihe weiterer Faktoren, die Ergebnisse verfälschen können. Diese sind (zusammen mit Methoden zur Vermeidung oder zumindest zur Reduzierung von Fehlern) in Anlage 3 aufgelistet.

PRÜFVERFAHREN

23. Die Zahl der erforderlichen Replikate hängt vom erforderlichen Genauigkeitsgrad der Inhibitionsindizes ab. Sind die Verschlüsse der Flaschen während der gesamten Versuchsdauer gasdicht genug, braucht nur eine Charge (mindestens drei Replikate) Testflaschen pro benötigter Konzentration vorbereitet zu werden. Ebenso wird auch für jede Referenzchemikalie und für jede Kontrollreihe nur jeweils eine Charge Flaschen benötigt. Wenn die Verschlüsse der Flaschen jedoch nach ein- oder mehrmaligem Durchstechen nicht mehr dicht sind, muss für jede Zeitspanne (t), für die Ergebnisse ermittelt werden sollen, und für alle zu prüfenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie eine Charge der Testflaschen (z. B. drei Flaschen) bereitgestellt werden. Gleichermaßen sind „t“-Chargen von Flaschen für die Referenzchemikalie und für die Kontrollen vorzubereiten.

24. Die Verwendung einer *Glove-Box* (Nummer 12(j)) wird empfohlen. Mindestens 30 Minuten vor Beginn des Versuchs wird mit der Einleitung eines Stickstoffstroms durch die die gesamte erforderliche Ausrüstung enthaltende *Glove-Box* begonnen. Beim Handhaben und Verschließen der Flaschen ist sicherzustellen, dass die Temperatur des Schlammes 35 ± 2 °C beträgt.

Vorversuch

25. Wenn über die Aktivität des Schlammes nichts bekannt ist, sollte ein Vorversuch durchgeführt werden. Die Kontrollen beispielsweise mit Feststoffkonzentrationen von 10 g/l, 20 g/l und 40 g/l und mit einem Substrat, jedoch ohne die Prüfchemikalie herstellen. Zudem verschiedene Volumina Reaktionsgemisch verwenden, um drei oder vier verschiedene Kopfraum/Flüssigkeitsvolumen-Verhältnisse zu erhalten. Anhand der Gasvolumina, die in den verschiedenen Zeitintervallen erzeugt werden, die optimalen Bedingungen ermitteln, unter denen zweimal täglich signifikante Gasvolumina und eine Druckentlastung/Tag bei optimaler Empfindlichkeit¹ und ohne Explosionsgefahr gemessen werden können.

Zugabe der Prüfchemikalien

26. Wasserlösliche Prüfchemikalien als wässrige Lösungen (Nummer 18) in leere Testflaschen (Nummer 12(b)) geben. Für jeden Konzentrationsbereich mindestens drei Gruppen von Flaschen verwenden (Nummer 20). Bei nicht oder schlecht löslichen Prüfchemikalien Lösungen der Prüfchemikalie in organischen Lösungsmitteln mit einer Mikrospritze in leere Flaschen injizieren, um Replikate von jeweils fünf Prüfchemikalienkonzentrationen herzustellen. Das Lösungsmittel verdampfen, indem ein Stoß Stickstoffgas über die Oberfläche der Lösungen in die Testflaschen geleitet wird. Alternativ können nicht lösliche feste Chemikalien als abgewogene Feststoffmengen auch direkt in die Testflaschen gegeben werden.
27. Werden keine nicht oder schlecht wasserlöslichen flüssigen Prüfchemikalien mithilfe eines Lösungsmittels hinzugegeben, so sind sie nach Zugabe des Inokulums und des Prüfsubstrats (siehe Nummer 30) mit einer Mikrospritze direkt in die Testflaschen zu injizieren. Flüchtige Prüfchemikalien können auf dieselbe Weise hinzugegeben werden.

Zugabe von Inokulum und Substrat

28. Eine geeignete Menge gesiebten Faulschlammes (siehe Nummer 16) in einer 5-l-Flasche (Nummer 12(g)) rühren; dabei gleichzeitig durch den Kopfraum Stickstoffgas einleiten. Testflaschen mit wässrigen Lösungen oder mit verdampften Lösungsmittellösungen der Prüfchemikalien etwa zwei Minuten mit gasförmigem

¹ Dies gilt für die Versuchsplanung und für die Versuchsbedingungen, wobei die – aus Blindkontrollen und aus Gefäßen mit einer Hemmung von 70-80 % – erzeugten Gasvolumina innerhalb annehmbarer Fehlergrenzen geschätzt werden können.

Stickstoff spülen, um vorhandene Luft zu entfernen. Aliquoten (z. B. 100 ml) des gut durchmischten Schlammes mit einer Pipette mit weiter Öffnung oder mit einem Messzylinder in die Testflaschen geben. Wichtig ist, dass die Pipette in einem einzigen Schritt mit der exakt benötigten Schlammmenge gefüllt wird; die im Schlamm enthaltenen Feststoffe können sich dann leichter absetzen. Wenn eine zu große Menge aufgenommen wird, muss die Pipette entleert und neu befüllt werden.

29. Anschließend so viel Substratlösung (Nummer 17) hinzugeben, dass sich eine Konzentration von jeweils 2 g/l Nährbouillon, Hefeextrakt und D-Glucose in dem Gemisch ergibt; dabei kontinuierlich mit gasförmigem Stickstoff spülen. Die Testchargen könnten z. B. so aussehen:

Endgültige Massekonzentration der Prüfchemikalie in den Prüfgefäßen (mg/l)	Volumen der Prüfchemikalie (ml)		Reagenzien und Medien (ml)		
	Stammlösung a) 10 g/l Nr. 18	Stammlösung b) 1 g/l Nr. 18	Verdünnungswasser Nr. 14	Inokulum Nr. 16	Substrat Nr. 17
0	-	0	1,0	100	2
1	-	0,1	0,9	100	2
3,3	-	0,33	0,67	100	2
10	0,1	-	0,9	100	2
33	0,33	-	0,67	100	2
100	1,0	-	0	100	2

Gesamtinhalt der Flasche = 160 ml, Flüssigkeitsvolumen = 103 ml,
Gasvolumen = 57 ml oder 35,6 % des Gesamtvolumens.

30. Gleichermaßen genügend leere Testflaschen mit gasförmigem Stickstoff ausspülen, um flüchtige und unlösliche flüssige Prüfchemikalien zu entfernen (siehe Nummer 27).

Kontrollen und Referenzchemikalie

31. Mindestens drei Sätze Flaschen, die jeweils nur Schlamm und Substrat enthalten, als Kontrollen bereithalten. Daneben weitere Flaschen mit Schlamm, Substrat und hinreichend Stammlösung der Referenzchemikalie - 3,5-Dichlorphenol (Nummer 21) - als Replikate mit einer Endkonzentration von 150 mg/l vorbereiten. Diese Konzentration müsste die Gasproduktion um etwa 50 % hemmen. Alternativ kann eine Reihe von Konzentrationen der Referenzchemikalie hergestellt werden. Zudem vier zusätzliche Flaschen mit Schlamm, sauerstofffreiem Wasser und Substrat für pH-Messungen bereithalten. Die Prüfchemikalie in der höchsten zu prüfenden Konzentration zwei Flaschen hinzugeben; den beiden übrigen Flaschen sauerstofffreies Wasser zugeben.

32. Es ist sicherzustellen, dass alle Flaschen – die Flaschen mit der Prüfchemikalie und die Kontrollen – dasselbe Flüssigkeitsvolumen (V_R) enthalten; erforderlichenfalls die Flüssigkeit mit sauerstofffreiem entionisiertem Wasser (Nummer 14) auffüllen. Der Kopfraum sollte zwischen 10 % und 40 % des Inhalts der Flaschen betragen; der tatsächliche Wert richtet sich nach den Daten aus dem Vorversuch. Nach Zugabe aller Bestandteile in die Flaschen die Nadel, mit der das Gas injiziert wurde, herausziehen, und die Flaschen mit einem Gummistopfen und einer Aluminiumkappe (Nummer 12(b)) verschließen; den Stopfen mit einem Tropfen entionisiertem Wasser anfeuchten, damit er leichter eingeschoben werden kann. Den Inhalt der einzelnen Flaschen durch Schütteln vermischen.

Inkubation der Flaschen

33. Die Flaschen in einen thermostatierten Inkubator stellen, der möglichst mit einer Schüttelvorrichtung ausgestattet sein sollte; die Temperatur auf 35 ± 2 °C einstellen. Die Flaschen im Dunkeln inkubieren. Nach etwa einer Stunde den Druck in den Flaschen gegenüber dem Atmosphärendruck äquilibrieren. Dazu die mit dem Druckmesser (Nummer 12(c)) verbundene Spritzennadel durch die einzelnen Flaschenverschlüsse stechen und das Ventil so lange öffnen, bis der Druckmesser auf Null steht; danach das Ventil wieder schließen. Die Nadel ist im Winkel von etwa 45° einzuführen, damit kein Gas aus den Flaschen austreten kann. Wenn der Inkubator nicht über eine Schüttelvorrichtung verfügt, müssen die Flaschen während der gesamten Inkubationsdauer zweimal täglich manuell geschüttelt werden, um das System zu äquilibrieren. Die Flaschen inkubieren und umdrehen, damit kein Gas durch das Septum austreten kann. Besteht jedoch die Möglichkeit, dass nicht lösliche Prüfchemikalien am Boden der Flasche anhaften, sollten die Flaschen nicht umgedreht werden.

Druckmessung

34. Wenn die Flaschen eine Temperatur von 35 ± 2 °C erreicht haben, den pH-Wert des Inhalts von zwei der vier für diesen Zweck vorbereiteten Flaschen messen und aufzeichnen; den Flascheninhalt anschließend entsorgen. Die restlichen eibenden Flaschen weiter im Dunkeln inkubieren. Den Druck in den Flaschen in den nächsten 48 bis 72 Stunden zweimal täglich messen; dazu die Nadel des Druckmessers durch den Verschluss der einzelnen Flaschen stechen; zwischen den Messungen die Nadel trocknen. Während der Messung, die möglichst zügig erfolgen sollte, sollte in allen Teilen der Flaschen die Inkubationstemperatur aufrechterhalten werden. Sobald der angezeigte Druck stabil ist, den angezeigten Wert aufzeichnen. Danach das Ventil zur Entlüftung öffnen und wieder schließen, wenn der Druckmesser auf Null steht. Der Versuch wird nach dem Zeitpunkt des ersten Druckausgleichs („Zeit 0“) gewöhnlich für 48 Stunden fortgesetzt. Bei flüchtigen Chemikalien sind nur eine Messung und nur eine Entlüftung (am Ende der Inkubationszeit) bzw. höchstens zwei Messungen und Entlüftungen vorzunehmen, um einen Verlust der Prüfchemikalie zu vermeiden (10).
35. Bei negativer Druckanzeige darf das Ventil nicht geöffnet werden. Manchmal bildet

sich Feuchtigkeit in der Spritzennadel und in der Schlauchleitung, was durch einen geringen Unterdruck angezeigt wird. In diesen Fall die Nadel herausziehen, den Schlauch schütteln, mit einem Papiertuch trocknen und eine neue Nadel aufsetzen.

Messung des pH-Werts

36. Nach der letzten Druckmessung die pH-Werte der Flascheninhalte lesen und aufzeichnen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Angabe der Ergebnisse

37. Für jeden Satz Replikatflaschen Summe und Mittelwert der nach jedem Zeitintervall aufgezeichneten Druckergebnisse bestimmen, und für jedes Replikat nach jedem Zeitintervall den mittleren kumulativen Bruttogasdruck berechnen. Dazu für die Kontrollen, die Flaschen mit den Prüfchemikalien und die Referenzflaschen zeitbezogen Kurven der mittleren kumulativen Gasproduktion (Pa) zeichnen. Auf dem linearen Abschnitt der Kurve einen Zeitpunkt (gewöhnlich 48 Stunden) wählen und für jede Konzentration mit Gleichung [1] den Hemmungsprozentsatz (I) bestimmen:

$$I = (1 - P_t/P_c) \times 100 \quad [1],$$

Dabei sind:

I = Hemmung in Prozent (%);

P_t = mit dem Prüfmaterial zum gewählten Zeitpunkt erzeugter Gasdruck in Pascal (Pa);

P_c = zum selben Zeitpunkt in der Kontrolle erzeugter Gasdruck in Pascal (Pa).

Nach Möglichkeit sollten zur Bestimmung von I zwei Kurven gezeichnet werden, d. h. eine Kurve bezogen auf die Konzentration und eine bezogen auf den Logarithmus der Konzentration, um die Kurve mit der besseren Linearität wählen zu können. Den EC_{50} -Wert (mg/l) visuell oder durch Regressionsanalyse anhand der Kurve mit der besseren Linearität bestimmen. Zu Vergleichszwecken kann es hilfreich sein, die Konzentration der Chemikalie in mg Chemikalie/g der gesamten Trockenfeststoffe auszudrücken. Um diese Konzentration zu erhalten, die Volumenkonzentration (mg/l) durch die Volumenkonzentration der trockenen Feststoffe des Schlamms (g/l) (Nummer 16) dividieren.

38. Berechnet wird entweder die durch die Konzentration der Referenzchemikalie bewirkte prozentuale Hemmung (wenn nur eine Konzentration verwendet wurde) oder der EC_{50} -Wert (wenn eine hinreichende Anzahl an Konzentrationen untersucht wurde).

39. Den mittleren Druck des in der Kontrolle erzeugten Gases P_c (Pa) bezogen auf die

Kalibrierkurve des Druckmessers (Anlage 2) in Volumen umrechnen; aus dem erhaltenen Wert sodann die Gasproduktion berechnen, ausgedrückt als innerhalb von 48 Stunden aus 100 ml unverdünntem Schlamm mit einer Feststoffkonzentration von 2 % (20 g/l) bis 4 % (40 g/l) erzeugtes Volumen.

Validitätskriterien

40. Die Ergebnisse des ISO-Interlabortests (5) haben gezeigt, dass die Referenzchemikalie (3,5-Dichlorphenol) bei Konzentrationen von 32 mg/l bis 510 mg/l (Mittelwert 153 mg/l) die Gasproduktion um 50 % hemmt (Nummer 10). Diese Konzentrationsspanne ist so breit, dass keine genauen Hemmgrenzen als zuverlässige Validitätskriterien festgesetzt werden können; dies sollte jedoch möglich sein, sobald Verfahren für die Herstellung einheitlicherer Inokula entwickelt wurden. Die in Kontrollflaschen innerhalb von 48 Stunden erzeugten Gasvolumina reichten von 21 ml/g Schlammfeststoff bis zu 149 ml/g (Mittelwert 72 ml/g). Ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen dem erzeugten Gasvolumen und dem entsprechenden EC₅₀-Wert bestand nicht. Der endgültige pH-Wert lag zwischen 6,1 und 7,5.
41. Der Test wird als gültig betrachtet, wenn es in der Referenzkontrolle mit 150 mg/l 3,5-Dichlorphenol zu einer Hemmung von über 20 % kommt, in der Blindkontrolle mehr als 50 ml Gas pro g Trockenmasse produziert werden und der pH-Wert bei Testende im Bereich 6,2-7,5 liegt.

Prüfbericht

42. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfchemikalie

- Common Name, chemische Bezeichnung, CAS-Nummer, Strukturformel und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Reinheit (Verunreinigungen) der Prüfchemikalie.

Prüfbedingungen

- Volumina der flüssigen Bestandteile und des Kopfraums in den Prüfgefäßen;
- Beschreibungen der Prüfgefäße und der Gasmessung (z. B. Druckmessertyp);
- Einbringung der Prüfchemikalie und der Referenzchemikalie in das Testsystem, verwendete Testkonzentrationen und Verwendung von Lösungsmitteln;
- nähere Angaben zum verwendeten Inokulum: Name der Kläranlage, Beschreibung der Herkunft (Bezugsquelle) des behandelten Abwassers (z. B. Betriebstemperatur, Rückhaltezeit des Schlammes, vorwiegend häusliche oder vorwiegend industrielle Abwässer usw.), Konzentration der Feststoffe, Gasproduktion im anaeroben Faulbehälter, vorherige Exposition oder vielleicht bereits erfolgte Anpassung an toxische Chemikalien, Ort der Entnahme des Schlammes, Sediments usw.;
- Inkubationstemperatur und Temperaturspanne;
- Zahl der Replikate.

Ergebnisse

- pH-Werte bei Versuchsende;
- alle gemessenen Daten aus den Prüf-, Kontroll- und Referenzgefäßen (z. B. in Pa oder in Millibar) in tabellarischer Form;
- prozentuale Hemmung in den Test- und Referenzflaschen und Kurvendarstellung der Hemmkonzentrationen;
- Berechnung der EC₅₀-Werte, ausgedrückt in mg/l und mg/g;
- Gasproduktion pro g Schlamm innerhalb von 48 Stunden;
- Angabe von Gründen, falls die Prüfergebnisse verworfen werden;
- Diskussion der Ergebnisse einschließlich sämtlicher Abweichungen von den Verfahren im Rahmen dieser Prüfmethode sowie Diskussion aller durch Interferenzen und Fehler bedingten Abweichungen der Testergebnisse von den erwarteten Ergebnissen;
- Angabe, ob mit dem Test die Toxizität präexponierter oder nicht präexponierter Mikroorganismen gemessen werden sollte.

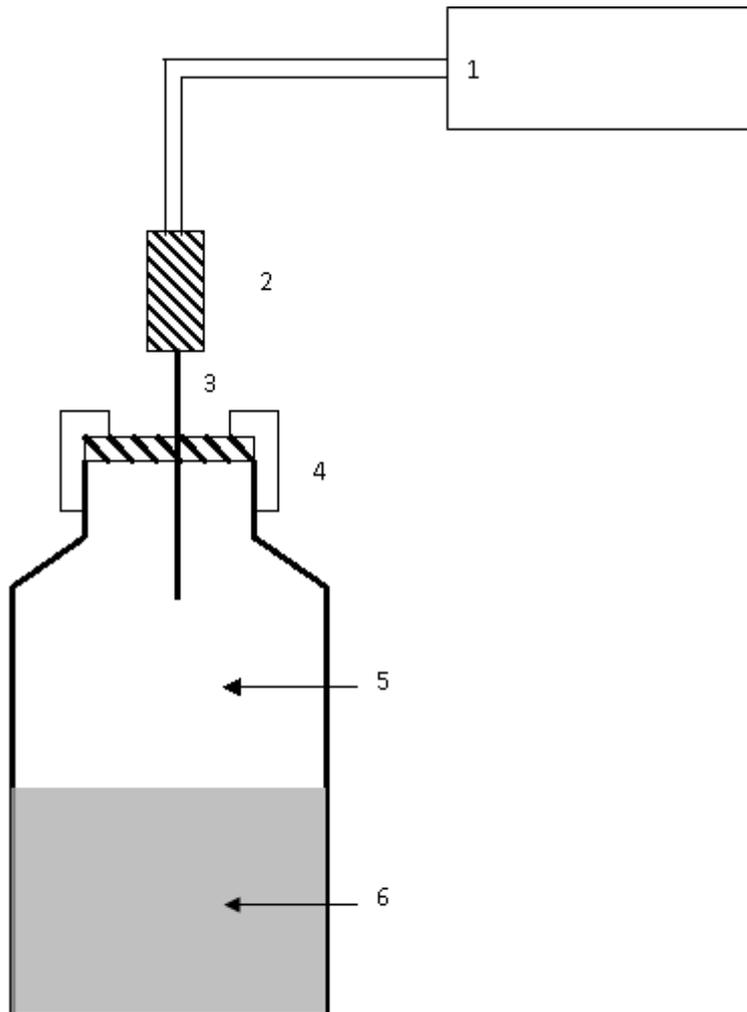
LITERATUR

- (1) Kapitel C.11 dieses Anhangs: Belebtschlamm, Prüfung der Atmungshemmung.
- (2) Kapitel C.43 dieses Anhangs: Anaerobe biologische Abbaubarkeit organischer Verbindungen in Klärschlamm: durch Messung der Gaserzeugung.
- (3) Internationale Organisation für Normung (2003) ISO 13 641-1 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmwirkung der Gasproduktion auf anaerobe Bakterien – Teil 1: Allgemeiner Test [EN]
- (4) Internationale Organisation für Normung (2003) ISO 13 641-2 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmwirkung der Gasproduktion auf anaerobe Bakterien – Teil 2: Untersuchung bei niedrigen Biomassekonzentrationen. [EN]
- (5) ISO (2000) Ring test of ISO 13 641-1 and ISO 13 641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.
- (6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. *Wat. Pollut. Control*, 70, 58-70.
- (7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, In: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.
- (8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *Appl. Env. Microbiol.* 47 850-857.
- (9) Battersby NS., und Wilson, V. (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. *Chemosphere* 17, 2441-2460.
- (10) Wilson V., Painter, HA., und Battersby, NS. (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. *Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods*, GSF Forschungszentrum, Neuherberg, Deutschland (1990). Verlag: Steinberg, C., und Kettrup, A, S. 117-132 (1992).

- (11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, und Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere*, 39 (12), 2007-2018.
- (12) Internationale Organisation für Normung (1995) ISO 10634, Wasserbeschaffenheit – Anleitung für die Vorbereitung und Behandlung von in Wasser schwer löslichen organischen Verbindungen für die nachfolgende Bestimmung ihrer biologischen Abbaubarkeit in einem wässrigen Medium,
- (13) Internationale Organisation für Normung (1997) ISO 11 923 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Schwebstoffe mittels Filtration durch ein Glasfaserfilter.

Anlage 1

MUSTER EINER APPARATUR ZUR MESSUNG DER BIOGASPRODUKTION ANHAND DES GASDRUCKS



Legende:

- 1 - Druckmesser
- 2 - Gasdichtes 3-Wege-Ventil
- 3 - Spritzennadel
- 4 - Gasdichter Verschluss (gebördelte Kappe und Septum)
- 5 - Kopfraum
- 6 - Faulschlamm-Inokulum

Prüfgefäße in einem Temperaturumfeld von $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

Anlage 2

UMRECHNUNG DER DRUCKMESSWERTE

Die Messwerte des Druckmessers können mithilfe einer Standardkurve zu Gasvolumen in Bezug gesetzt werden; anhand dieser Kurve lässt sich das Volumen des innerhalb von 48 Stunden pro Gramm Trockenschlamm erzeugten Gases berechnen. Dieser Aktivitätsindex wird als eines der Kriterien für die Validitätsbewertung der Testergebnisse verwendet. Die Kalibrierkurve wird erstellt, indem bekannte Gasvolumina bei $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ in Serumflaschen mit einer Wassermenge entsprechend dem Volumen des Reaktionsgemischs V_R injiziert werden:

- Auf $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ temperierte Wasseraliquoten mit einem Volumen von V_R ml in fünf Serumflaschen geben. Die Flaschen verschließen und 1 Stunde zum Äquilibrieren in ein Wasserbad mit einer Temperatur von $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ stellen;
- den Druckmesser einschalten; nach Stabilisierung der Anzeige das Gerät auf Null stellen;
- die Spritzennadel durch den Verschluss einer der Flaschen stechen und das Ventil öffnen. Wenn der Druckmesser den Wert Null anzeigt, das Ventil wieder schließen;
- dieses Verfahren mit den übrigen Flaschen wiederholen;
- in jede Flasche 1 ml Luft einer Temperatur von $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ injizieren. Die Nadel (am Druckmesser) durch den Verschluss einer Flasche stechen; danach abwarten, bis sich die Druckanzeige stabilisiert hat. Nach Aufzeichnung des Druckwertes das Ventil so lange öffnen, bis die Anzeige wieder auf Null steht. Danach das Ventil schließen;
- dieses Verfahren mit den übrigen Flaschen wiederholen;
- anschließend das gesamte Verfahren mit 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml und 50 ml Luft wiederholen;
- die Konversionskurve der Drucks (Pa) bezogen auf das injizierte Gasvolumen (ml) zeichnen. Das Messgerät reagiert im Bereich von 0-70 000 Pa und bei einer Gasproduktion von 0-50 ml linear.

Anlage 3

BEKANNTE FAKTOREN, DIE ERGEBNISSE VERFÄLSCHEN KÖNNEN

a) Qualität der Flaschenverschlüsse

Für die Serumflaschen sind im Handel verschiedene Septa erhältlich. Viele Septa (u. a. aus Butylkautschuk) sind nicht mehr dicht, wenn sie unter den Bedingungen dieses Versuchs mit einer Nadel durchstochen wurden. Manchmal fällt der Druck nach dem Durchstechen sehr langsam ab. Um Dichtheitsproblemen vorzubeugen, wird die Verwendung gasdichter Septa empfohlen (Nummer 12(b)).

b) Feuchtigkeit in der Spritzennadel

Manchmal bildet sich Feuchtigkeit in Spritzennadel und Schlauchleitung, was sich durch einen geringen Unterdruck manifestiert. Um das Problem zu beheben, die Nadel herausziehen und die Schlauchleitung schütteln, mit Zellstoffpapier abtrocknen und eine neue Nadel aufsetzen (Nummern 12(c) und 35).

c) Verunreinigung durch Sauerstoff

Die Ergebnisse anaerober Methoden können durch Kontamination mit Sauerstoff verfälscht werden, wodurch die Gasproduktion beeinträchtigt werden kann. Bei dieser Methode sollte dieses Risiko durch Anwendung strikt anaerober Verfahren (u. a. unter Verwendung einer *Glove-Box*) minimiert werden.

d) Grobe Substratpartikel im Schlamm

Die anaerobe Gasproduktion und die Empfindlichkeit des Schlamms werden durch Substrate beeinflusst, die mit dem Inokulum in die Testflaschen gelangen können. Faulschlamm aus anaeroben Faultürmen zur Behandlung häuslicher Abwässer enthält oft noch erkennbare Partikel (wie Haare und Zelluloserückstände), die die Entnahme repräsentativer Proben erschweren. Durch Sieben des Schlamms können größere nicht lösliche Bestandteile abgetrennt werden; auf diese Weise wird die Repräsentativität der Proben verbessert (Nummer 16).

e) Flüchtige Prüfchemikalien

Flüchtige Prüfchemikalien werden in den Kopfraum der Testflaschen freigesetzt. Dadurch können beim Entlüften nach den Druckmessungen geringe Anteile des Prüfmaterials verloren gehen, was zu falsch hohen EC_{50} -Werte führt. Durch Wahl eines geeigneten Kopfraum-/Flüssigkeitsvolumen-Verhältnisses und durch Verzicht auf die Entlüftung nach den Druckmessungen kann dieser Fehler auf ein Mindestmaß begrenzt werden (10).

f) Nichtlinearität der Gasproduktion

Ist die Kurve der mittleren kumulativen Gasproduktion bezogen auf die Inkubationszeit über den Zeitraum von 48 Stunden nicht mehr oder weniger linear, so kann dies die Genauigkeit der Prüfung beeinträchtigen. Um dies zu vermeiden, empfiehlt es sich unter Umständen, Faulschlamm anderer Herkunft zu verwenden und/oder die Lösung aus Testsubstrat/Nährbouillon, Hefeextrakt und Glucose (Nummer 29) in höherer Konzentration zu verwenden.

Anlage 4

ANWENDUNG AUF UMWELTPROBEN MIT NIEDRIGER BIOMASSEKONZENTRATION – ANAEROBE SCHLÄMME, SEDIMENTE USW.

Einleitung

- A.1 Im Allgemeinen ist die spezifische mikrobielle Aktivität (erzeugtes Gasvolumen pro g trockener Feststoffe) in natürlich vorkommenden anaeroben Schlämmen, Sedimenten, Böden usw. deutlich geringer als bei anaeroben Schlämmen aus Abwässern. Wenn die Hemmwirkung von Chemikalien bei diesen weniger aktiven Proben gemessen werden soll, müssen daher einige Versuchsparameter modifiziert werden. Bei diesen weniger aktiven Proben kommen zwei allgemeine Vorgehensweisen in Betracht:
- a) Um eine genauere Simulation (siehe ISO 13 641, Teil 1) zu ermöglichen, einen modifizierten Vorversuch (Nummer 25) mit der unverdünnten Probe Schlamm, Boden usw. bei 35 ± 2 °C bzw. der am Ort der Probenahme vorherrschenden Temperatur durchführen;
 - b) oder die Prüfung mit einem (im Verhältnis 1:100) verdünnten Faulschlamm durchführen, um die von der Umweltprobe erwartete geringere Aktivität zu simulieren; dabei allerdings die Temperatur von 35 ± 2 °C beibehalten (siehe ISO 13 641, Teil 2).
- A.2 Option a) kann nach der hier beschriebenen Methode (wie ISO 13 641, Teil 1) durchgeführt werden; entscheidend ist jedoch, dass im Vorversuch (Nummer 25) optimale Bedingungen bestimmt werden (wenn diese nicht bereits aus früheren Versuchen bekannt sind). Die Schlamm- oder die Sedimentprobe gründlich mischen (z. B. in einem Mischer) und gegebenenfalls mit einer kleinen Menge entlüfteten Verdünnungswassers (Nummer 14) so verdünnen, dass sie flüssig genug ist, um von einer Pipette mit großer Öffnung oder von einem Messzylinder aufgenommen zu werden. Ist davon auszugehen, dass Nährstoffe fehlen, kann die Schlammprobe (unter anaeroben Bedingungen) zentrifugiert und in dem mit dem Hefeextrakt versetzten mineralischen Medium (A.11) neu suspendiert werden.
- A.3 Option b): Dieses Vorgehen gewährleistet eine ausreichende Simulation der schwach aktiven Umweltproben; allerdings fehlt bei diesen Proben die hohe Konzentration an suspendierten Feststoffen. Die Bedeutung dieser Feststoffe im Hinblick auf eine Hemmwirkung ist nicht bekannt; die Reaktion zwischen den Prüfchemikalien und den Schlammbestandteilen sowie die Adsorption der Prüfchemikalien an die Feststoffe könnte jedoch die Toxizität der Prüfchemikalie verringern.
- A.4 Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Temperatur: Im Interesse einer genauen Simulation sollten die Tests bei der am Ort der Probenahme vorherrschenden Temperatur durchgeführt werden, da andere Gruppen methanproduzierender Bakterienkonsortien bekanntermaßen innerhalb anderer Temperaturbereiche aktiv sind; so z. B. thermophile Bakterien bei $\sim 30\text{-}35$ °C, mesophile Bakterien bei $20\text{-}25$ °C und psychrophile Bakterien

bei <20 °C; entsprechend können sich unterschiedliche Hemmwirkungen ergeben.

- A.5 Dauer: Bei Teil 1 der allgemeinen Prüfung (mit unverdünntem Schlamm) wurde in den vorgesehenen 2-4 Tagen stets genügend Gas produziert; bei Teil 2 (mit hundertfach verdünntem Schlamm) war die Gasproduktion im Ringtest (soweit überhaupt Gas produziert wurde) nicht ausreichend. Madsen et. al. (1996) erklären in ihrer Beschreibung des letztgenannten Tests, dass mindestens 7 Tage vorgesehen werden sollten.

Testung mit niedriger Biomassekonzentration (Option b)

Es sollten folgende Änderungen und Ergänzungen vorgenommen werden, d. h. einige Absätze und Unterabsätze des Haupttexts sind zu ergänzen bzw. zu ersetzen.

- A.6 Unter Nummer 6 ist der folgende Absatz anzufügen: Testprinzip:

„Dieses Verfahren kann bei hundertfach verdünntem anaerobem Schlamm angewendet werden, u. a., um die geringe Aktivität von Schlämmen und Sedimenten zu simulieren. Die Inkubation erfolgt entweder bei 35 °C oder bei der am Probenahmeort vorherrschenden Temperatur. Da die bakterielle Aktivität erheblich geringer ist als bei unverdünntem Schlamm, sollte die Inkubationsdauer auf mindestens 7 Tage verlängert werden.“

- A.7 Unter Nummer 12 Buchstabe a ist folgender Satz anzufügen:

„Der Inkubator sollte auch bei Temperaturen von 15 °C noch betrieben werden können.“

- A.8 Nummer 13 ist um ein weiteres Reagenz zu ergänzen:

„Phosphorsäure (H₃PO₄), 85 Masse-% in Wasser.“

- A.9 Am Ende von Nummer 16 ist folgender Satz anzufügen:

„Für diesen Test ist eine Endkonzentration von $0,20 \pm 0,05$ g/l Gesamttrockenfeststoffe insgesamt zu verwenden.“

- A.10 Nummer 17. Prüfsubstrat

Dieses Substrat darf nicht verwendet werden; es ist durch Hefextrakt zu ersetzen (siehe Nummern 17, A.11, A.12, A.13).

- A.11 Zur Verdünnung des anaeroben Schlammes muss ein mineralisches Medium mit Spurenelementen verwendet werden; der Einfachheit halber wird das organische Substrat (Hefeextrakt) diesem Medium hinzugegeben.

Nach Nummer 17 ist folgender Text anzufügen:

„a) Mineralisches Prüfmedium, mit Hefeextrakt

Die Herstellung erfolgt aus 10-fach konzentriertem Prüfmedium (Nummer 17 Buchstabe b; A.12) mit gelösten Spurenelementen (Nummer 17 (c), A.13). Dazu ist Natriumsulfid-Nonahydrat (Nummer 17 Buchstabe b; A.12) verwenden, das entweder frisch bezogen oder vor der Verwendung gewaschen und getrocknet wurde, um eine hinreichende Reduzierwirkung zu gewährleisten. Wenn der Test nicht mit einer *Glove-Box* (Nummer 12 (j)) durchgeführt wird, sollte die Konzentration des Natriumsulfids in der Stammlösung (von 1 g/l) auf 2 g/l erhöht werden. Natriumsulfid kann auch bis zu einer Endkonzentration von 0,2 g/l aus einer geeigneten Stammlösung durch das Septum der verschlossenen Testflaschen injiziert werden, weil dadurch das Oxidationsrisiko reduziert wird. Alternativ kann Titan-(III)-citrat (Nummer 17 (b)) verwendet werden. Die Chemikalie bis zu einer Konzentration von 0,8-1,0 mmol/l durch das Septum der verschlossenen Testflaschen injizieren. Titan-(III)-citrat ist ein hochwirksames Reduziermittel mit geringer Toxizität, das wie folgt hergestellt wird: 2,94 g Trinatriumcitrat-Dihydrat in 50 ml sauerstofffreiem Verdünnungswasser (Nummer 14) lösen (bis zu einer Konzentration von 200 mmol/l); danach 5 ml einer Titan-(III)-chlorid-Lösung (15 g/100 l Verdünnungswasser) hinzugeben. Den pH-Wert mit Natriumcarbonat bei $7 \pm 0,5$ stabilisieren und die Lösung unter einem Stickstoff-Gasstrom in eine geeignete Serumflasche geben. Die Konzentration des Titan-(III)-citrats in dieser Stammlösung beträgt 164 mmol/l. Das Prüfmedium entweder umgehend verwenden oder höchstens einen Tag lang bei einer Temperatur von 4 °C lagern.

A.12 b) 10-fach konzentriertes Prüfmedium, hergestellt aus:

wasserfreiem Kalium-dihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	2,7 g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	4,4 g
(oder 11,2 g Dodecahydrat)	
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	5,3 g
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,75 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
Eisen(II)-Chloridtetrahydrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,2 g
Resazurin (Redoxindikator)	0,01 g
Natriumsulfid-Nonahydrat ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
(oder Titan-(III)-citrat) Endkonzentration	0,8 mmol/l bis 1,0 mmol/l
Spurenelementlösung (siehe Nummer 17 (c); A.13)	10,0 ml
Hefeextrakt	100 g

In Verdünnungswasser lösen (Nummer 14) und auf 1000 ml auffüllen.

A.13 c) Spurenelementlösung, hergestellt aus:

Mangan-(II)-chlorid-Tetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Orthoborsäure (H_3BO_3)	0,05 g
Zinkchlorid (ZnCl_2)	0,05 g
Kupfer-(II)-chlorid (CuCl_2)	0,03 g
Natriummolybdat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,01 g
Kobalt-(II)-chlorid-Hexahydrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g
Nickel-(II)-chlorid-Hexahydrat ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,1 g
Dinatriumselenit (Na_2SeO_3)	0,05 g

In Verdünnungswasser lösen (Nummer 14) und auf 1000 ml auffüllen.“

A.14 Nummer 25: Vorversuch

Ein Vorversuch, wie unter Nummer 24 beschrieben, ist unerlässlich; allerdings sollte die Feststoffkonzentration des Schlammes ein Hundertstel der dort genannten Konzentration betragen (d. h. 0,1g/l, 0,2g/l und 0,4g/l). Die Inkubation sollte mindestens 7 Tage dauern.

HINWEIS: Im Ringtest (5) war das Volumen des Kopfraums mit 75 % des Gesamtvolumens erheblich zu groß; es sollte im empfohlenen Bereich von 10 bis 40 % liegen. Das Volumen des produzierten Gases bei einer Hemmung von etwa 80 % muss mit annehmbarer Genauigkeit (z. B. ± 5 bis ± 10 %) gemessen werden können.

A.15 Nummern 26 bis 30: Zugabe der Prüfchemikalie, des Inokulums und des Substrats

Die Zugabe erfolgt wie unter den genannten Nummern beschrieben; die Substratlösung (Nummer 17) wird jedoch durch das Prüfmedium mit dem Hefeextrakt-Substrat ersetzt (A.11).

Außerdem wird die Endkonzentration der trockenen Schlammfeststoffe von 2-4 g/l auf $0,2 \pm 0,05$ g/l (A.9) reduziert. Tabelle A.1 enthält zwei Beispiele für die Zugabe von Bestandteilen zum Prüfgemisch; diese Tabelle ersetzt die Tabelle unter Nummer 29.

A.16 Nummer 33: Inkubation der Flaschen

Da eine geringere Gasproduktion zu erwarten ist, die Inkubationsdauer auf mindestens 7 Tage verlängern.

A.17 Nummer 34: Druckmessungen

Die Messung des Drucks im Kopfraum der Flaschen erfolgt nach dem unter Nummer 34 beschriebenen Verfahren, wenn die Mengenwerte für die gasförmige Phase benötigt werden. Sollen die CO₂- plus CH₄-Gesamt mengen gemessen werden, den pH-Wert der flüssigen Phase auf etwa pH 2 reduzieren, indem H₃PO₄ in die jeweiligen Flaschen injiziert wird; anschließend nach 30-minütigem Schütteln bei Testtemperatur der Druck messen. Weitere Daten zur Qualität des Inokulums können erhoben werden, indem der Druck in den einzelnen Flaschen vor und nach der Reduzierung des pH-Werts gemessen wird. Wenn die CO₂-Produktionsrate beispielsweise erheblich über der Methan-Produktionsrate liegt, verändert dies möglicherweise die Empfindlichkeit der fermentativen Bakterien und/oder die Prüfchemikalie wirkt vor allem auf methanogene Bakterien.

A.18 Nummer 36: Messung des pH-Werts

Wenn H₃PO₄ verwendet werden soll, speziell für die pH-Messungen einige zusätzliche Flaschen ohne H₃PO₄ vorbereiten.

Literatur: Madsen, T, Rasmussen, H.B., und Nilsson, L. (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Dänische Umweltagentur, Kopenhagen.

Tabelle A.1. Versuchspläne für Testchargen - Beispiele

Bestandteile des Reaktionsgemischs	Beispiel 1	Beispiel 2	Normale Reihenfolge der Zugabe
Konzentration des präparierten Inokulums (g/l)	0,42	2,1	-
Volumen des zugegebenen Inokulums (ml)	45	9	4
Konzentration des Inokulums in den Testflaschen (g/l)	0,20	0,20	-
Volumen des zugegebenen Prüfmediums (ml)	9	9	2
Volumen des zugegebenen Verdünnungswassers (ml)	36	72	3
Konzentration des Hefeextrakts in den zu Testflaschen (g/l)	9,7	9,7	-
Volumen der Stammlösung mit der	3	3	1
	93	93	-

Prüfchemikalie (ml)			
Gesamtflüssigkeitsvolumen (ml)			

Anlage 5

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Für diese Prüfmethode gelten die folgenden Definitionen:

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch.

Prüfchemikalie: ein beliebiger Stoff oder ein beliebiges Gemisch, der bzw. das nach dieser Methode geprüft wird.

C.35 Sediment-Wasser-Toxizitätsstudie mit dotiertem Sediment an *Lumbriculus*

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 225 (2007). Sedimentfressende endobenthische Tiere werden durch in Sedimenten gebundene Chemikalien potenziell stark belastet und verdienen folglich besonderes Augenmerk (z. B. (1)(2)(3)). Unter diesen Sedimentfressern nehmen aquatische Oligochaeten in den Sedimenten aquatischer Systeme einen bedeutenden Platz ein. Durch Bioturbation der Sedimente und als Beutetiere haben diese Tiere erheblichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit sedimentgebundener Chemikalien für andere Organismen (z. B. benthivore Fische). Im Gegensatz zu epibenthischen Organismen graben sich endobenthische aquatische Oligochaeten (z. B. *Lumbriculus variegatus*) in die Sedimente ein und nehmen Partikel unterhalb der Sedimentoberfläche auf. Dies gewährleistet, dass die Testorganismen der Prüfchemikalie über alle möglichen Aufnahmewege ausgesetzt werden (z. B. Kontakt mit kontaminierten Sedimentpartikeln und Verschlucken dieser Partikel, aber auch Aufnahme über Poren- und Überstandswasser).
2. Diese Prüfmethode wurde zur Bewertung der Wirkung einer längerfristigen Exposition des endobenthischen Oligochaeten *Lumbriculus variegatus* (Müller) gegenüber sedimentgebundenen Chemikalien entwickelt. Sie beruht auf bereits bestehenden Testprotokollen für Sedimenttoxizität und Bioakkumulation (z. B. (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)). Die Methode wird für statische Prüfbedingungen beschrieben. Bei dem für diese Prüfmethode verwendeten Expositionsszenario wird das Sediment mit der Prüfchemikalie dotiert. Mit dotierten Sedimenten soll ein mit der Prüfchemikalie kontaminiertes Sediment simuliert werden.
3. In der Regel sind auf Toxizität bei sedimentbewohnenden Organismen zu prüfende Chemikalien in diesem Kompartiment über lange Zeit persistent vorhanden. Sedimentbewohner können über verschiedene Pfade exponiert werden. Die relative Bedeutung der einzelnen Expositionspfade und die Geschwindigkeit, mit der diese die toxischen Gesamtwirkungen beeinflussen, hängen von den physikalisch-chemischen Eigenschaften des betreffenden Stoffes und seinem Verhalten im tierischen Organismus ab. Für stark adsorbierende Chemikalien (z. B. $\log K_{ow} > 5$) oder für kovalent an das Sediment gebundene Chemikalien kann die Aufnahme von Schadstoffen über die Nahrung ein wichtiger Expositionspfad sein. Um die Toxizität dieser Chemikalien nicht unterzubewerten, wird das für die Vermehrung und das Wachstum der Testorganismen erforderliche Futter dem Sediment zugegeben, bevor es mit der Prüfchemikalie dotiert wird (11). Die beschriebene Prüfmethode ist detailliert genug, um die Prüfung durchführen und den Versuchsplan je nach Bedingungen in den einzelnen Labors und den unterschiedlichen Eigenschaften der Prüfchemikalien anpassen zu können.
4. Die Prüfmethode dient der Ermittlung der Wirkungen einer Prüfchemikalie auf die

Reproduktionsleistung und die Biomasse der Testorganismen. Als biologische Parameter werden die Gesamtzahl der überlebenden Würmer und die Biomasse (Trockenmasse) am Ende der Expositionsdauer gemessen. Diese Daten werden entweder anhand eines Regressionsmodells zur Ermittlung der Konzentration analysiert, bei der eine Wirkung von x % auftreten würde (z. B. EC₅₀, EC₂₅ und EC₁₀), oder es wird eine statistische Hypothesenprüfung vorgenommen, um die höchste messbare Expositionskonzentration ohne statistisch signifikante Wirkung (NOEC-Wert) und die niedrigste messbare Konzentration, bei der noch statistisch signifikante Wirkungen beobachtet werden (LOEC-Wert), zu bestimmen.

5. Kapitel C.27 dieses Anhangs („Sediment-Wasser-Toxizitätstest mit gespiktem Sediment an Chironomiden“ (6)) enthält viele wichtige und nützliche Informationen zur Durchführung der vorliegenden Sedimenttoxizitätsstudie. Dieses Dokument dient daher als Grundlage für die zur Durchführung von Toxizitätstests an Sedimenten mit *Lumbriculus variegatus* erforderlichen Modifikationen. Weitere Referenzdokumente sind z. B. der *ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates* (3), die *U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates* (7) und die *ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates* (12). Wichtige Informationsquellen für die Erarbeitung dieses Dokument waren außerdem die in Ringtests der Prüfmethode ((13), Ringtest-Bericht) gewonnenen praktischen Erfahrungen sowie Informationen aus der Fachliteratur.

VORAUSSETZUNGEN UND PRAKTISCHE HINWEISE

6. Vor Beginn der Studie sind Informationen zur Prüfchemikalie (z. B. Sicherheitsvorkehrungen, geeignete Lagerbedingungen und Analysemethoden) einzuholen. Für Leitlinien für Prüfchemikalien mit physikalisch-chemischen Eigenschaften, die die Durchführung des Tests erschweren, siehe (14).
7. Vor der Durchführung einer Prüfung sollte Folgendes über die Prüfchemikalie bekannt sein:
 - Common Name, chemische Bezeichnung (vorzugsweise IUPAC-Bezeichnung), Strukturformel, CAS-Nummer, Reinheit;
 - Dampfdruck;
 - Wasserlöslichkeit;
8. Die folgenden zusätzlichen Vorabinformationen gelten als hilfreich:
 - Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient, K_{ow};
 - organischer Kohlenstoff/Wasser-Verteilungskoeffizient, ausgedrückt als K_{oc};
 - Hydrolyse;
 - Phototransformation in Wasser;
 - biologische Abbaubarkeit;

- Oberflächenspannung.

9. Informationen über bestimmte Eigenschaften des zu verwendenden Sediments sollten ebenfalls vor Beginn des Versuchs vorliegen (7). Für Einzelheiten siehe Nummern 22 bis 25.

TESTPRINZIP

10. Würmer in vergleichbarem physiologischem Zustand (synchronisiert wie in Anlage 5 beschrieben) werden einer Reihe von Giftstoffkonzentrationen ausgesetzt, die in die Sedimentphase eines Sediment-Wasser-Systems eingeführt wurden. Als Medien kommen künstliches Sediment und rekonstituiertes Wasser in Frage. Als Kontrollen werden Prüfgefäße ohne Prüfchemikalie verwendet. Die Prüfchemikalie wird für jede Konzentration in einem einzigen Schritt in das Sediment dotiert, um Abweichungen zwischen Replikaten der einzelnen Konzentrationen zu minimieren; die Testorganismen werden anschließend in die Prüfgefäße gesetzt, in denen Sediment-Wasser-Konzentrationen äquilibriert wurden (siehe Nummer 29). Die Testtiere werden über die Sediment-Wasser-Systeme 28 Tage lang exponiert. Aufgrund seines niedrigen Nährstoffgehalts sollte das künstliche Sediment mit Futter angereichert werden (siehe Nummern 22 und 23 sowie Anlage 4), um sicherzustellen, dass die Würmer unter kontrollierten Bedingungen wachsen und sich vermehren. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass die Tiere sowohl über das Wasser und das Sediments als auch über das Futter exponiert werden.
11. Bevorzugter Endpunkt bei dieser Art von Studie ist der EC_x -Wert (z. B. EC_{50} , EC_{25} und EC_{10} , d. h. die Konzentration, bei der eine Wirkung von x % bei den Testorganismen beobachtet wird) für die Reproduktion bzw. die Biomasse im Vergleich zur Kontrolle. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass der EC_{50} -Wert - angesichts der hohen Unsicherheit niedriger EC_x -Werte (z. B. EC_{10} oder EC_{25}) mit extrem hohem Konfidenzniveau von 95 % (z. B. (15)) und der durch Hypothesenprüfungen ermittelten statistischen Aussagekraft - als robustester Endpunkt betrachtet wird. Außerdem lassen sich für Biomasse und Reproduktion NOEC- und LOEC-Werte ermitteln, wenn Versuchsplan und verfügbares Datenmaterial diese Berechnungen gestatten (siehe Nummern 34 bis 38). Der Versuchsplan richtet sich nach dem Zweck der Studie, d. h. der Ableitung des EC_x -Werts oder des NOEC-Wertes.

REFERENZPRÜFUNG

12. Es wird davon ausgegangen, dass die Leistung der Kontrollorganismen hinreichend dokumentiert, dass ein Labor zur Durchführung der Prüfung in der Lage und – soweit historische Daten vorliegen – die Prüfung wiederholbar ist. Zusätzlich können in regelmäßigen Abständen mithilfe eines Referenzgiftstoffs Referenz-Toxizitätstests durchgeführt werden, um die Empfindlichkeit der Testorganismen zu bestimmen. Mit 96 Stunden-Referenz-Toxizitätstests ausschließlich in Wasser können Empfindlichkeit und Zustand der Versuchstiere zufriedenstellend

demonstriert werden (4)(7). Informationen über die Toxizität von Pentachlorphenol (PCP) nach abgeschlossener Prüfung (28-tägige Exposition gegenüber dem dotierten Sediment) sind Anlage 6 sowie dem Bericht über den Ringtest dieser Prüfmethode (13) zu entnehmen. Für die akute Toxizität von PCP in Wasser allein siehe beispielsweise (16). Diese Informationen können für den Vergleich der Empfindlichkeit des Testorganismus in Referenzprüfungen mit PCP als Referenzgiftstoff verwendet werden. Kaliumchlorid (KCl) oder Kupfersulfat (CuSO₄) wurden als Referenzgifte für *L. variegatus* empfohlen (4)(7). Bislang ist es noch schwierig, Qualitätskriterien anhand von KCl-Toxizitätsdaten festzulegen, da Daten über *L. variegatus* in der Literatur nicht verfügbar sind. Für Informationen zur Toxizität von Kupfer für *L. variegatus* siehe (17) bis (21).

GÜLTIGKEIT DES TESTS

13. Damit der Test als gültig anerkannt werden kann, sollten die folgenden Anforderungen erfüllt sein:

- Ein Ringtest (13) hat gezeigt, dass sich die durchschnittliche Anzahl lebender Würmer (*Lumbriculus variegatus*) pro Replikat in den Kontrollen am Ende der Expositionsdauer gegenüber der Anzahl Würmer pro Replikat zu Beginn der Exposition mindestens um das 1,8-Fache erhöht hat.
- Der pH-Wert des Überstandswassers muss während der gesamten Prüfung zwischen 6 und 9 liegen.
- Die Sauerstoffkonzentration im Überstandswasser darf bei Testtemperatur nicht weniger als 30 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes (*Air Saturation Value, ASV*) betragen.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Prüfsystem

14. Nach Möglichkeit sollten statische Systeme verwendet werden, bei denen das Überstandswasser nicht erneuert wird. Ist das Sediment/Wasser-Verhältnis (siehe Nummer 15) angemessen, reicht im Allgemeinen eine schwache Belüftung aus, um eine annehmbare Wasserqualität für die Testorganismen zu gewährleisten (z. B. Maximierung des Anteils an gelöstem Sauerstoff und Minimierung der Akkumulation von Ausscheidungen). Semistatische Systeme oder Durchflusssysteme mit intermittierender oder ständiger Erneuerung des Überstandswassers sollten nur in Ausnahmefällen verwendet werden, denn es ist davon auszugehen, dass die regelmäßige Erneuerung des Überstandswassers das chemische Gleichgewicht beeinträchtigt (z. B. durch Verluste der Prüfchemikalie aus dem Prüfsystem).

Prüfgefäße und Apparatur

15. Die Exposition erfolgt in 250-ml-Bechergläsern mit einem Durchmesser von 6 cm.

Andere Glasgefäße können verwendet werden, wenn sie eine angemessene Tiefe von Überstandswasser und Sediment garantieren. In jedes Gefäß wird eine Schicht von etwa 1,5-3 cm des formulierten Sediments gegeben. Das Verhältnis zwischen Sedimentschichttiefe und Überstandswassertiefe beträgt 1:4. Die Gefäße müssen ein der Besatzrate (d. h. der Anzahl der pro Gewichtseinheit des Sediments eingesetzten Würmer) angemessenes Fassungsvermögen haben (siehe auch Nummer 39).

16. Prüfgefäße und sonstige Apparaturen, die mit der Prüfchemikalie in Berührung kommen, sollten ganz aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Material bestehen. Die Verwendung von Materialien, die sich auflösen können, die Prüfchemikalien absorbieren oder andere Chemikalien aussickern bzw. den Prüftieren schaden können, sollte für alle verwendeten Teile möglichst vermieden werden. Geräte, die mit den Prüfmedien in Berührung kommen, können aus Polytetrafluorethylen (PTFE), rostfreiem Stahl und/oder Glas bestehen. Bei organischen Chemikalien, die auf Glas bekanntermaßen adsorbiert werden, kann silanisiertes Glas erforderlich sein. In solchen Fällen muss das Gerät nach der Benutzung entsorgt werden.

Testspezies

17. Die für diese Art von Studie zu verwendende Spezies ist der Süßwasser-Oligochaet *Lumbriculus variegatus* (Müller). Diese Art ist gegenüber einer Vielzahl von Sedimenttypen tolerant und wird allgemein für Sediment-Toxizitätstests und Bioakkumulationstests verwendet (z. B. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34) und (35)). Die Herkunft der Testtiere, die Identitätsbestätigung der Art (z. B. (36)) und die Kulturbedingungen sind zu protokollieren. Die Art braucht nicht vor jeder Prüfung neu identifiziert zu werden, wenn die Organismen aus einer Laborkultur stammen.

Anzucht der Testorganismen

18. Damit eine ausreichende Anzahl Würmer für die Sediment-Toxizitätstests verfügbar ist, empfiehlt es sich, die Würmer in einer Dauerkultur vorrätig zu halten. Für Hinweise zu Laborkulturmethoden für *Lumbriculus variegatus* sowie Bezugsquellen für Ausgangskulturen siehe Anlage 5. Für nähere Informationen zur Kultivierung dieser Art siehe (3), (7) und (27).
19. Um sicherzustellen, dass die Tests mit Tieren derselben Art durchgeführt werden, wird die Herstellung von Monospezies-Kulturen dringend empfohlen. Dabei ist sicherzustellen, dass die Kulturen und insbesondere die in den Tests verwendeten Würmer keine erkennbaren Anzeichen von Krankheiten und Anomalien aufweisen.

Wasser

20. Als Überstandswasser für die Tests wird rekonstituiertes Wasser (siehe Kapitel C.1 dieses Anhangs) (37) empfohlen. Dieses Wasser kann auch für die Laborzucht der Würmer verwendet werden (für die Aufbereitung des Wassers siehe Anlage 2). Falls

erforderlich, kann auch natürliches Wasser verwendet werden. Das gewählte Wassers sollte so beschaffen sein, dass die im Testspezies während der Akklimatisierungs- und Testphasen weiter wachsen und sich vermehren kann, ohne Aussehens- oder Verhaltensauffälligkeiten zu entwickeln. Es wurde nachgewiesen, dass *Lumbriculus variegatus* in dieser Art Wasser überlebt, wächst und sich vermehrt (30), und eine maximale Standardisierung der Test- und Kulturbedingungen ist gewährleistet. Wenn rekonstituiertes Wasser verwendet wird, sollte seine Zusammensetzung protokolliert und das Wasser vor der Verwendung charakterisiert werden (zumindest pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Härte, letztere ausgedrückt in mg CaCO₃/l). Außerdem kann es sinnvoll sein, das Wasser vor der Verwendung auf Mikroschadstoffe zu untersuchen (siehe z. B. Anlage 3).

21. Der pH-Wert des Überstandswassers sollte im Bereich 6,0-9,0 liegen (siehe Nummer 13). Wird mit einer verstärkten Ammoniakbildung gerechnet, sollte der pH-Wert auf 6,0-8,0 korrigiert werden. Für die Prüfung z. B. schwacher organischer Säuren empfiehlt es sich, den pH-Wert durch Puffern des Testwassers anzupassen, wie z. B. unter (16) beschrieben. Die Gesamthärte des Testwassers sollte bei natürlichem Wasser zwischen 90 und 300 mg CaCO₃ pro l betragen. Anlage 3 enthält zusätzliche Kriterien für akzeptables Verdünnungswasser im Sinne der OECD-Prüfrichtlinie 210 (38).

Sediment

22. Da kontaminationsfreie natürliche Sedimente von einem bestimmten Herkunftsort möglicherweise nicht ganzjährig verfügbar sind und heimische Organismen und vorhandene Mikroschadstoffe den Test beeinflussen können, sollte vorzugsweise ein formuliertes Sediment (auch rekonstituiertes, künstliches oder synthetisches Sediment genannt) verwendet werden. Durch die Verwendung eines formulierten Sediments werden Unterschiede bei den Testbedingungen und die Gefahr der Eintragung heimischer Fauna auf ein Mindestmaß begrenzt. Das folgende formulierte Sediment basiert auf dem künstlichen Sediment gemäß (6), (39) und (40). Es wird für diese Art von Prüfung empfohlen (siehe (6), (10), (30), (41), (42), (43)):
 - a) 4-5 % (bezogen auf die Trockenmasse) Sphagnumtorf: Wichtig ist, dass der Torf in Pulverform (Zersetzungsstadium „mittel“), fein gemahlen (Partikelgröße ≤ 0,5 mm) und ausschließlich luftgetrocknet verwendet wird;
 - b) 20 ± 1 % (bezogen auf die Trockenmasse) Kaolin-Ton (Kaolingehalt vorzugsweise über 30 %);
 - c) 75-76 % (bezogen auf die Trockenmasse) Quarzsand (feiner Sand, Korngröße ≤ 2, > 50 % der Partikel sollten zwischen 50 und 200 µm groß sein);
 - d) entionisiertes Wasser, 30–50 % bezogen auf die Trockenmasse

des Sediments, zusätzlich zu den trockenen Sedimentbestandteilen;

- e) chemisch reines Calciumcarbonat (CaCO_3), das zugegeben wird, um den pH-Wert der fertigen Mischung des Sediments einzustellen;
- f) der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) der fertigen Mischung sollte 2 % ($\pm 0,5$ %), bezogen auf die Trockenmasse des Sediments, betragen und ist durch geeignete Mengen Torf und Sand (siehe Buchstaben a und c sicherzustellen);
- g) Futter, beispielsweise fein gemahlene Brennnesselblätter (*Urtica sp.*, gemäß Arzneimittelstandards, für den menschlichen Verzehr), oder eine Mischung aus fein gemahlenden Blättern von *Urtica sp.* mit Alpha-Cellulose (1:1), in einem Anteil von 0,4-0,5 %, bezogen auf die Trockenmasse des Sediments, zusätzlich zu den trockenen Sedimentbestandteilen; für nähere Informationen siehe Anlage 4.

23. Die Herkunft von Torf, Kaolin-Ton, Futtermaterial und Sand sollte bekannt sein. Zusätzlich zu Buchstabe g sind in Kapitel C.27 dieses Anhangs (6) alternative Pflanzenmaterialien aufgelistet, die als Nährstoffe dienen können: getrocknete Maulbeerblätter (*Morus alba*), Weißklee (*Trifolium repens*), Spinat (*Spinacia oleracea*) oder Getreidegräser.

24. Das gewählte Futter sollte hinzugegeben werden, bevor oder während das Sediment mit der Prüfchemikalie dotiert wird. Es sollte zumindest eine akzeptable Vermehrung in den Kontrollen ermöglichen. Eine vor Gebrauch durchgeführte Analyse des künstlichen Sediments oder seiner Bestandteile auf Mikroschadstoffe könnte nützliche Informationen liefern. Ein Beispiel für die Aufbereitung des formulierten Sediments ist in Anlage 4 gegeben. Trockene Bestandteile können auch gemischt werden, sofern es nach Zugabe des Überstandswassers nachweislich nicht zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile (z. B. schwimmende Torfpartikel) kommt und der Torf oder das Sediment ausreichend konditioniert ist (siehe auch Nummer 25 und Anlage 4). Das künstliche Sediment sollte zumindest nach der Herkunft seiner Bestandteile, der Korngrößenverteilung (Prozentanteil an Sand, Schlick und Ton), dem gesamten organischen Kohlenstoff (TOC), dem Wassergehalt und dem pH-Wert charakterisiert werden. Die Messung des Redoxpotenzials ist fakultativ.

25. Soweit (beispielsweise für spezifische Tests) erforderlich, können auch natürliche Sedimente von nicht verunreinigten Standorten als Test- und/oder Kultursedimente dienen (3). Wenn natürliches Sediment verwendet wird, sollte dieses allerdings zumindest nach Herkunft (Entnahmeort), pH-Wert und Ammoniakgehalt des Porenwassers, gesamtem organischem Kohlenstoff (TOC) und Stickstoffgehalt, Partikelgrößenverteilung (Prozentanteil an Sand, Schlick und Ton) und

Wassergehalt (in %) (7) charakterisiert werden; außerdem muss das Sediment frei von Schadstoffen und sonstigen Organismen sein, die mit den Testorganismen konkurrieren oder diese fressen könnten. Die Messung des Redoxpotenzials und der Kationenaustauschkapazität ist fakultativ. Ferner wird empfohlen, natürliches Sediment vor dem Dotieren mit der Prüfchemikalie sieben Tage lang unter den Bedingungen des anschließenden Tests zu konditionieren. Nach dieser Konditionierung ist das Überstandswasser zu entfernen und zu verwerfen.

26. Das zu verwendende Sediment sollte von einer Qualität sein, die gewährleistet, dass die Kontrollorganismen während der Exposition überleben und sich vermehren können, ohne Aussehens- oder Verhaltensauffälligkeiten zu entwickeln. Die Kontrollwürmer sollten sich in das Sediment eingraben und das Sediment aufnehmen. Die Vermehrung in den Kontrollen sollte mindestens das Validitätskriterium gemäß Nummer 13 erfüllen. Das Vorhandensein bzw. Fehlen von Kotbällchen auf der Oberfläche des Sediments (die auf Sedimentaufnahme hinweisen), ist zu protokollieren und kann bei der Auswertung der Testergebnisse hinsichtlich der Expositionspfade nützlich sein. Weitere Informationen über die Sedimentaufnahme können durch die unter (24), (25), (44) und (45) beschriebenen Methoden eingeholt werden, die der Bestimmung der Sedimentaufnahme oder der Wahl der Partikel durch die Testorganismen dienen.
27. Verfahren für die Handhabung natürlicher Sedimente vor der Verwendung im Labor sind unter (3), (7) und (12) beschrieben. Für die Aufbereitung und Lagerung des für den Versuch mit *Lumbriculus* empfohlenen künstlichen Sediments siehe Anlage 4.

Applikation der Prüfchemikalie

28. Die Prüfchemikalie wird in das Sediment dotiert. Da die meisten Prüfchemikalien wahrscheinlich nur schwach wasserlöslich sind, sollten sie zur Herstellung der Stammlösung in kleinstmöglicher Menge eines geeigneten organischen Lösungsmittels (z. B. Aceton, n-Hexan oder Cyclohexan) gelöst werden. Die Stammlösung sollte mit demselben Lösungsmittel gelöst werden, um die Testlösungen herzustellen. Hauptkriterien für die Wahl des geeigneten Lösungsvermittlers sollten die Toxizität und Flüchtigkeit des Lösungsmittels und die Löslichkeit der Prüfchemikalie in dem gewählten Lösungsmittel sein. Für jede Konzentration ist dasselbe Volumen der entsprechenden Lösung zu verwenden. Das Sediment sollte für jede Konzentration in einem einzigen Schritt dotiert werden, um Unterschiede bei den Prüfchemikalienkonzentrationen zwischen den einzelnen Replikaten zu minimieren. Die Testlösungen anschließend mit Quarzsand vermischen, wie unter Nummer 22 beschrieben (z. B. 10 g Quarzsand pro Prüfgefäß). Erfahrungsgemäß reicht ein Volumen von 0,20-0,25 ml pro g Quarzsand aus, um den Sand vollständig zu durchtränken. Das Lösungsmittel anschließend verdampfen, bis der Sand vollständig getrocknet ist. Um (je nach Dampfdruck der Chemikalie) koevaporationsbedingte Prüfchemikalienverluste zu vermeiden, sollte der beschichtete Sand unmittelbar nach dem Trocknen verwendet werden. Den trockenen Sand mit einer geeigneten Menge eines formulierten Sediments der gewünschten Konzentration vermischen. Bei der Aufbereitung des Sediments die in

der Mischung von Prüfchemikalie und Sand enthaltene Sandmenge berücksichtigen (d. h. das Sediment sollte mit möglichst wenig Sand aufbereitet werden). Wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens ist, dass quasi kein Lösungsmittel in das Sediment gelangt (7). Alternativ, z. B. bei Feldsedimenten, kann die Prüfchemikalie auch hinzugegeben werden, indem ein getrockneter und fein gemahlener Anteil des Sediments dotiert wird (wie oben für Quarzsand beschrieben) oder indem die Prüfchemikalie in das feuchte Sediment eingerührt wird; ein etwa verwendeter Lösungsvermittler ist anschließend zu verdampfen. Es ist darauf zu achten, dass die Prüfchemikalie mit dem Sediment gut durchmischt ist, um eine homogene Verteilung im Sediment zu gewährleisten. Erforderlichenfalls können Teilproben analysiert werden, um die Zielkonzentrationen im Sediment zu bestätigen und den Homogenitätsgrad zu bestimmen. Es kann auch sinnvoll sein, Teilproben der Testlösungen zu untersuchen, um auch dort die Zielkonzentrationen im Sediment zu bestätigen. Da zur Aufbringung der Prüfchemikalie auf den Quarzsand ein Lösungsmittel verwendet wird, sollte mit derselben Menge Lösungsmittel wie bei den Testsedimenten eine Lösungsmittelkontrolle angelegt werden. Das Dotierungsverfahren und die Gründe für die Wahl eines anderen Verfahrens als oben beschrieben sollten angegeben werden. Das Dotierungsverfahren kann an die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie angepasst werden (z. B. um Verluste durch Verflüchtigung beim Dotieren oder Äquilibrieren zu vermeiden). Für weitere Hinweise zu Dotierungsverfahren siehe *Environment Canada (1995)* (46).

29. Nachdem das dotierte Sediment hergestellt, in die Prüfgefäße für die Replikate gegeben und mit Testwasser aufgefüllt wurde, sollte ausreichend Zeit vorgesehen werden, damit sich die Prüfchemikalie aus dem Sediment in die wässrige Phase verteilen kann (z. B. (3)(7)(9)). Dies sollte möglichst unter den Temperatur- und Belüftungsbedingungen des Test geschehen. Die erforderliche Äquilibrierzeit ist sediment- und chemikalienabhängig. Manchmal reichen ein paar Stunden oder Tage aus, in selten Fällen können sogar mehrere Wochen (4 bis 5 Wochen) erforderlich sein (z. B. (27)(47)). Bei diesem Test ist Äquilibrierung kein Muss; eine Äquilibrierzeit von 48 Stunden bis zu 7 Tagen wird jedoch empfohlen, um die Zeit für einen Abbau der Prüfchemikalie zu minimieren. Je nach Zweck der Studie (z. B. Simulation von Umweltbedingungen) kann das dotierte Sediment für eine längere Dauer äquilibriert oder gealtert werden.
30. Nach dieser Äquilibrierzeit sollten Proben zumindest aus dem Überstandswasser und dem Sedimentmaterial entnommen werden, und zwar mindestens jeweils in höchster und niedrigster Konzentration, um die Konzentration der Prüfchemikalie zu bestimmen. Diese analytischen Bestimmungen der Prüfchemikalie sollten die Berechnung der Massenbilanz und auf den gemessenen Ausgangskonzentrationen basierende Ergebnisse ermöglichen. In der Regel wird das Sediment-Wasser-System durch Probenahmen gestört oder zerstört. Daher können gewöhnlich für die Untersuchung von Sediment und Würmern nicht dieselben Replikate verwendet werden. Es müssen zusätzliche „Analysegefäße“ in geeigneter Größe bereitgestellt werden, die auf dieselbe Weise (Vorhandensein von Testorganismen) behandelt, die aber nicht für biologische Untersuchungen verwendet werden. Die Gefäßgröße ist so

zu wählen, dass die für das jeweilige Analyseverfahren erforderlichen Probenmengen aufgenommen werden können. Für nähere Informationen siehe Nummer 53.

DURCHFÜHRUNG DER PRÜFUNG

Vorversuch

31. Wenn keine Informationen über die Toxizität der Prüfchemikalie bei *Lumbriculus variegatus* verfügbar sind, kann die Durchführung eines Vorversuchs hilfreich sein, um den im Hauptversuch zu analysierenden Konzentrationsbereich zu ermitteln und die Bedingungen des endgültigen Tests zu optimieren. In diesem Fall eine Reihe weit auseinander liegender Konzentrationen der Prüfchemikalie verwenden. Die Würmer werden jeder Konzentration für eine bestimmte Zeit (z. B. 28 Tage wie im Hauptversuch) ausgesetzt, wodurch geeignete Testkonzentrationen ermittelt werden können. Replikate sind nicht erforderlich. Das Verhalten der Würmer (z. B. Meiden des Sediment), das durch die Prüfchemikalie und/oder das Sediment verursacht werden könnte, sollte im Vorversuch beobachtet und protokolliert werden. Konzentrationen über 1000 mg/kg Sediment (Trockengewicht) sind im Vorversuch nicht zu untersuchen.

Hauptversuch

32. Im Hauptversuch mindestens fünf Konzentrationen verwenden, die beispielsweise nach dem Ergebnis des Vorversuchs (Nummer 31) ausgewählt werden, wie unter den Nummern 35, 36, 37 und 38 beschrieben.
33. Zusätzlich zu den Testreihen wird eine Kontrolle (für Replikate siehe Nummern 36, 37 und 38), die außer der Prüfchemikalie alle Testbestandteile enthält, angesetzt. Ein zur Applikation der Prüfchemikalie möglicherweise verwendeter Lösungsvermittler darf keine messbaren Wirkungen auf die Testorganismen haben; derartige Wirkungen lassen sich anhand einer zusätzlichen Kontrolle, die ausschließlich Lösungsmittel enthält, feststellen.

Versuchsplanung

34. Die Versuchsplanung regelt Zahl und Abstände der Testkonzentrationen, die Anzahl Prüfgefäße je Konzentration und die Zahl der auf die einzelnen Gefäße verteilten Würmer. Für die Verfahren zur Bestimmung der EC_x -Werte und der NOEC-Werte und für die Durchführung eines Limit-Tests siehe Nummern 35, 36, 37 und 38.
35. Die für den Test verwendeten Konzentrationen müssen in jedem Fall die Wirkungskonzentration (z. B. EC_{50} , EC_{25} und EC_{10}) und den Konzentrationsbereich, in dem die Wirkung der Prüfchemikalie von Interesse ist, einschließen. Extrapolierungen weit unterhalb der niedrigsten Konzentration mit Wirkung auf die Testorganismen oder oberhalb der höchsten getesteten Konzentration sind zu vermeiden. Wenn – in Ausnahmefällen – trotzdem eine Extrapolierung vorgenommen wird, ist dies im Bericht umfassend zu begründen.

36. Soll EC_x bestimmt werden, sollten mindestens fünf Konzentrationen und mindestens drei Replikate jeder Konzentration getestet werden. Um Schwankungen zwischen den Kontrollen besser abschätzen zu können, werden sechs Replikate für die Kontrolle bzw. – soweit verwendet – für die Lösungsmittelkontrolle empfohlen. Im Interesse einer angemessenen Modellierung ist es in jedem Fall ratsam, eine hinreichende Anzahl Konzentrationen zu testen. Die Konzentrationen sollten sich höchstens um den Faktor 2 unterscheiden (außer bei einer schwachen Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve). Die Anzahl Replikate pro Behandlung kann reduziert werden, wenn die Zahl der Prüfkonzentrationen mit Reaktionen im Bereich 5–95 % erhöht wird. Eine Erhöhung der Zahl der Replikate oder eine Verkürzung der Intervalle zwischen den Prüfkonzentrationen führt eher zu engeren Konfidenzintervallen für den Test.
37. Wenn die LOEC- und NOEC-Werte geschätzt werden müssen, sollten mindestens fünf Testkonzentrationen mit mindestens vier Replikaten verwendet werden. (Um Schwankungen zwischen den Kontrollen besser abschätzen zu können, werden sollten sechs Replikate für die Kontrolle bzw. – soweit verwendet – für die Lösungsmittelkontrolle empfohlen.) Die einzelnen Konzentrationen sollten sich höchstens um den Faktor 2 unterscheiden. Für Informationen zur statistischen Aussagekraft von Hypothesenprüfungen im Rahmen des Ringtests dieser Prüfmethode siehe Anlage 6.
38. Wenn (beispielsweise aufgrund eines Vorversuchs) bis zu 1000 mg/kg Sediment (Trockengewicht) keine Wirkungen erwartet werden oder wenn bereits eine einzige Testkonzentration zur Bestätigung des maßgeblichen NOEC-Wertes ausreicht, kann (unter Verwendung einer Testkonzentration und von Kontrollen) ein Limit-Test durchgeführt werden. Im letztgenannten Fall ist die gewählte Limit-Konzentration im Prüfbericht detailliert zu begründen. Sinn und Zweck der Limit-Tests ist die Prüfung mit einer einzigen Konzentration, die so hoch ist, dass die Prüfer mögliche toxischen Wirkungen der Chemikalie ausschließen können; dabei wird das Limit auf einen Konzentrationswert festgesetzt, der unter realen Bedingungen nicht erreicht werden dürfte. Empfohlen wird eine Konzentration von 1000 mg/kg (Trockengewicht). In der Regel sind mindestens sechs Replikate pro Behandlung und Kontrollen erforderlich. Für Informationen zur statistischen Aussagekraft von Hypothesenprüfungen im Rahmen des Ringtests dieser Prüfmethode siehe Anlage 6.

Expositionsbedingungen

Testorganismen

39. Der Versuch wird mit mindestens 10 Würmern je Replikat durchgeführt, das zur Bestimmung biologischer Parameter verwendet wird. Diese Anzahl Würmer entspricht in etwa 50-100 mg feuchter Biomasse. Ausgehend von einem Trockengewichtsanteil von 17,1% (48) ergeben sich daraus ungefähr 9-17 mg trockene Biomasse pro Gefäß. U.S. EPA (2000 (7)) empfiehlt ein Füllverhältnis von höchstens 1:50 (trockene Biomasse : TOC). Für das unter Nummer 22 beschriebene Sediment entspricht dies etwa 43 g Sediment (Trockengewicht) pro 10 Würmer bei

einem TOC von 2,0 % Trockensediment. Wenn mehr als 10 Würmer pro Gefäß verwendet werden, muss die Menge des Sediments und des Überstandswassers entsprechend angepasst werden.

40. Die für eine Prüfung verwendeten Würmer sollten alle aus derselben Quelle stammen und einen ähnlichen physiologischen Zustand aufweisen (siehe Anlage 5). Es sind Würmer ähnlicher Größe auszuwählen (siehe Nummer 39). Es wird empfohlen, vor dem Test eine Teilprobe der Charge oder des Wurmervorrats zu wiegen, um das Durchschnittsgewicht zu bestimmen.
41. Die für eine Prüfung zu verwendenden Würmer aus der Kultur nehmen (siehe Anlage 5). Große (adulte) Tiere, die keine Anzeichen einer kürzlich erfolgten Fragmentierung aufweisen, in Glasgefäße (z. B. Petrischalen) mit sauberem Wasser setzen und synchronisieren, wie in Anlage 5 beschrieben. Nach der Regeneration über einen Zeitraum von 10-14 Tagen unversehrte vollständige Würmer ähnlicher Größe, die nach einem leichten mechanischen Reiz aktiv schwimmen oder zu kriechen beginnen, für den Versuch auswählen. Wenn sich die Prüfbedingungen von den Kulturbedingungen unterscheiden (z. B. in Bezug auf Temperatur, Lichtverhältnisse und Überstandswasser) sollte eine Akklimatisierungsphase von beispielsweise 24 Stunden unter Testbedingungen bezüglich Temperatur, Lichtverhältnissen und Überstandswasser ausreichen, um die Anpassung der Würmer an die Prüfbedingungen zu ermöglichen. Die akklimatisierten Oligochaeten nach dem Zufallsprinzip auf die Prüfgefäße verteilen.

Fütterung

42. Da das Futter dem Sediment vor (oder während) der Applikation der Prüfchemikalie zugegeben wird, die Würmer während des Versuchs nicht weiter füttern.

Licht und Temperatur

43. Die Licht-/Dunkelphase bei Kultur und Prüfung beträgt gewöhnlich 16 Stunden (3)(7). Die Lichtintensität sollte gering gehalten werden (z. B. 100-500 lx), um auf der Oberfläche des Sediments natürliche Bedingungen zu simulieren; während der Exposition die Lichtintensität mindestens einmal messen. Die Temperatur sollte während der gesamten Prüfung 20 ± 2 °C betragen. An einem gegebenen Messtag sollte der Temperaturunterschied zwischen den Prüfgefäßen nicht mehr als ± 1 °C betragen. Die Prüfgefäße nach dem Zufallsprinzip in den Testinkubator oder auf die Testfläche stellen, um beispielsweise standortbedingte Reproduktionstrends auf ein Mindestmaß zu begrenzen.

Belüftung

44. Das Überstandswasser der Prüfgefäße vorsichtig belüften (z. B. mit 2-4 Blasen pro Sekunde); die dazu verwendete Pasteur-Pipette etwa 2 cm über der Oberfläche des Sediments ansetzen, um Perturbationen des Sediments zu minimieren. Dabei darauf achten, dass die Konzentration des gelösten Sauerstoffs nicht unter 30 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts (ASV) sinkt. Die Luftzufuhr kontrollieren und

erforderlichenfalls an Werktagen mindestens einmal täglich korrigieren.

Messungen der Wasserqualität

45. Für das Überstandswasser sollten die folgenden Wasserqualitätsparameter gemessen werden:

<i>Temperatur:</i>	Einmal wöchentlich sowie am Anfang und am Ende der Expositionsdauer bei mindestens einem Prüfgefäß pro Konzentration und pro Kontrolle; wenn möglich, auch die Temperatur im umgebenden Medium (Umgebungsluft oder Wasserbad) z. B. stündlich messen.
<i>Gehalt an gelöstem Sauerstoff:</i>	Einmal wöchentlich sowie am Anfang und am Ende der Expositionsdauer bei mindestens einem Prüfgefäß pro Konzentration und pro Kontrolle; ausgedrückt in mg/l und als Luftsauerstoff-Sättigungswert (in %).
<i>Luftzufuhr:</i>	An Werktagen mindestens einmal täglich kontrollieren und erforderlichenfalls korrigieren.
<i>pH-Wert:</i>	Einmal wöchentlich sowie am Anfang und am Ende der Expositionsdauer bei mindestens einem Prüfgefäß pro Konzentration und pro Kontrolle.
<i>Gesamt-wasserhärte:</i>	Zu Beginn und am Ende der Expositionsdauer bei mindestens einem Kontrollreplikat und einem Prüfgefäß bei höchster Konzentration; ausgedrückt in mg/l CaCO ₃ .
<i>Gesamt-ammoniakgehalt:</i>	Zu Beginn der Expositionsdauer bei mindestens einem Kontrollreplikat und einem Prüfgefäß für jede Konzentration und anschließend dreimal wöchentlich; ausgedrückt in mg/l NH ₄ ⁺ oder NH ₃ oder als Ammoniak-N gesamt.

Wenn die Messung der Wasserqualitätsparameter die Entnahme umfangreicher Wasserproben aus den Gefäßen erforderlich macht, kann die Bereitstellung separater Gefäße für Wasserqualitätsmessungen sinnvoll sein, um das Wasser/Sediment-Volumenverhältnis nicht zu verändern.

Biologische Beobachtungen

46. Während der Expositionsdauer sollten die Prüfgefäße beobachtet werden, um Verhaltensunterschiede bei den Würmern (z. B. Meiden des Sediments, sichtbare

Kotbällchen auf der Sedimentoberfläche) feststellen zu können. Beobachtungen sind zu protokollieren.

47. Am Ende der Prüfung jedes Replikats untersuchen (für chemische Analysen vorgesehene zusätzliche Gefäße können hiervon ausgenommen werden). Alle Würmer nach einer geeigneten Methode möglichst unversehrt aus dem Prüfgefäß entnehmen. Eine Möglichkeit ist das Aussieben der Würmer aus dem Sediment. Dazu kann ein Edelstahlsieb mit geeigneter Maschenweite verwendet werden. Den Großteil des Überstandswasser vorsichtig abgießen und das verbleibende Sediment sowie das Restwasser zu einem Schlamm verrühren, der durch das Sieb passiert werden kann. Bei einer Maschenweite von 500 µm passieren die meisten Sedimentpartikel das Sieb sehr schnell. Das Sediment sollte jedoch sehr zügig gesiebt werden, damit die Würmer nicht in oder durch die Maschen kriechen können. Bei einer Maschenweite von 250 µm dürfte dies ausgeschlossen sein. Es ist jedoch darauf zu achten, dass möglichst wenig Sedimentpartikel auf den Maschen hängen bleiben. Der gesiebte Schlamm jedes Replikats kann noch ein zweites Mal gesiebt werden, um sicherzustellen, dass tatsächlich alle Würmer gefunden wurden. Alternativ könnte das Sediment auch aufgewärmt werden, indem es in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 50-60 °C gestellt wird; die Würmer kriechen dann hervor und können mit einer feuerpolierten breiten Pinzette von der Sedimentoberfläche aufgenommen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Herstellung eines Sedimentschlamm, der in eine flache Schale mit geeigneter Größe gegossen wird. Aus der flachen Schlammsschicht können die Würmer mit einer Stahlnadel oder einer Juwelierpinzette (die dann eher als Gabel denn als Pinzette zu verwenden ist, damit die Würmer nicht verletzt werden) aufgenommen und in sauberes Wasser gesetzt werden. Nach dem Entfernen aus dem Sedimentschlamm die Würmer in Prüfmedium abspülen und zählen.
48. Unabhängig von der verwendeten Methode müssen die Labors nachweisen, dass ihre Mitarbeiter in der Lage sind, durchschnittlich mindestens 90 % der Organismen im Sediment wiederzufinden. Beispielsweise könnte eine bestimmte Anzahl Testorganismen in das Kontrollsediment oder in die Prüfsedimente eingesetzt und nach einer Stunde die Wiederfindungsrate ermittelt werden (7).
49. Die Gesamtzahl der lebenden und toten Würmer pro Replikat sollte erfasst und bewertet werden. Würmer der folgenden Kategorien gelten als tot:
- a) nach einem leichten mechanischen Reiz erfolgt keine Reaktion;
 - b) es zeigen sich Anzeichen von Zersetzung (in Verbindung mit Buchstabe a)
 - c) keine Wiederfindung.

Als lebend gelten Würmer der folgenden Kategorien:

- a) große vollständige (adulte) Würmer ohne regenerierte Körperbereiche;
- b) vollständige Würmer mit regenerierten, leicht helleren Körperbereichen (d. h.

mit einem neuen hinteren Teil und/oder einem neuen vorderen Teil);

- c) unvollständige Würmer (d. h. kürzlich fragmentierte Würmer mit nicht regenerierten Körperbereichen).

Diese zusätzlichen Beobachtungen sind nicht verbindlich, können aber für die weitere Auswertung der biologischen Ergebnisse hilfreich sein. (Eine hohe Anzahl Würmer der Kategorie c kann beispielsweise auf eine behandlungsbedingt verzögerte Reproduktion oder Regeneration hindeuten.) Festgestellte Unterschiede im Aussehen der behandelten Würmer und der Kontrollwürmer (z. B. Läsionen des Integuments, ödematöse Körperbereiche) sollten protokolliert werden.

50. Unmittelbar nach dem Zählen/Bewerten die in den einzelnen Replikaten gefundenen lebenden Würmer in getrocknete, vorgewogene und beschriftete Waagschalen (jeweils eine pro Replikat) setzen und mit einem Tropfen Ethanol pro Waagschale töten. Die Waagschalen bei einer Temperatur von 100 ± 5 °C über Nacht in einem Trockenschrank trocknen und nach dem Abkühlen in einem Exsikkator wiegen; anschließend das Trockengewicht der Würmer (vorzugsweise in g bis auf mindestens 4 Dezimalstellen) bestimmen.
51. Zusätzlich zum Gesamttrockengewicht kann auch das aschefreie Trockengewicht bestimmt werden, wie in (49) beschrieben, um auch anorganische Bestandteile aus dem aufgenommenen Sedimentmaterial im Verdauungstrakt der Würmer zu berücksichtigen.
52. Die Biomasse wird als gesamte Biomasse pro Replikat (juvenile und adulte Würmer) ermittelt. Tote Würmer sollten zur Bestimmung der Biomasse pro Replikat nicht berücksichtigt werden.

Überprüfung der Prüfchemikalienkonzentrationen

Probenahmen

53. Zumindest am Ende der Äquilibrierungsphase (d. h. vor Zugabe der Testorganismen) sowie bei Prüfungsende sollten zur chemischen Analyse Proben der Prüfchemikalie (und zwar zumindest in der höchsten und in einer niedrigeren Konzentration) entnommen werden. Untersucht werden sollten mindestens Proben des Sediments und des Überstandswassers. Pro Matrix und pro Behandlung sollten an jedem Probenahmetag jeweils mindestens zwei Proben entnommen werden. Eine der beiden Proben kann als Reserve aufbewahrt werden (die z. B. dann analysiert werden kann, wenn die erste Analyse einen Wert außerhalb des Bereichs von ± 20 % der nominellen Konzentration ergibt). Bei spezifischen chemischen Merkmalen, z. B. wenn ein rascher Abbau der Prüfchemikalie erwartet wird, können die Analysen je nach Expertenurteil verfeinert werden (z. B. häufigere Probenahmen oder Analyse weiterer Konzentrationen). Proben können dann auch zwischen den eigentlich Probenahmetagen entnommen werden (z. B. an Tag 7 nach Beginn der Exposition).

54. Das Überstandswasser vorsichtig abgießen oder absaugen, um das Sediment möglichst wenig zu perturbieren. Die entnommenen Probenvolumina protokollieren.
55. Nach dem Entfernen des Überstandswassers das Sediment homogenisieren und in ein geeignetes Behältnis geben. Das Gewicht der feuchten Sedimentprobe protokollieren.
56. Wenn zusätzlich die Prüfchemikalie im Porenwasser analysiert werden muss, homogenisierte und abgewogene Sedimentproben zentrifugieren, um das Porenwasser abzuschleiden. Beispiel: Etwa 200 ml feuchtes Sediment in Zentrifugiergläser mit einem Füllinhalt von 250 ml geben. Danach die Proben ohne Filtration zentrifugieren, um das Porenwasser zu isolieren (z. B. 30-60 min. mit $10\,000 \pm 600 \times g$ höchstens bei Testtemperatur). Nach dem Zentrifugieren Überstand abgießen oder mit einer Pipette aufnehmen und das Volumen protokollieren; dabei darauf achten, dass keine Sedimentpartikel eingebracht werden. Das Gewicht der verbliebenen Sedimentpellets notieren. Die Schätzung der Massenbilanz oder die Wiederfindung der Prüfchemikalie im Wasser-Sediment-System können erleichtert werden, wenn das Trockengewicht des Sediments an jedem Probenahmetag ermittelt wird. Bei zu kleinen Probenvolumina kann es vorkommen, dass sich die Konzentrationen im Porenwasser nicht analysieren lassen.
57. Wenn die Analyse nicht sofort durchgeführt wird, sind alle Proben in geeigneter Weise zu lagern, z. B. unter den empfohlenen Bedingungen, bei denen die jeweilige Prüfchemikalie am wenigsten abgebaut wird. (Umweltproben beispielsweise bei -18 °C im Dunkeln lagern.) Vor Beginn der Prüfung sind Informationen über geeignete Lagerbedingungen für die jeweilige Prüfchemikalie (z. B. Dauer, Temperatur, Extraktionsverfahren usw.) einzuholen.

Analysemethode

58. Da Genauigkeit, Präzision und Reproduzierbarkeit der für die Prüfchemikalie angewandten Analysemethode entscheidend für das gesamte Verfahren sind, muss experimentell überprüft werden, ob Präzision und Reproduzierbarkeit der chemischen Analyse sowie die Wiederfindung der Prüfchemikalie in Wasser- und Sedimentproben für die jeweilige Methode zumindest bei der niedrigsten und der höchsten Konzentration akzeptabel sind. Außerdem muss gewährleistet werden, dass die Prüfchemikalie in den Prüfkammern nicht in Konzentrationen oberhalb der Quantifizierungsgrenze nachweisbar ist. Erforderlichenfalls sind die nominellen Konzentrationen für die Wiederfindung der Qualitätskontrolldotierungen zu korrigieren (z. B. wenn die Wiederfindungsrate außerhalb des Bereichs von 80-120 % des dotierten Volumens liegt). Alle Proben sind während des Tests stets so zu handhaben, dass Verunreinigungen und Verluste (z. B. infolge der Adsorption der Prüfchemikalie an das Probenahmegerät) auf ein Mindestmaß beschränkt werden.
59. Die Wiederfindung der Prüfchemikalie, die Quantifizierungsgrenze und die Nachweisgrenze in Sediment und Wasser sollten protokolliert und gemeldet werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

60. Die wichtigsten statistisch auszuwertenden obligatorischen Reaktionsvariablen der Prüfung sind die Biomasse und die Gesamtzahl der Würmer pro Replikat. Optional könnten auch Reproduktion (Vermehrung der Würmer) und Wachstum (Zunahme der trockenen Biomasse) bewertet werden. In diesem Fall sollte das Trockengewicht der Würmer zu Beginn der Exposition bestimmt werden (z. B. durch Messung des Trockengewichts einer repräsentativen Teilprobe der für die Prüfung zu verwendenden Charge synchronisierter Würmer).
61. Die Mortalität ist bei dieser Prüfung zwar kein Endpunkt, sollte möglichst aber dennoch bewertet werden. Zur Bestimmung der Mortalität sollten Würmer, die auf einen leichten mechanischen Reiz nicht reagieren oder die Anzeichen von Zersetzung zeigen, sowie nicht aufzufindende Würmer als tot gelten. Tote Würmer sollten zumindest protokolliert und bei der Auswertung der Testergebnisse berücksichtigt werden.
62. Wirkungskonzentrationen sind in mg/kg Sedimenttrockenmasse auszudrücken. Wenn die Wiederfindungsrate der im Sediment oder in Sediment und Überstandswasser zu Beginn der Exposition gemessenen Prüfchemikalie zwischen 80 und 120 % der nominellen Konzentrationen liegt, können die Wirkungskonzentrationen (EC_x , NOEC, LOEC) bezogen auf die nominellen Konzentrationen ausgedrückt werden. Weicht die Wiederfindungsrate um mehr als $\pm 20\%$ von den nominellen Konzentrationen ab, so sind die Wirkungskonzentrationen (EC_x , NOEC, LOEC) auf die zu Beginn der Exposition gemessenen Ausgangskonzentrationen zu beziehen, beispielsweise durch Berücksichtigung der Massenbilanz der Prüfchemikalie im Prüfsystem (siehe Nummer 30). In diesen Fällen können zusätzliche Informationen aus der Analyse der Stammlösungen und/oder der Applikationslösungen bezogen werden, um zu bestätigen, dass die Testsedimente ordnungsgemäß aufbereitet wurden.

EC_x

63. Die EC_x -Werte der unter Nummer 60 beschriebenen Parameter werden nach geeigneten statistischen Methoden berechnet (z. B. durch Probit-Analysen, Logit- oder Weibull-Transformationen, mit der Trimmed-Spearman-Kärber-Methode oder durch einfache Interpolation). (15) und (50) enthalten Leitlinien für die statistische Auswertung. Ein EC_x -Wert wird ermittelt, indem ein $x\%$ des Kontroll-Mittelwertes entsprechender Wert in die Gleichung eingefügt wird. Zur Berechnung des EC_{50} -Wertes oder einen anderen EC_x -Wertes sind die Vorbehandlungsmittelwerte (\bar{x}) einer Regressionsanalyse zu unterziehen.

NOEC/LOEC

64. Wenn die NOEC-/LOEC-Werte durch statistische Analyse bestimmt werden sollen, sind Statistiken für jedes einzelne Gefäß erforderlich, (wobei die einzelnen Gefäße

als Replikate zu betrachten sind). Es sollten geeignete statistische Methoden angewendet werden. Im Allgemeinen werden schädliche Wirkungen der Prüfchemikalie im Vergleich zur Kontrolle einer einseitigen (kleineren) Hypothesenprüfung bei $p \leq 0,05$ unterzogen. In den folgenden Absätzen werden einige Beispiele gegeben. Empfehlungen für geeignete statistische Methoden finden sich unter (15) und (50).

65. Die Normalverteilung von Daten kann z. B. anhand der Kolmogorov-Smirnov-Methode („*Goodness-of-Fit*“-Test), anhand einer Prüfung zur Ermittlung des Quotienten aus Spannweite und Standardabweichung (*range to standard deviation ratio*, R/s-Test) oder anhand des Shapiro-Wilk-Tests (zweiseitig, $p \leq 0,05$) untersucht werden. Mit dem Cochran-Test, dem Levene-Test oder dem Bartlett-Test (zweiseitig, $p \leq 0,05$) kann die Varianzhomogenität geprüft werden. Wenn die Bedingungen parametrischer Testverfahren (Untersuchung auf Normalverteilung und Varianzhomogenität) erfüllt sind, können eine einseitige Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend Multi-Comparison-Tests durchgeführt werden. Mit paarweisen Vergleichstests (z. B. mit dem Dunnett-t-Test) oder Step-down-Trendtests (z. B. dem Williams-Test) kann berechnet werden, ob zwischen den Kontrollen und den verschiedenen Prüfchemikalienkonzentrationen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) bestehen. Andernfalls sollten nicht parametrische Methoden (z. B. ein U-Test mit Bonferroni-/Holm-Korrektur oder ein Jonckheere-Terpstra-Trendtest) verwendet werden, um den NOEC- und LOEC-Wert zu bestimmen.

Limit-Test

66. Wenn ein Limit-Test (Vergleich der Kontrolle mit einer einzigen Prüfkonzentration) durchgeführt wurde und die Voraussetzungen für parametrische Testverfahren (Normalität und Homogenität) erfüllt sind, können metrische Antworten (Gesamtzahl der Würmer und Biomasse ausgedrückt als Trockengewicht der Würmer) mit einem Student-Test (t-Test) ausgewertet werden. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so kann ein t-Test für ungleiche Varianzen (Welch-Test) oder ein nicht-parametrischer Test wie der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet werden. Für Informationen zur statistischen Aussagekraft von Hypothesenprüfungen im Rahmen des Ringtests dieser Methode siehe Anlage 6.
67. Um signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen (Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle) zu ermitteln, können die Replikate der einzelnen Kontrollen wie beim Limit-Test geprüft werden. Werden bei diesen Tests keine signifikanten Unterschiede festgestellt, können alle Replikate (Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle) gepoolt werden. Andernfalls alle Behandlungen mit der Lösungsmittelkontrolle vergleichen.

Auswertung der Ergebnisse

68. Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren, wenn von dieser Prüfmethode abgewichen wurde und wenn gemessene Testkonzentrationen nahe an der Nachweisgrenze des angewandten Analyseverfahrens liegen. Jegliche Abweichung von dieser Prüfmethode ist zu protokollieren.

Prüfbericht

69. Der Prüfbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- chemische Kenndaten (Common name, chemische Bezeichnung, Strukturformel, CAS-Nummer usw.) einschließlich Reinheitsgrad und Analyseverfahren zur Quantifizierung der Chemikalie, Herkunft der Prüfchemikalie, Identität und Konzentration etwa verwendeter Lösungsmittel;
- alle verfügbaren Informationen über die physikalische Beschaffenheit und die physikalisch-chemischen Eigenschaften, bei sie bei Beginn des Versuchs ermittelt wurden (z. B. Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Koeffizient der Verteilung im Boden (bzw. ggf. im Sediment), $\log K_{ow}$, Stabilität in Wasser usw.);

Testspezies:

- wissenschaftlicher Name, Herkunft, etwaige Vorbehandlungen, Akklimatisierung, Kulturbedingungen usw.;

Prüfbedingungen:

- angewandtes Testverfahren (z. B. statisch, semistatisch oder Durchfluss);
- Versuchsplan (z. B. Anzahl, Material und Größe der Prüfkammern, Wasservolumen pro Gefäß, Sedimentmasse und Volumen pro Gefäß (bei Durchflussverfahren und semistatischen Verfahren: Wasseraustauschrate), Belüftung vor und während des Versuchs, Anzahl Replikate, Anzahl Würmer je Replikat zu Beginn der Exposition, Anzahl Testkonzentrationen, Dauer der Konditionierung, Äquilibirierungs- und Expositionsdauer, Häufigkeit der Probennahmen);
- Tiefe des Sediments und des Überstandswassers;
- Methode der Vorbehandlung der Prüfchemikalie und der Dotierung/Applikation;
- nominelle Prüfkonzentrationen, Einzelheiten zur Entnahme von Proben für chemische Analysen und die Analysemethoden, mit denen die Konzentrationen der Prüfchemikalie ermittelt wurden;
- Sedimentmerkmale gemäß den Nummern 24 und 25; sonstige vorgenommene Messungen; Aufbereitung des formulierten Sediments;
- Aufbereitung des Prüfwassers vor Beginn des Versuchs (falls rekonstituiertes Wasser verwendet wird) und Merkmale des Wassers (Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Leitfähigkeit, Härte und andere vorgenommene Messungen);
- Angaben zur Fütterung, einschließlich Art des Futters, Präparation, Menge und Fütterungsregime;
- Lichtintensität und Hell-/Dunkelphase(n);
- Methoden zur Ermittlung aller biologischen Parameter (z. B. Probenahme, Kontrolle, Wiegen der Testorganismen) sowie aller abiotischen Parameter (z. B. Parameter für Wasser- und Sedimentqualität);
- Volumina und/oder Gewichte aller Proben für die chemische Analyse;
- genaue Informationen über die Behandlung aller Proben für die chemische Analyse einschließlich Angaben zu Aufbereitung, Lagerung, Dotierungsverfahren, Entnahme- und Analyseverfahren (einschließlich Genauigkeit) für die jeweilige Prüfchemikalie

und Wiederfindungsraten der Prüfchemikalie.

Ergebnisse:

- Qualität des Wassers in den Prüfgefäßen (pH-Wert, Temperatur, Gehalt an gelöstem Kohlenstoff, Härte, Ammoniakkonzentrationen und andere vorgenommene Messungen);
- gesamter organischer Kohlenstoff (TOC), Verhältnis Trockenmasse/Feuchtmasse, pH-Wert des Sediments und andere vorgenommene Messungen;
- Gesamtzahl sowie – falls bestimmt – die Zahl der vollständigen und nicht mehr vollständigen Würmer in den einzelnen Prüfkammern am Ende des Versuchs;
- Trockengewicht der Würmer in den einzelnen Prüfkammern am Ende des Versuchs und – falls gemessen – Trockengewicht einer Würmer-Teilprobe zu Beginn des Versuchs;
- alle festgestellten anomalen Verhaltensweisen im Vergleich zu den Kontrollen (z. B. Meiden des Sediments, Vorkommen oder Fehlen von Kotbällchen);
- festgestellte Todesfälle;
- Schätzwerte für toxische Endpunkte, z. B. EC_x, NOEC- und/oder LOEC-Werte und die für ihre Bestimmung angewandten statistischen Methoden;
- die nominellen Prüfkonzentrationen, die gemessenen Prüfkonzentrationen und die Ergebnisse sämtlicher Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfchemikalie in den Prüfgefäßen;
- jegliche Abweichungen von den Validitätskriterien.

Auswertung der Ergebnisse:

- Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Validitätskriterien gemäß in Nummer 13;
- Diskussion der Ergebnisse einschließlich Auswirkungen auf das Testergebnis, die auf Abweichungen von dieser Prüfmethode zurückzuführen sind.

LITERATUR

- (1) EG (2003). Technischer Leitfaden zur Richtlinie 93/67/EWG der Kommission über die Bewertung der Risiken neu notifizierter Stoffe, zur Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission über die Bewertung der von Altstoffen ausgehenden Risiken und zur Richtlinie 98/8/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Biozid-Produkten; Teil I - IV. Amt für Veröffentlichungen der Europäischen Kommission), Luxemburg.
- (2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD), Paris.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Bd. 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Bd. 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A., und Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (6) Kapitel C.27 dieses Anhangs, „Chironomiden-Toxizitätstest in Sediment-Wasser-Systemen mit dotiertem Sediment“.
- (7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Zweite Ausgabe.EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, März 2000.
- (8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Bericht SPE 1/RM/32. Dezember 1997.

- (9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (Hrsg.), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).
- (10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Hrsg. M. Streloke und H. Köpp. Berlin 1995.
- (11) Riedhammer, C., u. B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.
- (12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.
- (13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J., und Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. in Zusammenarbeit mit R. Nagel und B. Karaoglan. Bericht an das Umweltbundesamt Berlin, FKZ 202 67 429.
- (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Nr. 23.
- (15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; 5. Fassung, März 2003; Bericht EPS 1/RM/.
- (16) Nikkilä, A., Halme, A., Kukkonen, J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.
- (17) Baily, H.C., und Liu, D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, und A.C. Hendricks (Hrsg.). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.
- (18) Chapman, K. K., Benton, M. J., Brinkhurst, R. O., und Scheuerman, P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

- (19) Meyer, J.S., Boese, C.J. und Collyard, S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 133:99-109.
- (20) Schubauer-Berigan, M.K., Dierkes, J.R., Monson, P.D., und Ankley, G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 12(7):1261-1266.
- (21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps und G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. *Hydrobiol.* 262:57-63.
- (22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J., und Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1885-1894.
- (23) Kukkonen, J., und Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (24) Leppänen, M.T., und Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (25) Leppänen, M.T. und Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., und Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 292-302.
- (27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J., und Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J., und Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the

- oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- (29) Rodriguez, P., und Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue und P. Mudroch (Hrsg.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., und Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ¹⁴C-17 α -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.
- (31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann und R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Bd. 20, 2000-2007.
- (32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski und R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. Im Auftrag des Umweltbundesamtes Berlin, FKZ 360 12 001, März 2000.
- (33) Leppänen M.T., und Kukkonen, J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.
- (34) Dermott R., und Munawar, M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.
- (35) Drewes, C.D., und Fournier, C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.
- (36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.
- (37) Kapitel C.1 dieses Anhangs, Akute Toxizität für Fische.
- (38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
- (39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. und Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

- (40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel und B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (*Oligochaeta*) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety*, 39, 10-20.
- (41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C., und Studinger, G. (1999). Workshop on „Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes“, 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Abschlussbericht zum F+E-Vorhaben 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (42) Suedel, B.C., und Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (43) Naylor, C., und C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.
- (44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J., und Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.
- (45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.I., und Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.
- (46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Technol.* 23, 588-595.
- (48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J., und Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 223-228.
- (49) Mount, D.R., Dawson, T.D., und Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment, no. 54.

- (51) Liebig, M., Meller, M. und Egeler, P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten - Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Seminarunterlagen 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. 24./25. März 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Deutschland, S. 107-119.

Zusätzliche Literatur zu statistischen Verfahren:

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), S. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, London.

Hamilton, M.A., R.C. Russo und R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R., und F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. New York.

Shapiro, S.S., und Wilk, M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Für diese Prüfmethode gelten folgende Definitionen:

Äquilibrierungszeitraum: die für die Verteilung der Prüfchemikalie zwischen Festphase, Porenwasser und Überstandswasser vorgesehene Zeit; die Äquilibration erfolgt nach dem Dotieren des Sediments mit der Prüfchemikalie und vor Zugabe der Testorganismen.

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch.

Dotiertes Sediment: Sediment, dem die Prüfchemikalie hinzugefügt wurde.

EC_x: Konzentration der Prüfchemikalie im Sediment, bei der es innerhalb einer gegebenen Expositionsdauer zu einer X %-Wirkung (z. B. 50 %) auf einen biologischen Parameter kommt.

Expositionsphase/Expositionsdauer: die Zeit, während der die Testorganismen der Prüfchemikalie ausgesetzt sind.

Formuliertes Sediment oder rekonstituiertes/künstliches/synthetisches Sediment: ein Gemisch aus Stoffen, das die physikalischen Bestandteile eines natürlichen Sediments simulieren soll.

Konditionierungszeitraum: die für die Stabilisierung des Mikrobenbestandteils des Sediments und die Abtrennung von beispielsweise aus Sedimentbestandteilen stammendem Ammoniak vorgesehene Zeit; die Konditionierung erfolgt vor dem Dotieren des Sediments mit der Prüfchemikalie. Gewöhnlich wird das Überstandswasser nach dem Konditionieren verworfen.

LOEC (Niedrigste messbare Konzentration mit statistisch signifikanter Wirkung): niedrigste geprüfte Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der beobachtet wird, dass sie im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante toxische Wirkung hat ($p \leq 0,05$); allerdings müssen alle Testkonzentrationen über der LOEC eine Wirkung zeigen, die der LOEC-Wirkung gleichwertig ist oder darüber liegt. Sind diese beiden Bedingungen nicht erfüllt, ist genau zu begründen, warum die LOEC (und entsprechend die NOEC) gewählt wurde.

NOEC (Höchste messbare Konzentration ohne statistisch signifikante Wirkung): Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, die im Vergleich zur Kontrolle während einer bestimmten Expositionsdauer keine statistisch signifikante Wirkung ($p \leq 0,05$) zeigt.

Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{ow} ; manchmal auch ausgedrückt als P_{ow}): bezeichnet das Verhältnis der Löslichkeit einer Chemikalie in n-Okтанol und Wasser (äquibriert) und zeigt die Fettlöslichkeit einer Chemikalie an (Kapitel A.24 in diesem Anhang). K_{ow} oder der Logarithmus von K_{ow} ($\log K_{ow}$) gilt als Maß für das Potenzial einer Chemikalie zur Anreicherung in aquatischen Organismen.

Organischer Kohlenstoff/Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{oc}): bezeichnet das Verhältnis zwischen der Konzentration der Chemikalie im/am organischen Kohlenstoff im Sediment und der Konzentration der Chemikalie im Wasser (äquibriert).

Porenwasser oder Interstitialwasser: Wasser in den Hohlräumen zwischen Sediment- oder Bodenpartikeln.

Prüfchemikalie: ein beliebiger Stoff oder ein beliebiges Gemisch, der bzw. das nach dieser Methode geprüft wird.

Überstandswasser: das im Prüfgefäß über dem Sediment stehende Wasser.

Anlage 2

ZUSAMMENSETZUNG DES EMPFOHLENE REKONSTITUIERTEN WASSERS

(übernommen aus Kapitel C.1 dieses Anhangs (1))

a) Calciumchloridlösung

11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in entionisiertem Wasser lösen; anschließend mit entionisiertem Wasser bis auf 1 Liter auffüllen.

b) Magnesiumsulfatlösung

4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in entionisiertem Wasser lösen; anschließend mit entionisiertem Wasser bis auf 1 Liter auffüllen.

c) Natriumbicarbonatlösung

2,59 g NaHCO_3 in entionisiertem Wasser lösen; anschließend mit entionisiertem Wasser bis auf 1 Liter auffüllen.

d) Kaliumchloridlösung

0,23 g KCl in entionisiertem Wasser lösen; anschließend mit entionisiertem Wasser bis auf 1 Liter auffüllen.

Alle Chemikalien müssen Analysequalität haben.

Die Leitfähigkeit des destillierten oder entionisierten Wassers darf höchstens $10 \mu\text{Scm}^{-1}$ betragen.

Von den Lösungen a bis d jeweils 25 ml mischen und das Gesamtvolumen mit entionisiertem Wasser bis auf 1 Liter auffüllen. Die Summe der Ca- und Mg-Ionen in diesen Lösungen beträgt 2,5 mmol/l.

Das Verhältnis der Ca- zu den Mg-Ionen beträgt 4:1 und das der Na- zu den K-Ionen 10:1. Die Gesamtalkalinität $K_{\text{S}4,3}$ dieser Lösung beträgt 0,8 mmol/l.

Das Verdünnungswasser bis zur Sauerstoffsättigung belüften und anschließend ohne weitere Belüftung bis zur Verwendung zwei Tage lagern.

BEZUGSQUELE

- (1) Kapitel C.1 dieses Anhangs, Akute Toxizität für Fische.

Anlage 3

PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS

Bestandteil	Konzentrationen
<i>Partikel</i>	< 20 mg/l
<i>Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff</i>	< 2 µg/l
<i>Nichtionisierter Ammoniak</i>	< 1 µg/l
<i>Restchlor</i>	< 10 µg/l
<i>Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden</i>	< 50 ng/l
<i>Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen</i>	< 50 ng/l
<i>Gesamtgehalt an organischem Chlor</i>	< 25 ng/l

(übernommen aus OECD (1992) (1))

Bezugsquelle

(52) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.

Anlage 4

EMPFOHLENES KÜNSTLICHES SEDIMENT – EMPFEHLUNGEN FÜR AUFBEREITUNG UND LAGERUNG

Bestandteile des Sediments

<i>Bestandteil</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>in % des Sediment- trockengewichts</i>
<i>Torf</i>	<i>Sphagnum-Moostorf, Zersetzungsgrad: „mittel“, luftgetrocknet, ohne sichtbare Pflanzenreste, fein gemahlen (Partikelgröße $\leq 0,5$ mm).</i>	<i>5 \pm 0,5</i>
<i>Quarzsand</i>	<i>Korngröße: ≤ 2 mm, aber > 50 % der Partikel sollten eine Größe im Bereich 50-200 μm haben.</i>	<i>75-76</i>
<i>Kaolin-Ton</i>	<i>Kaolinitgehalt ≥ 30 %</i>	<i>20 \pm 1</i>
<i>Futter</i>	<i>z. B. Nesselpulver (<i>Folia urticae</i>), Blätter von <i>Urtica dioica</i> (Brennnessel), fein gemahlen (Partikelgröße $\leq 0,5$ mm); nach Arzneimittelstandards, zum menschlichen Verzehr geeignet; zusätzlich zum trockenen Sediment</i>	<i>0,4-0,5 %</i>
<i>Organischer Kohlenstoff</i>	<i>eingestellt durch Zugabe von Torf und Sand</i>	<i>2 \pm 0,5</i>
<i>Calciumcarbonat</i>	<i>CaCO₃, in Pulverform, chemisch rein, zusätzlich zum trockenen Sediment</i>	<i>0,05-1</i>
<i>Entionisiertes Wasser</i>	<i>Leitfähigkeit ≤ 10 μS/cm, zusätzlich zum trockenen Sediment</i>	<i>30-50</i>

HINWEIS: Ist mit hohen Ammoniakkonzentrationen zu rechnen (wenn beispielsweise bekannt ist, dass die Prüfchemikalie die Nitrifikation hemmt), kann es sinnvoll sein, 50 % des stickstoffreichen Nesselpulvers durch Cellulose (z. B. α -Cellulosepulver, chemisch rein, Partikelgröße $\leq 0,5$ mm (1) (2)) zu ersetzen.

Aufbereitung

Den Torf lufttrocknen und zu feinem Pulver vermahlen. Mithilfe eines leistungsstarken Homogenisierapparats eine Suspension der erforderlichen Menge Torfpulver in entionisiertem Wasser herstellen. Den pH-Wert dieser Suspension mit CaCO_3 auf $5,5 \pm 0,5$ einstellen. Die Suspension bei $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ für mindestens zwei Tage unter sanftem Rühren konditionieren, um den pH-Wert zu stabilisieren und einen stabilen mikrobiellen Bestandteil zu sichern. Den pH-Wert erneut messen; er sollte bei $6,0 \pm 0,5$ liegen. Anschließend die anderen Bestandteile (Sand und Kaolin-Ton) sowie entionisiertes Wasser zur Torf-Suspension hinzugeben und zu einem homogenen Sediment vermischen, dessen Wassergehalt 30-50 % des Trockengewichts des Sediments ausmachen sollte. Den pH-Wert der fertigen Mischung erneut messen und erforderlichenfalls mit CaCO_3 auf 6,5-7,5 einstellen. Ist jedoch mit Ammoniakbildung zu rechnen, kann es sinnvoll sein, den pH-Wert des Sediments unter 7,0 zu halten (z. B. zwischen 6,0 und 6,5). Sedimentproben entnehmen, um das Trockengewicht und den Gehalt an organischem Kohlenstoff zu bestimmen. Ist mit Ammoniakbildung zu rechnen, kann das formulierte Sediment sieben Tage lang unter Testbedingungen konditioniert werden (z. B. Sediment/Wasser-Verhältnis von 1:4, Tiefe der Sedimentschicht wie in den Prüfgefäßen), bevor es mit der Prüfchemikalie dotiert wird, d. h. das Sediment ist mit belüftetem Wasser aufzufüllen. Nach dieser Konditionierung das Überstandswasser entfernen und verwerfen. Anschließend den dotierten Quarzsand mit dem Sediment in den verschiedenen Konzentrationen mischen; das Sediment auf die Replikatgefäße verteilen und mit Testwasser auffüllen. Die Gefäße unter den Testbedingungen inkubieren. Hier beginnt die Äquilibrierzeit. Das Überstandswasser sollte belüftet werden.

Das gewählte Futter hingegeben, bevor oder während das Sediment mit der Prüfchemikalie dotiert wird. Es kann anfänglich mit der Torfsuspension gemischt werden (s. o.). Eine allzu starke Verschlechterung der Futterqualität vor dem Einsetzen der Testorganismen (z. B. bei langer Äquilibrierzeit) kann vermieden werden, indem der Zeitraum zwischen der Futterzugabe und dem Beginn der Exposition so kurz wie möglich gehalten wird. Um sicherzustellen, dass das Futter mit der Prüfchemikalie dotiert wird, sollte das Futter spätestens am Tag der Dotierung mit dem Sediment vermischt werden.

Lagerung

Die trockenen Bestandteile des künstlichen Sediments können an einem trockenen und kühlen Ort oder bei Raumtemperatur gelagert werden. Aufbereitetes und mit der Prüfchemikalie dotiertes Sediment ist umgehend im Versuch zu verwenden. Proben des dotierten Sediments können bis zur Analyse unter den für die jeweilige Prüfchemikalie empfohlenen Testbedingungen gelagert werden.

LITERATUR

- (1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J., und Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In Zusammenarbeit mit R. Nagel und B. Karaoglan. Bericht an das Umweltbundesamt Berlin, FKZ 202 67 429, R&D Nr. 202 67 429.
- (2) Liebig, M., Meller, M. und Egeler, P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten - Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Seminarunterlagen 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. 24./25. März 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Deutschland, S. 107-119.

Anlage 5

KULTURMETHODEN FÜR *LUMBRICULUS VARIEGATUS*

Der Glanzwurm *Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta, lebt in Süßwassersedimenten und wird häufig in Ökotoxizitätsprüfungen verwendet. Er kann unter Laborbedingungen kultiviert werden. Im Folgenden werden die Kulturmethoden beschrieben.

Kulturmethoden

Die Kulturbedingungen für *Lumbriculus variegatus* sind in Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3) und U.S. EPA (2000) (4) eingehend beschrieben und werden nachstehend kurz zusammengefasst. Ein großer Vorteil von *L. variegatus* ist seine rasche Vermehrung, die dazu führt, dass die Biomasse in laborgezogenen Populationen schnell zunimmt (z. B. (1)(3)(4)(5)).

Die Würmer können in großen Aquarien (57-80 l) bei 23°C mit Hell-/Dunkelphasen von 16 L : 8 D (100 - 1000 lx) in täglich erneuertem natürlichen Wasser (45-50 l pro Aquarium) gezüchtet werden. Das Substrat wird hergestellt, indem ungebleichte braune Papiertücher in Streifen geschnitten und einige Sekunden mit Kulturwasser befeuchtet werden, so dass ein Substrat aus kleinen Papierteilchen entsteht, das unverzüglich in auf dem Boden des *Lumbriculus*-Zuchtaquariums verteilt werden kann; es kann aber auch in entionisiertem Wasser bis zur späteren Verwendung gefriergelagert werden. Im Aquarium hält sich das frische Substrat für etwa zwei Monate.

Jede Wurmkultur wird mit 500-1000 Würmern angesetzt, die unter Wasseraustausch- oder -durchflussbedingungen dreimal wöchentlich mit einer 10 ml-Suspension aus 6 g Forellen-Starterfutter gefüttert werden. Um Bakterien- und Pilzwachstum entgegenzuwirken, werden statische und semistatische Kulturen seltener gefüttert.

Unter diesen Bedingungen verdoppelt sich die Zahl der Tiere in der Kultur gewöhnlich in 10-14 Tagen.

Alternativ kann *Lumbriculus variegatus* auch in einem System bestehend aus einer 1-2 cm tiefen Schicht Quarzsand (wie im künstlichen Sediment verwendet) und rekonstituiertem Wasser kultiviert werden. Als Kulturgefäße kommen 12-20 cm hohe Glas- oder Edelstahlbehältnisse in Frage. Der Wasserkörper ist mit einer Pasteur-Pipette, die etwa 2 cm über der Sedimentoberfläche positioniert wird, sanft zu belüften (z. B. 2 Blasen pro Sekunde). Um eine Akkumulation z. B. von Ammoniak zu vermeiden, ist das Überstandswasser über ein Durchflusssystem zu erneuern oder mindestens zweimal wöchentlich manuell auszutauschen. Die Oligochaeten können bei Raumtemperatur mit Hell-/Dunkelphasen von 16 Stunden (Lichtintensität 100-1000 lx) bzw. 8 Stunden gehalten werden. In der semistatischen Kultur (Wasseraustausch einmal pro Woche) werden die Würmer zweimal wöchentlich mit TetraMin gefüttert (z. B. 0,6-0,8 mg pro cm² Sedimentoberfläche); das Futter kann als Suspension aus 50 mg TetraMin pro ml

entionisiertem Wasser verabreicht werden.

Lumbriculus variegatus können beispielsweise durch Sieben des Substrats durch ein feinmaschiges Sieb in ein separates Becherglas oder durch Aufnahme (mit einer feuerpolierten Glaspipette mit weiter Öffnung von ca. 5 mm Durchmesser) aus den Kulturen entnommen werden und in ein Becherglas eingesetzt werden. Wenn gleichzeitig auch das Substrat in das Becherglas gegeben wird, dieses würmer- und substrathaltige Glas über Nacht bei kontinuierlichem Wasserdurchfluss ruhen lassen, um das Substrat auszuspülen; die Würmer bleiben auf dem Gefäßboden zurück. Anschließend können die Würmer in neu aufbereitete Kulturgefäße gesetzt oder im Test weiterverwendet werden, wie unter (3) und (4) oder in den folgenden Absätzen beschrieben.

Ein Punkt, der bei der Verwendung von *L. variegatus* in Sedimenttests kritisch zu bewerten ist, betrifft die Reproduktionsform der Art (Architomie oder Morphallaxis, z. B. (6)). Diese geschlechtslose Vermehrung führt zur Entstehung von zwei Fragmenten, die so lange keine Nahrung aufnehmen, bis sich das Kopf- bzw. das Schwanzende regeneriert hat (z. B. (7)(8)), d. h. es kommt nicht zur kontinuierlichen Exposition durch Aufnahme kontaminierten Sediments.

Folglich sollte eine Synchronisierung vorgenommen werden, um eine unkontrollierte Reproduktion und Regeneration und sich daraus ergebende stark variierende Testergebnisse auf ein Mindestmaß zu begrenzen. Derartige Variationen können auftreten, wenn einzelne Exemplare fragmentiert haben und über einen bestimmten Zeitraum keine Nahrung aufnehmen und der Prüfchemikalie deshalb weniger stark ausgesetzt sind als andere Exemplare, bei denen es während des Tests nicht zur Fragmentierung kam (9)(10)(11). 10-14 Tage vor Beginn der Exposition sollten die Würmer künstlich zerteilt werden (Synchronisierung). Für die Synchronisierung werden große (adulte) Würmer ausgewählt, die vorzugsweise keine Anzeichen einer kürzlich erfolgten Morphallaxis aufweisen sollten. Diese Würmer können auf einen Glasträger in einen Tropfen Kulturwasser gesetzt und in der Körpermitte mit einem Skalpell zerteilt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die hinteren Enden ähnlich groß sind. Es bleibt abzuwarten, bis die hinteren Enden in einem Kulturgefäß, das dasselbe Substrat wie die Testkultur und rekonstituiertes Wasser enthält, neue Köpfe bilden. Erst dann kann mit der Exposition begonnen werden. Die Kopfteile gelten dann als regeneriert, wenn die synchronisierten Würmer sich im Substrat eingraben. (Ob sich Kopfteile regeneriert haben, kann auch durch Sichtprüfung einer repräsentativen Teilprobe unter einem binokularen Mikroskop festgestellt werden.) Danach kann davon ausgegangen werden, dass sich die Testorganismen in einem physiologisch ähnlichen Zustand befinden. Wenn sich die synchronisierten Würmern dann während des Versuchs durch Morphallaxis reproduzieren, bedeutet dies, dass praktisch alle Tiere dem dotierten Sediment gleichermaßen ausgesetzt waren. Die synchronisierten Würmer sollten einmal gefüttert werden, sobald sie beginnen, sich in das Substrat einzugraben, oder 7 Tage nach dem Zerteilen. Das Fütterungsregime sollte jedoch in etwa das gleiche sein wie bei regulären Kulturen; es kann jedoch sinnvoll sein, dasselbe Futter zu verwenden wie im eigentlichen Test. Die Würmer sollten bei Testtemperatur gehalten werden (d. h. bei 20 ± 2 °C). Nach der Regeneration werden unversehrte, intakte Würmer, die nach einem leichten mechanischen Reiz aktiv

schwimmen oder zu kriechen beginnen, für die Prüfung verwendet. Verletzungen und Autotomie sind zu vermeiden, indem zum Hantieren der Würmer beispielsweise Pipetten mit feuerpolierten Kanten oder Edelstahl-Zahnstocher verwendet werden.

Bezugsquellen für Starterkulturen von *Lumbriculus variegatus* (Anschriften in den USA übernommen aus (4))

Europa

*ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Deutschland*

*Bayer Crop Science AG
Development – Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Deutschland*

*University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finnland*

*Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und
Hydrowissenschaften
Mommstr. 13
D-01062 Dresden
Deutschland*

*C.N.R. - I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI*

USA.

*U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804*

*Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222*

*U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244*

*Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435*

*Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201*

*Great Lakes Environmental Research
Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593*

LITERATUR

- (1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A., und Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ.Toxicol. Chem.* 12, 269-279.
- (2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J., und Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, März 2000.
- (5) Kukkonen, J., und Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
- (6) Drewes, C.D., und Fourtner, C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (7) Leppänen, M.T. und Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (8) Leppänen, M.T. und Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann und R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Bd. 20, 2000-2007.

- (10) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski und R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbricus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. Im Auftrag des Umweltbundesamts Berlin, FKZ 360 12 001, März 2000.
- (11) Leppänen M.T., und Kukkonen, J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbricus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.

Anlage 6

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES RINGTESTS

„Sedimenttoxizitätsprüfung mit *Lumbriculus variegatus*“

Tabelle 1: Ergebnisse der einzelnen Ringtestdurchläufe: durchschnittliche Anzahl Würmer in den Kontrollen und in den Lösungsmittelkontrollen bei Testende;
SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

	Durchschnittliche Anzahl Würmer in den Kontrollen	SD	CV (%)	N	Durchschnittliche Anzahl Würmer in den Lösungsmittelkontrollen	SD	CV (%)	N
	32,3	7,37	22,80	3	39,0	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	36,0	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	38,5	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	30,8	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	26,3	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	30,7	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	28,8	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	27,7	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	21,3	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	35,0	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	33,5	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	15,0	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	43,7	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	21,7	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	31,3	4,79	15,32	4
Durchschnittswerte der beteiligten Labors	29,59		20,10		30,61		13,26	
SD	8,32		10,03		7,57		10,48	
N	15				15			
Min	16,3				15,0			
Max	42,0				43,7			

CV (%)	28,1	24,7
--------	------	------

Tabelle 2: Ergebnisse der einzelnen Ringtestdurchläufe: durchschnittliches Gesamttrockengewicht der Würmer pro Replikat in den Kontrollen und in den Lösungsmittelkontrollen bei Testende; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

	Gesamt-trocken-gewicht der Würmer pro Replikat (Kontrollen)				Gesamt-trockengewicht der Würmer pro Replikat (Lösungsmittelkontrollen)			
	SD	CV (%)	N		SD	CV (%)	N	
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
Durchschnittswerte der beteiligten Labors	25,15		20,36		27,68		17,53	
SD	7,87		12,56		7,41		9,10	
N	15				15			
Min	12,9				10,5			
Max	41,3				41,4			
CV (%)	31,3				26,8			

Tabelle 3: PCP-Toxizität: Zusammenfassung der Endpunkte im Ringtest; Durchschnittswerte der beteiligten Labors für EC₅₀, NOEC und LOEC; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient.

Biologischer Parameter	Durchschnittswert der beteiligten Labors (mg/kg)			Faktor der beteiligten Labors			Geometr. Mittelwert (mg/kg)	
	min	max		SD	CV (%)			
Gesamtzahl der Würmer	EC ₅₀	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	22,5	7,1	39,1				
Gesamt-Trockengewicht Würmer	EC ₅₀	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	24,8	10,9	44,7				
Mortalität/Überlebensrate	LC ₅₀	25,3	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	16,5	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	39,1	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
Reproduktion (Zunahme der Anzahl Würmer pro Replikat)	EC ₅₀	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	29,7	13,9	47,9				
Wachstum (Zunahme der Biomasse pro Replikat)	EC ₅₀	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	32,2	13,6	65,2				

MDD: *Minimum Detectable Difference* (kleinster nachweisbarer Unterschied) bei den Kontrollwerten während der Hypothesenprüfung; wird als Maßstab für die statistische Aussagekraft verwendet.

LITERATUR

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. und Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test

(Validierung eines endobenthischen Sedimenttests durch einen internationalen Ringtest). In Zusammenarbeit mit R. Nagel und B. Karaoglan. Bericht an das Umweltbundesamt Berlin, FKZ 202 67 429.

C.36 Reproduktionstest mit Raubmilben (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) in Bodenproben

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 226 (2008). Sie wird zur Bewertung der Wirkung von im Boden befindlichen Chemikalien auf die Reproduktionsleistung der terrestrisch lebenden Milbenart *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* CANESTRINI (Acari: Laelapidae) verwendet und ermöglicht die Einschätzung der Hemmung der spezifischen Wachstumsrate einer Population (1,2). Als Reproduktionsleistung wird hier die Anzahl der juvenilen Tiere am Ende des Versuchs bezeichnet. *H. aculeifer* stellt eine zusätzliche trophische Ebene dar, für die Prüfmethode bereits verfügbar sind. Ein Reproduktionstest ohne Unterscheidung und Quantifizierung der verschiedenen Stufen des Reproduktionszyklus wird für den Zweck dieser Prüfmethode als angemessen betrachtet. Für Chemikalien mit einem anderen Expositionsszenarium als die Exposition über den Boden könnten andere Ansätze geeignet sein (3).
2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* wird als relevanter Vertreter der Bodenfauna im Allgemeinen und der Raubmilben im Besonderen betrachtet. Die Art kommt weltweit vor (5) und ist leicht zu beschaffen und im Labor zu züchten. Anlage 7 enthält eine Zusammenfassung zur Biologie von *H. aculeifer*. Für Hintergrundinformationen zur Ökologie der Milbenart und zu ihrer Verwendung in Ökotoxizitätsprüfungen siehe (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11) und (12).

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

3. Adulte weibliche Tiere werden verschiedenen Konzentrationen der in den Boden gemischten Prüfchemikalie ausgesetzt. Der Versuch wird mit 10 adulten Weibchen pro Replikatgefäß begonnen. Männliche Tiere werden im Test nicht verwendet, weil sich gezeigt hat, dass sich weibliche Tiere unmittelbar oder kurz nachdem sie dem Deutonymphenstadium entwachsen sind, paaren, wenn männliche Tiere verfügbar sind. Außerdem würde die Einbeziehung männlicher Tiere den Test so verzögern, dass eine (schwierige) Unterscheidung der Altersstufen erforderlich wäre. Daher ist eine Paarung der Tiere bei diesem Test nicht vorgesehen. Die weiblichen Tiere werden 28-35 Tage nach Beginn der Eiablage in der Synchronisierung in den Test einbezogen (siehe Anlage 4); zu diesem Zeitpunkt kann nämlich davon ausgegangen werden, dass die weiblichen Tiere sich bereits gepaart und die Präovipositionsperiode bereits durchlaufen haben. Bei einer Temperatur von 20 °C endet der Test an Tag 14 nach dem Einsetzen der weiblichen Tiere (Tag 0); zu diesem Zeitpunkt können die ersten juvenilen Tiere der Kontrollgruppe bereits das Deutonymphen-Stadium durchlaufen haben (siehe Anlage 4). Als wichtigste Messgrößen werden die Zahl der juvenilen Tiere pro Prüfgefäß und die Zahl der überlebenden weiblichen Tiere bestimmt. Die Reproduktionsleistung der Milben, die der Prüfchemikalie ausgesetzt waren, wird mit der Reproduktionsleistung der

Kontrollen verglichen, um je nach Prüfprotokoll (siehe Nummer 29) den EC_x-Wert (z. B. EC₁₀ oder EC₅₀) oder die höchste messbare Konzentration ohne statistisch signifikante Wirkung (NOEC - Begriffsbestimmungen siehe Anlage 1) zu ermitteln. Anlage 8 enthält einen Überblick über das Prüfprotokoll.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

4. Die Wasserlöslichkeit, der log K_{ow}-Wert, der Boden/Wasser-Verteilungskoeffizient und der Dampfdruck der Prüfchemikalie sollten möglichst bekannt sein. Wünschenswert sind zudem Informationen über den Verbleib der Chemikalie im Boden (z. B. biotischer und abiotischer Abbau).
5. Diese Prüfmethode kann wahlweise für wasserlösliche und für nicht wasserlösliche Chemikalien verwendet werden. Allerdings ist die Prüfchemikalie je nach Chemikaliertyp unterschiedlich einzubringen. Für flüchtige Chemikalien (d. h. für Chemikalien, bei denen die Henry-Konstante oder der Luft-Wasser-Verteilungskoeffizient größer als eins ist) oder für Chemikalien, bei denen der Dampfdruck bei 25 °C mehr als 0,0133 Pa beträgt, ist die Prüfmethode nicht geeignet.

VALIDITÄT DES TESTS

6. Damit ein Testergebnis als gültig gewertet werden kann, müssen die unbehandelten Kontrollen die folgenden Kriterien erfüllen:
 - Die mittlere Mortalität adulter weiblicher Tiere sollte am Ende des Tests höchstens 20 % betragen.
 - Die mittlere Anzahl an juvenilen Tieren pro Replikat (in die jeweils 10 adulte weibliche Tiere eingesetzt wurden), muss am Ende des Tests mindestens 50 betragen.
 - Der berechnete Variationskoeffizient für die Anzahl juveniler Tiere pro Replikat darf am Ende des Reproduktionstests höchstens 30 % betragen.

REFERENZCHEMIKALIE

7. Der EC_x-Wert und/oder die NOEC einer Referenzchemikalie sind zu ermitteln, um angemessene Bedingungen für den Labortest sicherzustellen und um gewährleisten zu können, dass sich die Reaktion der Testorganismen im Laufe der Zeit nicht geändert hat. Dimethoat (CAS 60-51-5) ist eine geeignete Referenzchemikalie, die sich nachweislich auf die Populationsgröße auswirkt (4). Alternativ kann als Referenzchemikalie auch Borsäure (CAS 10043-35-3) verwendet werden, für die allerdings weniger Erfahrungen vorliegen. Zwei Versuchspläne kommen in Betracht:
 - Die Referenzchemikalie kann parallel zur Toxizitätsprüfung der einzelnen Prüfchemikalien in einer einzigen Konzentration getestet werden, die zuvor in einer Dosis-Wirkungs-Studie nachweislich zu einer Reduzierung der Anzahl juveniler Tiere

um > 50 % geführt hat. In diesem Fall muss die Zahl der Replikate mit der Zahl der Kontrollen übereinstimmen (siehe Nummer 29).

- Alternativ kann die Referenzchemikalie ein- bis zweimal jährlich in einer Dosis-Wirkungs-Analyse geprüft werden. Je nach Versuchsplan können sich die Zahl der Konzentrationen und der Replikate sowie der Abstandsfaktor (siehe Nummer 29) unterscheiden; es sollte jedoch eine Wirkung im Bereich von 10-90 % erzielt werden (Abstandsfaktor 1,8). Der EC₅₀-Wert für Dimethoat basierend auf der Anzahl juveniler Tiere muss zwischen 3,0 und 7,0 mg Wirkstoff/kg Boden (bezogen auf das Trockengewicht) liegen. Nach den bislang erzielten Ergebnissen mit Borsäure müsste der EC₅₀-Wert für die Anzahl juveniler Tiere zwischen 100 und 500 mg/kg Boden (bezogen auf das Trockengewicht) liegen.

BESCHREIBUNG DES TESTS

Prüfgefäße und Apparatur

8. Für den Versuch werden Prüfgefäße aus Glas oder einem sonstigen chemisch inerten Material (bis zu einer Höhe von $\geq 1,5$ cm mit Bodensubstrat befüllt) mit einem Durchmesser von 3-5 cm und mit dicht schließendem Deckel verwendet. Vorzugsweise sollten die Gefäße einen Schraubverschluss besitzen; diese Gefäße können zweimal wöchentlich entlüftet werden. Alternativ können Deckel verwendet werden, die einen direkten Gasaustausch zwischen dem Substrat und der Atmosphäre zulassen (z. B. Gaze). Da während des gesamten Tests ein hinreichend hoher Feuchtegehalt gewährleistet sein muss, muss das Gewicht der einzelnen Prüfgefäße im Laufe des Tests kontrolliert und gegebenenfalls Wasser nachgefüllt werden. Besonders bei Gefäßen ohne Schraubverschluss kann dies wichtig sein. Wenn ein nicht transparentes Prüfgefäß verwendet wird, muss der Deckel aus einem lichtdurchlässigen Material bestehen (z. B. einer perforierten transparenten Abdeckung) und gleichzeitig dafür sorgen, dass die Milben nicht aus dem Gefäß entweichen können. Größe und Typ der Prüfgefäße hängen von der Extraktionsmethode ab (siehe Anlage 5). Wenn die Extraktion unter Wärmezufuhr unmittelbar aus dem Prüfgefäß erfolgt, kann ein Sieb mit geeigneter Maschenweite verwendet werden (das bis zur Extraktion verschlossen ist); der Boden muss tief genug sein, um das nötige Temperatur- und Feuchtegefälle zu gewährleisten.
9. Es wird die übliche Laborausrüstung insbesondere mit folgenden Bestandteilen benötigt:
 - vorzugsweise Glasgefäße mit Schraubdeckeln;
 - Trockenschrank;
 - Stereomikroskop;
 - Pinsel zum Aufnehmen der Milben
 - pH-Messgerät und Luxmeter;
 - Waagen mit geeigneter Genauigkeit;
 - geeignete Vorrichtungen zur Temperaturregelung;
 - geeignete Ausrüstung zur Feuchtigkeitsregelung (dann nicht wesentlich, wenn die Expositionsgefäße mit Deckeln verschlossen werden);

- Inkubator mit Temperaturregelung oder kleiner Raum;
- Extraktionsvorrichtung (siehe Anlage 5) (13);
- Beleuchtung von oben mit Regelung;
- Gefäße zur Aufnahme der extrahierten Milben.

Herstellung des künstlichen Bodens

10. Für diesen Test wird ein künstlicher Boden mit folgenden Bestandteilen verwendet (alle Angaben bezogen auf die Trockenmasse):

- 5 % Sphagnum-Torf, luftgetrocknet und fein gemahlen (eine Partikelgröße von 2 ± 1 mm ist annehmbar);
- 20 % Kaolin-Ton (mit einem Kaolinit-Anteil vorzugsweise von mehr als 30 %);
- ca. 74 % luftgetrockneter Industriesand (je nach erforderlichem CaCO_3 -Anteil), hauptsächlich feiner Sand mit mehr als 50 % Partikeln mit einer Größe von 50-200 μm ; die genaue Menge des Sands hängt vom CaCO_3 -Gehalt ab (s. u.); insgesamt muss ein Anteil von 75 % erreicht werden.
- < 1,0 % Calciumcarbonat (CaCO_3 , pulverisiert, Analysequalität), um einen pH-Wert von $6,0 \pm 0,5$ zu erzielen; wie viel Calciumcarbonat hinzuzugeben ist, kann vor allem von der Qualität/Beschaffenheit des Torfs abhängen (siehe Hinweis 1).

Hinweis 1: Wie viel CaCO_3 zu verwenden ist, hängt von den Bestandteilen des Bodensubstrats ab und ist unmittelbar vor Testbeginn durch Messung des pH-Werts der Unterproben des Bodens zu ermitteln (14).

Hinweis 2: Bei diesem Test hat der künstliche Boden einen anderen Torfgehalt als bei anderen Prüfmethode mit terrestrisch lebenden Organismen, wo der Torfanteil in der Regel bei 10 % liegt (z. B. (15)). Nach der EPPO (16) enthält ein typischer landwirtschaftlich genutzter Boden höchstens 5 % organische Bestandteile; die Reduzierung des Torfgehalts entspricht somit der eingeschränkten Fähigkeit eines Naturbodens zur Sorption der Prüfchemikalie an organischen Kohlenstoff.

Hinweis 3: Falls (z. B. für spezifische Tests) erforderlich, können auch natürliche Böden von nicht verunreinigten Bezugsorten als Test- und/oder Kultursubstrate dienen. Wird natürlicher Boden verwendet, sollten mindestens die Herkunft (Entnahmeort), der pH-Wert, die Textur (Partikelgrößenverteilung) und der Gehalt an organischen Bestandteilen charakterisiert werden. Soweit verfügbar, sind auch Typ und Name des Bodens nach der Bodenklassifikation anzugeben. Der Boden darf nicht kontaminiert sein. Handelt es sich bei der Prüfchemikalie um ein Metall oder eine metallorganische Verbindung, sollte auch die Kationenaustauschkapazität des natürlichen Bodens ermittelt werden. Da in der Regel kaum Hintergrundinformationen über natürliche Böden vorliegen, sollte den Validitätskriterien besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

11. Die trockenen Bestandteile des Bodens werden gründlich gemischt (z. B. in einem großen Labormischer). Zur Bestimmung des pH-Werts werden eine Mischung aus Boden und 1 mol Calciumchlorid (KCl) oder 0,01 mol Calciumchlorid-Lösung (CaCl_2 -Lösung) im Verhältnis 1:5 verwendet (siehe (14) und Anlage 3). Wenn der

Säuregrad des Bodens außerhalb des spezifizierten Bereichs liegt (siehe Nummer 10), kann der pH-Wert durch Zugabe einer geeigneten Menge CaCO_3 korrigiert werden. Ist der Boden zu alkalisch, kann der pH-Wert durch Zugabe eines größeren Anteils der Mischung mit den ersten drei der unter Nummer 10 beschriebenen Bestandteilen (aber ohne CaCO_3) korrigiert werden.

12. Die maximale Wasserhaltefähigkeit des künstlichen Bodens wird nach den in Anlage 2 beschriebenen Verfahren ermittelt. 1-7 Tage vor Beginn der Prüfung wird der trockene künstliche Boden vorgetränkt, indem so viel destilliertes oder entionisiertes Wasser hinzugegeben wird, bis etwa die Hälfte des endgültigen Wasservolumens erreicht ist (40-60 % der maximalen Wasserhaltefähigkeit). Der Feuchtegehalt wird auf 40-60 % der maximalen Wasserhaltefähigkeit eingestellt, indem die Lösung mit der Prüfchemikalie und/oder destilliertes oder entionisiertes Wasser hinzugegeben wird (siehe Nummern 16-18). Eine zusätzliche ungefähre Prüfung des Feuchtegehalts des Bodens wird vorgenommen, indem der Boden vorsichtig in der Hand gedrückt wird; bei richtigem Feuchtegehalt treten Wassertröpfchen zwischen den Fingern aus.
13. Der Feuchtegehalt des Bodens wird zu Beginn und am Ende der Prüfung durch Trocknung bei 105 °C auf ein konstantes Gewicht gemäß ISO 11465 (17) gemessen; die Messung des pH-Werts erfolgt gemäß Anlage 3 oder ISO 10390 (14). Diese Messungen sind an zusätzlichen milbenfreien Proben sowohl aus den Kontrollböden als auch aus den einzelnen Böden mit Testkonzentrationen vorzunehmen. Wenn saure oder basische Chemikalien geprüft werden, sollte der pH-Wert des Bodens nicht justiert werden. Der Feuchtegehalt ist während der gesamten Prüfung durch regelmäßiges Wiegen der Gefäße zu überwachen (siehe Nummern 20 und 24).

Wahl und Vorbereitung der Testtiere

14. In diesem Versuch wird die Art *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883) verwendet. Zum Lancieren des Tests werden adulte weibliche Milben aus einer synchronisierten Kohorte benötigt. Die Milben sind etwa 7-14 Tage nach Erreichen des adulten Stadiums, d. h. 28-35 Tage nach Beginn der Eiablage in der Synchronisation einzusetzen (siehe Nummer 3 und Anlage 4). Die Herkunft der Milben bzw. die Anbieter und die Kultivierungsbedingungen im Labor sind zu protokollieren. Wird eine Milbenkultur im Labor gehalten, sollte die Identität der jeweiligen Art mindestens einmal jährlich bestätigt werden. Ein Identifikationsblatt liegt als Anlage 6 bei.

Herstellung der Testkonzentrationen

15. Die Prüfchemikalie wird in den Boden gemischt. Organische Lösungsmittel, die zur Vorbehandlung des Bodens mit der Prüfchemikalie verwendet werden, sollten aufgrund ihrer geringen toxischen Wirkung auf die Milben gewählt werden, und im Versuchsplan ist eine angemessene Lösungsmittelkontrolle vorzusehen (siehe Nummer 29).

Wasserlösliche Prüfchemikalien

16. Eine Lösung der Prüfchemikalie wird in einer für alle Replikate einer Testkonzentration ausreichenden Menge in entionisiertem Wasser hergestellt. Dabei sollte möglichst so viel Wasser verwendet werden, dass der erforderliche Feuchtegehalt (d. h. 40-60 % der maximalen Wasserhaltefähigkeit (siehe Nummer 12)) gewährleistet ist. Jede Lösung der Prüfchemikalie wird gründlich mit einer Charge des vorgetränkten Bodens gemischt und anschließend in das Prüfgefäß gegeben.

Nicht wasserlösliche Prüfchemikalien

17. Prüfchemikalien, die nicht in Wasser, sondern nur in organischen Lösungsmitteln löslich sind, können in der kleinstmöglichen Menge eines geeigneten Trägerstoffes (z. B. Aceton) gelöst werden. Es sollen jedoch nur flüchtige Lösungsmittel verwendet werden. Werden derartige Trägerstoffe verwendet, müssen alle Testkonzentrationen und die Kontrolle dieselbe Mindestmenge dieses Trägerstoffes aufweisen. Der Trägerstoff wird aufgesprüht oder mit einer kleinen Menge (z. B. 10 g) Quarzsand gemischt. Der gesamte Sandgehalt des Substrats ist auf diese Menge zu korrigieren. Anschließend wird der Trägerstoff mindestens eine Stunde lang unter einer Abzugshaube verdunstet. Diese Mischung aus Quarzsand und Prüfchemikalie wird zum angefeuchteten Boden hinzugegeben und mit einer angemessenen Menge entionisierten Wassers gründlich vermischt, um den erforderlichen Feuchtegehalt zu erhalten. Die endgültige Mischung wird in die Prüfgefäße gegeben. Zu beachten ist, dass manche Lösungsmittel für Milben toxisch sein können. Wenn über die Toxizität des Lösungsmittels bei Milben nichts bekannt ist, wird empfohlen, eine zusätzliche Wasserkontrolle ohne Trägerstoff zu verwenden. Wird angemessen nachgewiesen, dass das Lösungsmittel (in den zu verwendenden Konzentrationen) keine Wirkung zeigt, braucht die Wasserkontrolle nicht berücksichtigt zu werden.

In Wasser und organischen Lösungsmitteln schlecht lösliche Prüfchemikalien

18. Bei in Wasser und in organischen Lösungsmitteln schlecht löslichen Chemikalien werden 2,5 g fein gemahlener Quarzsand pro Prüfgefäß (z. B. 10 g feiner Quarzsand für vier Replikate) mit der benötigten Menge Prüfchemikalie gemischt, um die gewünschte Testkonzentration zu erhalten. Der gesamte Sandanteil des Substrats sollte auf diese Menge korrigiert werden. Diese Mischung aus Quarzsand und Prüfchemikalie wird zum angefeuchteten Boden hinzugegeben und mit einer angemessenen Menge entionisierten Wassers gründlich vermischt, um den erforderlichen Feuchtegehalt zu erhalten. Die endgültige Mischung wird auf die Prüfgefäße verteilt, das Verfahren wird für alle Testkonzentrationen wiederholt und es wird eine geeignete Kontrolle hergestellt.

VERFAHREN

Testgruppen und Kontrollen

19. Für jedes Kontroll- und jedes Prüfgefäß werden jeweils zehn adulte weibliche Tiere

in 20 g künstlichem Boden (bezogen auf die Trockenmasse) empfohlen. Die Testorganismen sind innerhalb von zwei Stunden nach der Herstellung des fertigen Testsubstrats (d. h. nach Applikation der Prüfchemikalie) einzusetzen. In besonderen Fällen (z. B. wenn die Alterung ein entscheidender Faktor ist) kann die Zeitspanne zwischen der Herstellung des fertigen Testsubstrats und dem Einsetzen der Milben verlängert werden (für Einzelheiten zur Alterung siehe (18)); dies ist jedoch wissenschaftlich zu begründen.

20. Nach dem Einsetzen in den Boden werden die Milben gefüttert; danach ist (als Bezugsgröße zur Überwachung des Feuchtegehalts des Bodens während der gesamten Prüfung; siehe Nummer 24) das Ausgangsgewicht jedes Prüfgefäßes zu bestimmen. Anschließend werden die Prüfgefäße verschlossen, wie unter Nummer 8 beschrieben, und in die Prüfkammer gestellt.
21. Für jede der unter den Nummern 15-18 beschriebenen Methoden für die Applikation der Prüfchemikalie sind entsprechende Kontrollen herzustellen. Die beschriebenen Verfahren sind dieselben wie für die Herstellung der Kontrollen, außer dass keine Prüfchemikalie zugegeben wird. Folglich werden den Kontrollen gegebenenfalls organische Lösungsmittel, Quarzsand oder sonstige Trägerstoffe in denselben Konzentrationen/Mengen wie in den Prüfgefäßen zugegeben. Wird ein Lösungsmittel oder ein sonstiger Trägerstoff zur Prüfchemikalie hinzugegeben, so ist eine zusätzliche Kontrolle ohne Trägerstoff bzw. ohne Prüfchemikalie herzustellen und – falls die Toxizität des Lösungsmittels nicht bekannt ist – zu testen (siehe Nummer 17).

Prüfbedingungen

22. Die Prüftemperatur beträgt 20 ± 2 °C und wird mindestens täglich erfasst und gegebenenfalls korrigiert. Der Test wird in kontrollierten Hell-/Dunkel-Phasen (vorzugsweise 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit) mit einer Beleuchtungsstärke von 400-800 lx im Umfeld der Prüfgefäße durchgeführt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit gelten dieselben Bedingungen wie in anderen Tests zur Bestimmung der Ökotoxizität von Böden (z. B. (15)).
23. Gasaustausch wird gewährleistet, indem die (mit Schraubverschlüssen versehenen) Prüfgefäße mindestens zweimal wöchentlich entlüftet werden. Sind die Gefäße mit Gaze verschlossen, muss besonders auf den Feuchtegehalt des Bodens geachtet werden (siehe Nummern 8 und 24).
24. Der Wassergehalt des Bodensubstrats in den Prüfgefäßen wird während der gesamten Prüfung durch Wiegen kontrolliert und gegebenenfalls durch regelmäßiges Nachwässern der Gefäße (z. B. einmal wöchentlich) aufrechterhalten. Verluste werden gegebenenfalls mit entionisiertem Wasser ausgeglichen. Der Feuchtegehalt während der Prüfung darf gegenüber dem Ausgangswert höchstens um 10 % schwanken.

Fütterung

25. Käsemilben (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)) haben sich nachweislich als geeignete Futterquelle erwiesen. Kleine Collembolen (z. B. juvenile *Folsomia candida* Willem, 1902, oder *Onychiurus fimatus* (19), (20), Enchytraeen (z. B. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) oder Nematoden (z. B. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) könnten ebenfalls geeignet sein (21). Es wird empfohlen, das vorgesehene Futter vor Verwendung im Test zu prüfen. Um die Validitätskriterien zu erfüllen, müssen Art und Menge des Futters gewährleisten, dass sich eine angemessene Anzahl juveniler Tiere entwickelt (Nummer 6). Bei der Auswahl der Futtertiere ist auch die Wirkungsweise der Prüfchemikalie zu berücksichtigen. (Beispielsweise kann ein Akarizid auch für die Futtermilben giftig sein; siehe Nummer 26).
26. Futter ist *ad libitum* bereitzustellen (d. h. jedes Mal eine kleine Menge, etwa eine Spatelspitze). Dazu kann auch ein Sauger mit geringer Saugwirkung, wie er für den Collembolen-Test vorgeschlagen wird, oder ein feiner Pinsel verwendet werden. Gewöhnlich reicht es, das Futter zu Beginn der Prüfung und danach zwei- bis dreimal wöchentlich anzubieten. Wenn die Prüfchemikalie für die Futtertiere eindeutig toxisch ist, sollte häufigeres Füttern und/oder ein anderes Futter in Betracht gezogen werden.

Wahl der Testkonzentrationen

27. Vorkenntnis der Toxizität der Prüfchemikalie (z. B. aus Vorversuchen) erleichtert die Wahl geeigneter Testkonzentrationen. Falls erforderlich, wird ein Vorversuch mit fünf Konzentrationen der Prüfchemikalie im Bereich 0,1-1000 mg/kg trockener Boden mit jeweils mindestens einem Replikat für die Prüf- und die Kontrollgefäße durchgeführt. Der Vorversuch dauert 14 Tage; anschließend werden die Mortalität der adulten Milben und die Zahl der juvenilen Tiere ermittelt. Der Konzentrationsbereich im endgültigen Test sollte vorzugsweise so gewählt werden, dass er Konzentrationen umfasst, die die Zahl der juvenilen Tiere beeinflussen, das Überleben der Muttertiere aber nicht gefährden. Bei Chemikalien, die bei quasi gleichen Konzentrationen letal und subletal wirken, ist dies unter Umständen nicht möglich. Die im Test verwendeten Konzentrationen sollten in jedem Fall die Wirkungskonzentration (z. B. EC₅₀, EC₂₅ und EC₁₀) und den Konzentrationsbereich, in dem die Wirkung der Prüfchemikalie von Interesse ist, einschließen. Eine Extrapolation deutlich unterhalb der niedrigsten Konzentration, bei der eine Wirkung auf die Testorganismen auftritt, oder oberhalb der höchsten geprüften Konzentration sollte nur in Ausnahmefällen stattfinden und ist im Bericht umfassend zu begründen.

Versuchsplan

Dosis-Wirkung-Tests

28. Gestützt auf die Empfehlungen aus einem anderen Ringtest (Enchytraeen-Reproduktionstest, (22)) werden drei Versuchspläne vorgeschlagen. Die allgemeine

Eignung aller drei Pläne wurde durch das Ergebnis der *H. aculeifer*-Validierung bestätigt.

29. Bei der Festlegung der Konzentrationsspanne sollten die folgenden Aspekte berücksichtigt werden:

- Zur Ermittlung des EC_x -Wertes (z. B. EC_{10} oder EC_{50}) sind zwölf Konzentrationen zu prüfen. Empfohlen werden mindestens zwei Replikate pro Testkonzentration und sechs Replikate pro Kontrolle. Der Abstandsfaktor kann unterschiedlich sein (d. h. im erwarteten Wirkungsbereich maximal 1,8 und bei den höheren und niedrigeren Konzentrationen über 1,8).
- Zur NOEC-Bestimmung sollten mindestens fünf Konzentrationen in einer geometrischen Reihe geprüft werden. Empfohlen werden vier Replikate pro Testkonzentration plus acht Kontrollen. Die Konzentrationen dürfen sich maximal um den Faktor 2,0 unterscheiden.
- Ein kombinierter Ansatz ermöglicht die Bestimmung sowohl des NOEC- als auch des EC_x -Wertes. Empfohlen werden acht Prüfkonzentrationen in einer geometrischen Reihe sowie vier Replikate pro Prüfkonzentration plus acht Kontrollen. Die Konzentrationen dürfen sich maximal um den Faktor 1,8 unterscheiden.

Limit-Test

30. Zeigen sich im Vorversuch bei der höchsten Konzentration (1000 mg/kg trockener Boden) keine Wirkungen, kann der endgültige Reproduktionstest als Limit-Test mit der Testkonzentration 1000 mg/kg durchgeführt werden. Mit einem Limit-Test lässt sich nachweisen, dass der NOEC- oder der EC_{10} -Wert für die Reproduktionsleistung über der Limit-Konzentration liegt, während die Zahl der für den Test verwendeten Milben gleichzeitig auf ein Minimum begrenzt ist. Sowohl für den behandelten Boden als auch für die Kontrolle sind jeweils acht Replikate vorzusehen.

Testdauer und Messungen

31. Alle festgestellten Verhaltens- und morphologischen Unterschiede zwischen den Milben in der Kontrolle und den Milben in den Prüfgefäßen sind aufzuzeichnen.

32. An Tag 14 werden die überlebenden Milben unter Licht-/Wärmeeinfluss oder nach einer anderen geeigneten Methode (siehe Anlage 5) extrahiert. Juvenile (d. h. Larven, Protonymphen und Deutonymphen) und adulte Tiere werden separat gezählt. Adulte Milben, die zu diesem Zeitpunkt nicht gefunden werden, gelten als tot, wobei davon ausgegangen wird, dass die Milben vor der Bewertung abgestorben sind und sich zersetzt haben. Die Wirksamkeit der Extraktion ist ein- oder zweimal jährlich in Kontrollen mit einer bekannten Anzahl adulter und juveniler Tiere zu validieren. Sie sollte im Schnitt bei allen Entwicklungsstadien bei über 90 % liegen (siehe Anlage 5). Die Tierzahlen dürfen nicht mit Blick auf die Erfüllung des Wirksamkeitskriteriums angepasst werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

33. Für Informationen über die statistischen Methoden für die Auswertung der Testergebnisse siehe Nummern 36 bis 41 sowie OECD-Dokument 54 „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*” (31).
34. Hauptendpunkt des Tests ist die Reproduktionsleistung, in diesem Fall die Zahl der pro Prüfgefäßreplikate (mit jeweils 10 eingesetzten adulten Weibchen) produzierten juvenilen Tiere. Für die statistische Analyse müssen für jede Testkonzentration und für jede Kontrolle das arithmetische Mittel (\bar{S}) und die Varianz (s^2) der Reproduktionsleistung berechnet werden. \bar{X} und s^2 werden für ANOVA-Verfahren wie den Student-, den Dunnett- oder den Williams-Test sowie für die Berechnung der 95 %-Konfidenzgrenzen verwendet.
35. Hinweis: Dieser Hauptendpunkt entspricht der als Zahl der während der Prüfung produzierten lebenden juvenilen Tiere gemessenen Fruchtbarkeit, geteilt durch die Zahl der bei Prüfungsbeginn eingesetzten Elterntiere.
36. Die Zahl der in den unbehandelten Kontrollen überlebenden weiblichen Tiere ist ein wichtiges Validitätskriterium und muss aufgezeichnet werden. Wie schon beim Vorversuch sind im Schlussbericht auch alle anderen Anzeichen von Schadwirkungen festzuhalten.

EC_x

37. EC_x-Werte, einschließlich ihrer entsprechenden oberen und unteren 95 %-Konfidenzgrenzen, für den Parameter gemäß Nummer 34 sind nach geeigneten statistischen Methoden (z. B. Probit-Analysen, Logit- oder Weibull-Modell, Trimmed Spearman-Kärber-Methode oder einfache Interpolation (11)) zu berechnen. Ein EC_x-Wert wird ermittelt, indem ein x % des Kontrollmittelwertes entsprechender Wert in die entstandene Gleichung eingesetzt wird. Um den EC₅₀-Wert oder einen beliebigen anderen EC_x-Wert zu ermitteln, sollten die für die einzelnen Prüfgefäße berechneten Mittelwerte (\bar{x}) einer Regressionsanalyse unterzogen werden.

NOEC/LOEC

38. Zur Bestimmung der NOEC-/LOEC-Werte durch statistische Analyse sind Statistiken für jedes Gefäß erforderlich (wobei einzelne Gefäße als Replikate gelten.) Es sollten geeignete statistische Methoden angewendet werden (gemäß OECD-Dokument 54 „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*). Grundsätzlich gilt, dass Schadwirkungen der Prüfchemikalie im Vergleich zur Kontrolle im Rahmen einer einseitigen (kleineren) Hypothesenprüfung bei $p \leq 0,05$ zu untersuchen sind. Siehe Beispiele in den folgenden Absätzen.
39. Die Normalverteilung der Daten kann z. B. anhand der Kolmogorov-Smirnov-

Methode („*Goodness-of-Fit-Test*“), anhand einer Prüfung zur Ermittlung des Quotienten aus Spannweite und Standardabweichung (*range to standard deviation ratio*, R/s-Test) oder anhand des Shapiro-Wilk-Tests (zweiseitig, $p \leq 0,05$) untersucht werden. Mit dem Cochran-Test, dem Levene-Test oder dem Bartlett-Test (zweiseitig, $p \leq 0,05$) kann die Varianzhomogenität geprüft werden. Wenn die Bedingungen parametrischer Testverfahren (Untersuchung auf Normalverteilung und Varianzhomogenität) erfüllt sind, können eine einseitige Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend Multi-Comparison-Tests durchgeführt werden. Mit paarweisen Vergleichstests (z. B. dem Dunnett-t-Test) oder Step-down-Trendtests (z. B. mit dem Williams-Test bei monotoner Dosis-Wirkung-Beziehung) kann berechnet werden, ob zwischen den Kontrollen und den verschiedenen Prüfkonzentrationen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) bestehen (Auswahl des empfohlenen Tests gemäß OECD-Dokument 54 „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*). Andernfalls sollten nicht parametrische Methoden (z. B. ein U-Test mit Bonferroni-/Holm-Korrektur oder ein Jonckheere-Terpstra-Trendtest) verwendet werden, um den NOEC- und den LOEC-Wert zu bestimmen.

Limit-Test

40. Wurde ein Limit-Test (Vergleich der Kontrolle mit einer einzigen Testkonzentration) durchgeführt und sind die Bedingungen für parametrische Prüfverfahren (Normalität, Homogenität) erfüllt, können metrische Reaktionen mit dem Student-t-Test ausgewertet werden. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so kann ein t-Test (Welch-Test) für ungleiche Varianzen oder ein nicht-parametrischer Test wie der U-Test nach Mann und Whitney verwendet werden.
41. Um signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen (Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen) zu ermitteln, können die Replikate der einzelnen Kontrollen geprüft werden, wie für den Limit-Test beschrieben. Werden bei diesen Tests keine signifikanten Unterschiede festgestellt, können alle Replikate (Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen) gepoolt werden. Ansonsten sind alle Testkonzentrationen mit der Lösungsmittelkontrolle zu vergleichen.

Prüfbericht

42. Der Prüfbericht sollte zumindest folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie

- Identität der Prüfchemikalie (Charge, Los, CAS-Nummer und Reinheit);
- physikalisch-chemische Eigenschaften der Prüfchemikalie (z. B. $\log K_{ow}$, Wasserlöslichkeit, Dampfdruck und Henry-Konstante (H) sowie vorzugsweise Angaben zur Persistenz der Prüfchemikalie im Boden).

Testorganismen

- Identifizierung und Bezugsquelle der Testorganismen, Beschreibung der Aufzuchtbedingungen;
- Altersspanne der Testorganismen;

Prüfbedingungen

- Beschreibung des Prüfprotokolls und des Prüfverfahrens;
- Angaben zur Herstellung des Testbodens; detaillierte Spezifikation, wenn natürlicher Boden verwendet wird (Herkunft, Geschichte, Partikelgrößenverteilung, pH-Wert, organische Bestandteile und – falls verfügbar – Einstufung)
- maximale Wasserhaltekapazität des Bodens;
- Beschreibung des Verfahrens zur Einbringung der Prüfchemikalie in den Boden;
- nähere Angaben zu chemischen Hilfsstoffen, die zur Applikation der Prüfchemikalie verwendet wurden;
- Größe der Prüfgefäße und Trockenmasse des Testbodens pro Gefäß;
- Prüfbedingungen: Lichtintensität, Dauer der Hell-/Dunkel-Zyklen, Temperatur;
- Beschreibung der Fütterung; Typ und Menge des im Versuch verwendeten Futters; Zeitpunkte der Fütterung;
- pH-Wert und Wassergehalt des Bodens zu Beginn und während der Prüfung (Kontrolle und jede einzelne Testkonzentration);
- detaillierte Beschreibung des Extraktionsverfahrens und der Wirksamkeit des Verfahrens.

Prüfergebnisse:

- Zahl der in den einzelnen Prüfbehältern ermittelten juvenilen Tiere am Ende der Prüfung;
- Zahl der am Ende der Prüfung in den einzelnen Prüfbehältern ermittelten adulten Weibchen und abgestorbenen adulten Tiere (%);
- Beschreibung deutlicher Symptome oder ausgeprägter Verhaltensänderungen;
- Ergebnisse mit der Referenzchemikalie;
- zusammenfassende Statistik (EC_x -Werte und/oder NOEC) einschließlich der 95 %-Konfidenzgrenzen und einer Erläuterung der Berechnungsmethode;
- grafische Darstellung der Dosis-Wirkung-Beziehung;
- Abweichungen von den für diese Prüfmethode beschriebenen Verfahren und außergewöhnliche Vorkommnisse während der Prüfung.

LITERATUR

- (1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57, 21-46.
- (2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pacific Insects* 24, 259-274.
- (3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. und van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *JSS – Journal of Soils and Sediments* 3, 73-77.
- (4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2. Auflage, in: Dahl, F. (Hrsg.): *Die Tierwelt Deutschlands* 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 S.
- (5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek und V. Bukva (Hrsg.): *Modern Acarology*. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492.
- (6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). *Proc. 2nd Symp. EURAAC*: S. 241-249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio: S. 621-628.
- (8) Krogh, P.H. und Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. und van Gestel, C.A.M.: *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley Sons, Chichester, S. 239-251.
- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. und Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests – Invertebrates. In: *Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils*. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. und Tarazona, J.V. (Hrsg.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 S.
- (10) Schlosser, H.-J. und Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina).

Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

- (11) Schlosser, H.-J. und Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.
- (12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. und Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.
- (13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.
- (14) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1994). Bodenbeschaffenheit; Bestimmung des pH-Wertes, Nr. 10390. ISO, Genf.
- (15) Kapitel C.8 dieses Anhangs: Toxizität für Regenwürmer.
- (16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.
- (17) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1993). Bodenbeschaffenheit; Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehaltes auf Grundlage der Masse; Gravimetrisches Verfahren, Nr. 11465. ISO, Genf.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. und Tarazona, J.V. 2002. Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimatus* Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.
- (20) Schlosser, H.J. und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool. Beitr. N.F. 34(3):395-433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. u Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

- (22) Kapitel C.32 dieses Anhangs – Enchyträen-Reproduktionstest.
- (23) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1994). Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer – Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von *Eisenia fetida/Eisenia andrei*, Nr. 11268-2. ISO, Genf.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2. Auflage). Chapman & Hall, London, 524 S.
- (25) Dunger, W. und Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2. Aufl.). G. Fischer, Jena, 539 S.
- (26) Lesna, I. und Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with „good genes” in a soil predatory mite. *Nature* 401, 581-583.
- (27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). *Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent.* 7, 103-107.
- (28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.
- (29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). *Zoologica Poloniae* 24, 11-59.
- (30) Kevan, D.K. McE. und Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), in Nordamerika scheinbar neu aufgetreten (Acarina : Mesostigmata : Laelaptidae). *Acarologia* 6, 647-658.
- (31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD-Veröffentlichungen zu Gesundheit und Arbeitsschutz, Reihe „*Testing and Assessment*“, Nr. 54, ENV/JM/MONO(2006)18

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Die folgenden Definitionen beziehen sich auf die vorliegende Prüfmethode. (Bei dieser Prüfung werden alle Wirkungskonzentrationen als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens ausgedrückt.)

Chemikalie: Stoff oder ein Gemisch.

EC_x (Konzentration für eine Wirkung von x %): die Konzentration, die im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines bestimmten Expositionszeitraums eine x %ige Wirkung auf die Testorganismen zeigt. Ein EC₅₀-Wert ist beispielsweise eine Konzentration, bei der davon ausgegangen wird, dass sie sich innerhalb eines bestimmten Expositionszeitraums bei 50 % einer exponierten Population auf einen Prüfungsendpunkt auswirkt.

LOEC (Niedrigste messbare Konzentration mit statistisch signifikanter Wirkung): niedrigste Konzentration einer Prüfchemikalie, die im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines bestimmten Expositionszeitraums eine statistisch signifikante Wirkung ($p \leq 0,05$) zeigt.

NOEC (Höchste messbare Konzentration ohne statistisch signifikante Wirkung): die Konzentration der Prüfchemikalie, bei der keine Wirkung gemessen wird. Für diesen Test zeigt die dem NOEC-Wert entsprechende Konzentration im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines bestimmten Expositionszeitraums keine statistisch signifikante Wirkung ($p \leq 0,05$).

Prüfchemikalie: beliebiger Stoff oder beliebiges Gemisch, die bzw. das nach dieser Methode geprüft wird.

Anlage 2

BESTIMMUNG DER MAXIMALEN WASSERHALTEKAPAZITÄT DES KÜNSTLICHEN BODENS

Die folgende Methode hat sich zur Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens bewährt. Sie ist in Anhang C von ISO DIS 11268-2 (Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*)). Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung (23) beschrieben.

Mit einer geeigneten Vorrichtung zur Probenahme (Stechzylinder etc.) eine bestimmte Menge (z. B. 5 g) Prüfboden entnehmen. Den Zylinder auf der Unterseite mit Filterpapier abdecken, anschließend mit Wasser füllen und auf einem Gestell in ein Wasserbad setzen. Den Zylinder allmählich eintauchen, bis der Boden durch das Wasser bedeckt ist, und etwa drei Stunden im Wasser belassen. Da nicht alles durch die Bodenkapillare aufgenommene Wasser im Substrat gehalten werden kann, den Zylinder mit der Bodenprobe zur Entwässerung zwei Stunden in einem geschlossenen Gefäß (um eine Austrocknung zu verhindern) auf sehr feuchten, fein gemahlten Quarzsand stellen. Anschließend die Probe wiegen und bei 105 °C bis zur Massekonstanz trocknen. Die Wasserhaltekapazität (*Water Holding Capacity*, WHC) kann dann wie folgt berechnet werden:

$$\text{WHC (in \% Trockenmasse)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Dabei sind:

S = das wassergesättigte Substrat + Masse des Zylinders + Masse des Filterpapiers

T = Tara (Masse des Zylinders + Masse des Filterpapiers)

D = Trockenmasse des Substrats

Anlage 3

BESTIMMUNG DES PH-WERTES VON BÖDEN

Die folgende Methode zur Bestimmung des pH-Wertes von Böden beruht auf ISO DIS 10390: Bodenbeschaffenheit; Bestimmung des pH-Wertes (16).

Eine vorgegebene Menge Boden für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur trocknen. Eine Suspension aus (mindestens 5 g) Boden in einer 1-M-Lösung analysenreinen Kaliumchlorids (KCl) oder einer 0,01-M- Lösung analysenreinen Calciumchlorids (CaCl_2) im Verhältnis 1:5 herstellen. Anschließend die Suspension für fünf Minuten kräftig schütteln und dann mindestens 2, aber nicht länger als 24 Stunden ruhen lassen. Der pH-Wert der flüssigen Phase wird mit einem pH-Messgerät gemessen, das vor jeder Messung mit einer geeigneten Reihe an Pufferlösungen (z. B. pH 4,0 und 7,0) kalibriert wurde.

Anlage 4

ANZUCHT VON *HYPOASPIS (GEOLAE LAPS) ACULEIFER* UND LEBENSMITTELMILBEN UND SYNCHRONISIERUNG DER KULTUREN

Anzucht von *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:

Die Milben können in Kunststoffgefäßen oder in Glasgefäßen in einer Mischung aus Gips- und Holzkohlepulver im Verhältnis 9:1 angezüchtet werden. Der Gips kann erforderlichenfalls durch Zugabe einiger Tropfen destillierten oder entionisierten Wassers feucht gehalten werden. Die optimale Temperatur der Kultur liegt bei 20 ± 2 °C; die Photoperiode (Hell-/Dunkel-Phasen) ist für diese Art nicht von Bedeutung. Als Futter können Milben der Arten *Tyrophagus putrescentiae* oder *Caloglyphus sp.* verwendet werden. (Lebensmilben sind mit Vorsicht zu handhaben, da sie bei Menschen Allergien auslösen können.) Nematoden, Enchytraeen und Collembolen sind als Futter ebenfalls geeignet. Ihre Bezugsquelle sollte protokolliert werden. Der Entwicklung der Population kann mit einem einzigen weiblichen Tier gestartet werden, denn männliche Tiere entwickeln sich in unbefruchteten Eiern. Die Generationen überschneiden sich weitgehend. Ein weibliches Tier kann mindestens 100 Tage lang leben und in diesem Zeitraum etwa 100 Eier ablegen. Die höchste Ablegeleistung wird erreicht zwischen Tag 10 und Tag 40 (nach Erreichen des adulten Stadiums) und beträgt 2,2 Eier pro Weibchen⁻¹ und Tag⁻¹. Die Ausreifung eines Eis zum adulten Weibchen dauert bei einer Temperatur von 20 °C etwa 20 Tage. Es empfiehlt sich, mehrere Kulturen anzulegen und vorrätig zu halten.

Anzucht von *Tyrophagus putrescentiae*:

Die Milben werden in Glasgefäßen mit feinem Bierhefepulver gehalten, die wiederum in einen mit KNO₃-Lösung gefüllten Plastikeimer gestellt werden, damit die Milben nicht entweichen können. Futtermilben werden auf das Pulver gesetzt und anschließend mit einem Spatel vorsichtig unter das Pulver gemischt. Das Pulver ist zweimal wöchentlich zu wechseln.

Synchronisierung der Kultur:

Prüfexemplare sollten gleich alt sein (ca. 7 Tage nach Erreichen des adulten Stadiums). Bei einer Kulturtemperatur von 20 °C wird dies erreicht durch

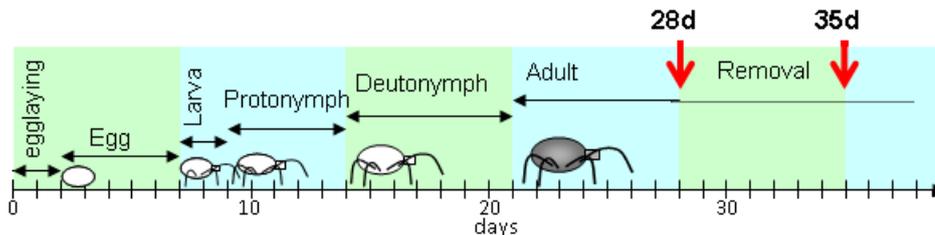
Übertragung der weiblichen Tiere in ein sauberes Kulturgefäß mit anschließender Zugabe von Futter in ausreichender Menge;

- Entnahme der weiblichen Tiere nach zwei bis drei Tagen Zeit für die Eiablage;
- Entnahme adulter Testweibchen zwischen Tag 28 und Tag 35 und Übertragung adulter Weibchen in saubere Kulturgefäße.

Adulte weibliche Tiere sind von männlichen Tieren und von anderen Entwicklungsstadien leicht zu unterscheiden - sie sind größer, aufgebläht und haben einen braunen Rückenschild (männliche Tiere sind schlanker und platter). Noch nicht

ausgereifte Tiere sind weiß bis cremefarbig. Die Entwicklungsstadien der Milben verlaufen bei einer Temperatur 20 °C etwa wie folgt (Abbildung): Eier T5, Larven T2, Protonymphen T5, Deutonymphen T7, Präovipositionsperiode T2. Danach haben die Milben das adulte Stadium erreicht.

Abbildung: Entwicklung von *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* bei 20 °C
(Entnahme = weibliche Testexemplare)



Die adulten Testexemplare werden aus der synchronisierten Kultur entnommen und 28-35 Tage nach Beginn der Eiablage durch die Muttertiere (d. h. 7-14 Tage nach Erreichen des adulten Stadiums) in die Prüfgefäße gesetzt. Dies gewährleistet, dass die Testtiere die Präovipositionsperiode bereits durchlaufen und sich mit ebenfalls im Kulturgefäß vorhandenen männlichen Tieren gepaart haben. Beobachtungen an Laborkulturen lassen darauf schließen, dass sich weibliche Tiere unmittelbar oder kurz nach Erreichen des adulten Stadiums paaren, sofern männliche Tiere vorhanden sind (Ruf, Vaninnen, pers. Beob.). Der 7-Tage-Zeitraum wurde gewählt, um die Laborarbeit zu erleichtern und unterschiedliche Entwicklungen einzelner Exemplare abfedern zu können. Die Eiablage sollte mit mindestens ebenso vielen weiblichen Tieren begonnen werden, wie letztlich für die Prüfung benötigt werden. (Werden beispielsweise 400 weibliche Tiere benötigt, sollten auch mindestens 400 weibliche Tiere zwei bis drei Tage Zeit für die Eiablage gehabt haben.) Ausgangspunkt für die synchronisierte Population sollten mindestens 1200 Eier sein (Geschlechterverhältnis ca. 0,5, Mortalität ca. 0,2). Um Kannibalismus zu vermeiden, sollten pro Gefäß nicht mehr als 20-30 Eier legende weibliche Tiere gehalten werden.

Anlage 5

EXTRAKTIONSVERFAHREN

Bei Mikroarthropoden ist Extraktion unter Wärmeeinfluss eine geeignete Methode, um die Milben aus dem Boden/dem Substrat zu locken (siehe folgende Abbildung). Da diese Methode auf aktive Organismen angewiesen ist, können ausschließlich bewegungsfähige Exemplare erfasst werden. Bei der Extraktion unter Wärmeeinfluss werden die Lebensbedingungen für die Organismen in den Gefäßen allmählich so verschlechtert, dass sie das Substrat verlassen und in eine Fixierflüssigkeit fallen (z. B. Ethanol). Entscheidend sind die Dauer der Extraktion und der Verlauf von guten über mäßige bis hin zu schlechten Lebensbedingungen. Für Ökotoxizitätsprüfungen muss die Extraktion so schnell wie möglich erfolgen, weil eine Populationsvermehrung während der Extraktion die Ergebnisse verfälschen würde. Andererseits müssen Temperatur und Feuchte der Probe stets in einem Bereich liegen, bei dem die Milben sich noch bewegen können. Die Erwärmung einer Bodenprobe bewirkt eine Austrocknung des Substrats. Erfolgt letztere zu rasch, können auch einzelne Milben austrocknen, bevor sie die Chance haben, das Substrat zu verlassen.

Daher wird folgendes Verfahren empfohlen (24) (25):

Apparatur: Tullgren-Trichter oder vergleichbare Methoden wie Extraktion nach McFadyen (Erwärmung von oben, Probe steht über einem Trichter).

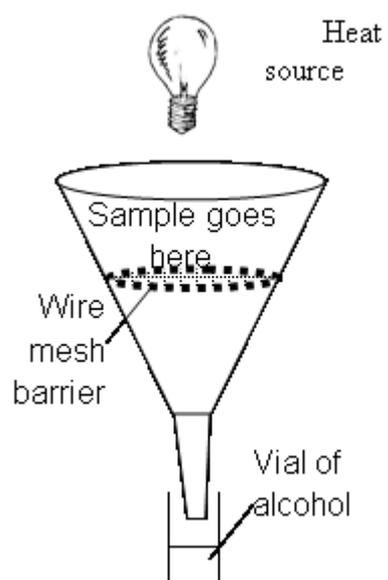
Erwärmung: 25 °C 12 h, 35 °C 12 h, 45 °C 24 h (insgesamt 48 h); die Temperatur ist im Substrat zu messen.

Fixierflüssigkeit: Ethanol (70 %).

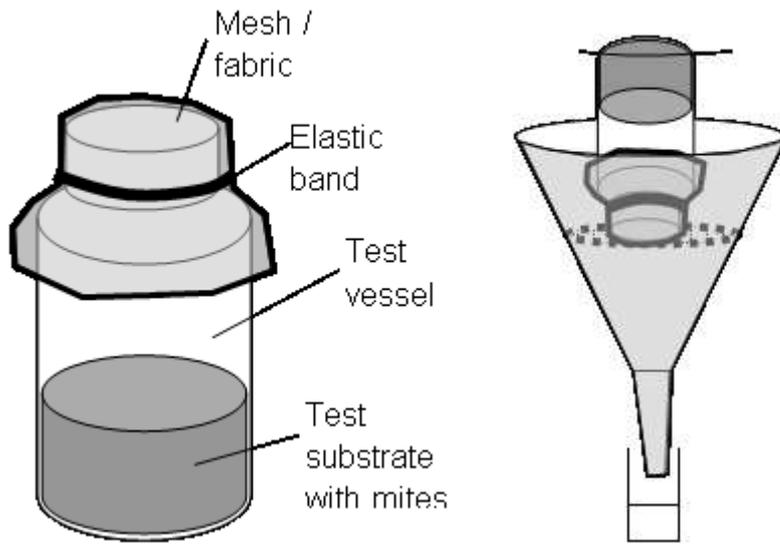
Beschreibung: Von dem für die Prüfung verwendeten Glasgefäß Deckel abnehmen und die Öffnung mit Maschendraht oder Stoff umwickeln. Den Stoff, der eine Maschenweite von 1,0-1,5 mm haben sollte, mit einem Gummiband fixieren. Danach die Flasche vorsichtig umdrehen und in die Extraktionsapparatur setzen. Die Maschenweite des Gewebes verhindert, dass das Substrat in die Fixierflüssigkeit sickert, ist aber so groß, dass die Milben die Probe verlassen können. Nach dem Einsetzen aller Gefäße mit der Erwärmung beginnen. Die Extraktion nach 48 Stunden beenden. Fixierte Gefäße entnehmen und die Milben unter einem Stereomikroskop zählen.

Die Extraktionsleistung der gewählten Methode muss sich ein- bis zweimal jährlich unter Verwendung von Gefäßen mit einer bekannten Anzahl juveniler und adulter Milben in einem unbehandelten Testsubstrat bewährt haben und sollte für alle Entwicklungsstadien zusammengerechnet bei durchschnittlich ≥ 90 % liegen.

Extraktionsapparatur mit Tullgren-Trichter



Vorbereitung des Prüfgefäßes nach Prüfungsende (vor der Extraktion)



ANLAGE 6

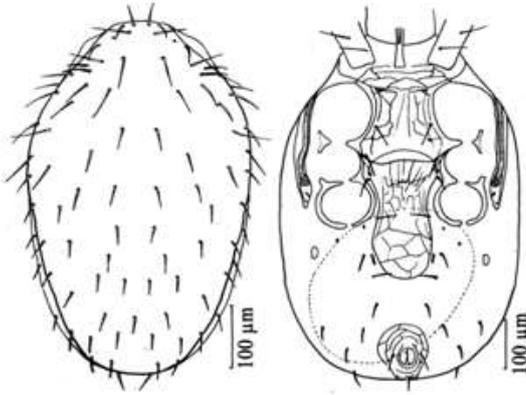
IDENTIFIZIERUNG VON *HYPOASPIS (GEOLAE LAP S) ACULEIFER*:

Unterklasse/Ordnung/ Unterordnung:	Familie:	Gattung/Untergattung/Art:
Acari/Parasitiformes/ Gamasida	Laelapidae	Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer

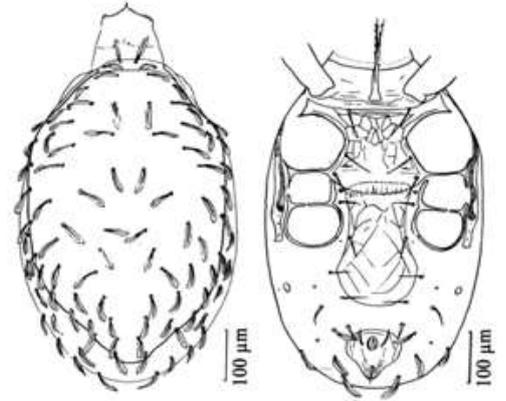
Autor und Datum:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23. Januar 2007
---------------------	---

Literatur:	Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59. Teil, 2. Überarbeitete Auflage: 1-523. Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400 S. Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 S.
------------	--

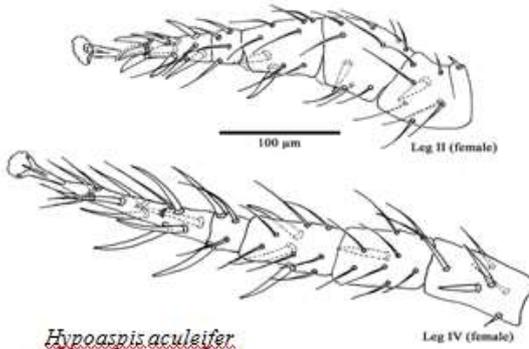
Bestimmungs merkmale:	Tectum mit abgerundetem gezähntem Rand; Hypostom mit mehr als 6 Zähnen; kaudal-dorsale Seten (Z4), nicht sehr lang; dorsale Seten, Bürsten; Genitalschild normal, nicht sehr vergrößert und nicht bis zum Analschild reichend; hintere Hälfte des Dorsalschilds unpaarige Seten, 2. und 4. Beinpaar mit dicken Makro-Seten; dorsale Seta Z5 etwa doppelt so lang wie J5; fester Chelicerenfinger mit 12-14 Zähnen und beweglicher Chelicerenfinger mit 2 Zähnen; Länge Idiosoma 520-685. <i>Hypoaspis miles</i> wird auch zur biologischen Schädlingsbekämpfung eingesetzt und könnte mit <i>H. aculeifer</i> verwechselt werden. Hauptunterschied zwischen den beiden Arten: <i>H. miles</i> gehört zur Unterart <i>Cosmolaelaps</i> und hat messerartige dorsale Seten; <i>H. aculeifer</i> hingegen gehört zur Unterart <i>Geolaelaps</i> und hat setiforme (borstenförmige) dorsale Seten.
--------------------------	--



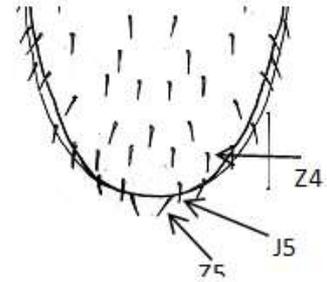
Hypoaspis aculeifer nach Hughes, 1976



Hypoaspis miles nach Hughes, 1976



Hypoaspis aculeifer.
Originalzeichnungen
F. Faraji



Hypoaspis aculeifer.
Rückenschild mit charakterist. Seten

Anlage 7

BASISINFORMATIONEN ZUR BIOLOGIE VON *HYPOASPIS (GEOLAEELAPS) ACULEIFER*

Hypoaspis aculeifer gehört zur Familie Lealapidae, Gattung Acari (Milben), Klasse Arachnida, Stamm Arthropoda. Die Milben leben in allen Arten von Böden und ernähren sich von anderen Milben, Nematoden, Enchytraeen und Collembolen (26). Bei Futtermangel kommt es zu Kannibalismus (27). Der Körper der Raubmilbe ist untergliedert in Idiosoma und Gnathosoma. Eine klare Trennung des Idiosoma in Prosoma (Kopf) und Opisthosoma (Bauch) besteht nicht. Das Gnathosoma (der Kopfschild) trägt die Mundwerkzeuge (z. B. Palpen und Cheliceren). Die dreigliedrigen Cheliceren sind mit unterschiedlich geformten Zähnen besetzt. Außer zur Nahrungsaufnahme nutzen die männlichen Tiere ihre Cheliceren vorwiegend, um die Spermatophoren auf die Weibchen zu übertragen. Ein Dorsalschild bedeckt nahezu das gesamte Idiosoma. Ein erheblicher Teil des weiblichen Idiosomas entfällt auf die Fortpflanzungsorgane, die insbesondere kurz vor der Eiablage deutlich ausgeprägt sind. Auf der Bauchseite befinden sich ebenfalls zwei Schilde: der Sternalschild und der Genitalschild. Alle Beine weisen Borsten und Stacheln auf. Die Borsten sorgen für die nötige Haftung beim Fortbewegen im oder auf dem Boden. Das erste Beinpaar hat vorwiegend Antennenfunktion. Das zweite Beinpaar dient nicht nur zur Fortbewegung, sondern auch zum Greifen der Beute. Die Dornen des vierten Beinpaars können sowohl als Schutz als auch zum „Antrieb“ dienen (28). Männliche Tiere sind 0,55-0,65 mm lang und wiegen 10-15 µg. Weibliche Tiere haben eine Länge von 0,8-0,9 mm und ein Gewicht von 50-60 µg (8) (28) (siehe Abb. 1).



Abb. 1: Weibliche und männliche Milben, Protonymphen und Larven von *H. aculeifer*.

Bei 23 °C werden die Milben nach 16 Tagen (weibliche Tiere) bzw. nach 18 Tagen (männliche Tiere) geschlechtsreif (6). Die weiblichen Tiere nehmen das Spermium über das Solenostom auf, von wo es in das Ovar gelangt. Dort werden die Spermien aufbewahrt und reifen heran. Die Befruchtung erfolgt erst nach der Ausreifung der Spermien im Ovar. Befruchtete und unbefruchtete Eier werden von den Weibchen in Klumpen oder einzeln vorzugsweise in Spalten oder Löchern abgelegt. Kopulierte Weibchen können Juvenile beider Geschlechter erzeugen; aus Eiern nicht kopulierter Weibchen gehen ausschließlich männliche Tiere hervor. Bei der Entwicklung zur adulten Phase werden vier Stadien (Ei → Larve, Larve → Protonymphen,

Protonymphe → Deutonymphe, Deutonymphe → adultes Tier) durchlaufen.

Die Eier sind milchig weiß, hyalin, elliptisch und etwa 0,37 mm lang mit fester Hülle. Nach (8) sind die Larven 0,42-0,45 mm groß. Sie haben nur drei Beinpaare. Im Kopfbereich werden Palpen und Cheliceren ausgebildet. Die Cheliceren besitzen einige wenige kleine Zähnchen; diese werden für den Schlupfvorgang genutzt. Nach der ersten Häutung, 1-2 Tage nach dem Schlüpfen, entwickeln sich die Protonymphen. Sie sind ebenfalls weiß, 0,45-0,62 mm lang (8) und haben vier Beinpaare. Die Zähne auf den Cheliceren sind vollständig ausgebildet. Ab diesem Stadium beginnen die Milben zu fressen. Dazu wird die Cuticula der Beute mit den Cheliceren durchstochen und ein Sekret für die extraintestinale Verdauung in die Beute gespritzt. Der Nahrungsbrei kann dann von der Milbe aufgesaugt werden. Die Cheliceren dienen auch dazu, größere Teilchen aus Futterklumpen zu reißen (28). Nach einer weiteren Häutung entstehen die Deutonymphen. Sie sind 0,60-0,80 mm lang (8) und gelblich bis hellbraun. Ab dieser Phase können weibliche und männliche Tiere unterschieden werden. Nach einer weiteren Ecdysis, während der die Tiere inaktiv sind und sich der braune Schild entwickelt (etwa nach 14 Tagen), ist das adulte Stadium erreicht (28) (29) (30). Die Lebenserwartung der Milben liegt bei einer Temperatur von 25 °C zwischen 48 und 100 Tagen (27).

Anlage 8

ZUSAMMENFASSUNG UND ZEITRAHMEN FÜR DIE WICHTIGSTEN VERFAHRENSSCHRITTE ZUR DURCHFÜHRUNG DES *HYPOASPIS*-TESTS

Zeit (Tage) Testbeginn = Tag 0	Verfahrensschritt / Aufgabe
Tag -35 bis -28	Übertragung der Weibchen aus der Stammkultur in saubere Gefäße, um die Synchronisierung zu starten. 2 Tage später: Entnahme der weiblichen Tiere zwei- oder dreimal wöchentlich: Bereitstellung einer ausreichenden Futtermenge
Tag -5 (+/- 2)	Herstellung des künstlichen Bodens
Tag -4 (+/- 2)	Bestimmung der Wasserhaltekapazität (WHC) des künstlichen Bodens Trocknen über Nacht Nächster Tag: Wiegen der Proben und WHC-Berechnung
Tag -4 (+/- 2)	Vortränken des künstlichen Bodens bis 20-30 % WHC
Tag 0	Beginn des Tests: Zugabe der Prüfchemikalie zum künstlichen Boden Einsetzen von 10 Weibchen je Replikat Wiegen der einzelnen Replikate Herstellung abiotischer Kontrollen (für Feuchte und pH-Wert), pro Konzentration zwei Replikate Trocknen feuchter Kontrollen über Nacht Nächster Tag: Wiegen der feuchten Kontrollen Nächster Tag: Messen des pH-Werts der getrockneten abiotischen Kontrollen
Tage 3, 6, 9, 12 (etwa)	Versorgen der einzelnen Replikate mit ausreichenden Beuteorganismen Wiegen der einzelnen Replikate und ggf. Zugabe von Verdunstungswasser
Tag 14	Beenden des Tests; Vorbereiten der Extraktion (alle Replikate) und der Extraktionsleistungskontrollen Trocknen der Kontrollen über Nacht Nächster Tag: Wiegen der Kontrollen zur Prüfung des Wassergehalts Nächster Tag: Messen des pH-Werts der getrockneten Kontrollen
Tag 16	Beenden der Extraktion
Tag 16+	Aufzeichnung der Anzahl adulter und juveniler Milben im extrahierten Material Eintragen der Ergebnisse in Tabellen Bericht über das Prüfverfahren auf Protokollbögen