

C.38. Der Amphibien-Metamorphose-Assay (AMA)

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 231 (2009). Angesichts des Risikos, dass in der Umwelt vorhandene Chemikalien Menschen und wild lebende Pflanzen und Tiere beeinträchtigen könnten, muss ein Test zum Nachweis von auf das Schilddrüsensystem von Vertebraten wirkenden Chemikalien entwickelt und validiert werden. 1998 hat die OECD eine vorrangige Aktivität zur Änderung bestehender technischer Leitlinien zum Screening und zum Testen von Chemikalien mit potenziell endokriner Wirkung initiiert. Ein Element dieser Aktivität bestand in der Entwicklung einer technischen Leitlinie für das Screening von Chemikalien, die auf das Schilddrüsensystem von Wirbeltierarten wirken. Vorgeschlagen wurde eine Verbesserung zum einen der Studie zur Toxizität bei Nagetieren nach wiederholter 28-tägiger oraler Gabe (Kapitel B.7 in diesem Anhang) und zum anderen des Amphibien-Metamorphose-Assays (AMA). Die verbesserte Prüfmethode B.7 wurde einer Validierung unterzogen; anschließend wurde eine geänderte Prüfmethode veröffentlicht. Der Amphibien-Metamorphose-Assay (AMA) wurde ebenfalls in einem umfassenden Validierungsprogramm mit Intra- und Interlaborstudien untersucht, in denen die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Tests nachgewiesen wurden (1, 2). Anschließend wurde der Test einem Peer-Review durch eine Gruppe unabhängiger Experten unterzogen (3). Diese Prüfmethode beruht auf den Erfahrungen aus Validierungsstudien zum Nachweis von auf die Schilddrüse wirkenden Chemikalien und auf Arbeiten in anderen OECD-Mitgliedsländern.

PRINZIP DER PRÜFUNG

2. Der Amphibien-Metamorphose-Assay (AMA) ist ein Test zur empirischen Bestimmung von Chemikalien, die das normale Funktionieren der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT-Achse) beeinträchtigen können. Der AMA geht von einem generalisierten Vertebratenmodell aus, das auf den konservierten Strukturen und Funktionen der HPT-Achse beruht. Der Test ist deshalb von Bedeutung, weil die Metamorphose von Amphibien einen gut untersuchten schilddrüsenbezogenen Prozess darstellt, der auf in der HPT-Achse wirksame Chemikalien reagiert; außerdem ist dieser Test der einzige Test, mit dem während der Metamorphose der Tiere überhaupt eine Schilddrüsenaktivität nachgewiesen werden kann.
3. Das allgemeine Prüfprotokoll sieht die Exposition von *Xenopus-laevis*-Larven des Stadiums 51 durch mindestens drei verschiedene Konzentrationen einer Prüfchemikalie und eine Verdünnungswasserkontrolle über einen Zeitraum von 21 Tagen vor. Für jede Testkonzentration werden vier Replikate verwendet. Zu Beginn des Tests werden bei allen Behandlungsgruppen 20 Larven pro Testbecken eingesetzt. Als Endpunkte werden die Länge der Hinterbeine, die Kopf-Rumpf-Länge, das Entwicklungsstadium, die Feuchtmasse, die Histologie der Schilddrüse und die tägliche Mortalität erfasst.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Testspezies

4. *Xenopus laevis* wird weltweit regelmäßig in Labors kultiviert und ist im Handel ohne Weiteres zu beschaffen. Bei dieser Art kann die Reproduktion ganzjährig leicht durch Injektionen von humanem Choriongonadotropin (hCG) angeregt werden; die entstehenden Larven können regelmäßig in großer Anzahl bis zu den gewünschten Entwicklungsstadien aufgezogen werden, die dann in auf bestimmte Stadien bezogenen Prüfprotokollen verwendet werden können. Die im Test zu verwendenden Larven sollten vorzugsweise von im jeweiligen Labor gezogenen adulten Tieren stammen. Alternativ (wenngleich nicht als bevorzugtes Verfahren) können auch Eier oder Embryos an die mit dem Test beauftragten Labors geschickt werden; in den Labors muss dann eine gewisse Akklimatisierungszeit vorgesehen werden. Der Versand von Larven ist bei diesem Test nicht annehmbar.

Ausrüstung und Verbrauchsmaterial

5. Zur Durchführung dieses Tests werden die folgende Ausrüstung und die folgenden Verbrauchsmaterialien benötigt:
 - a) Expositionssystem (siehe folgende Beschreibung);
 - b) Aquarien aus Glas oder Edelstahl (siehe folgende Beschreibung);
 - c) Brutbecken;
 - d) Temperaturregelung (z. B. Heiz- oder Kühlgeräte, einstellbar auf 22 ± 1 °C);
 - e) Thermometer;
 - f) binokulares Präpariermikroskop;
 - g) Digitalkamera (mit einer Auflösung von mindestens 4 Megapixeln und mit Mikroskopfunktion);
 - h) Software zur Bilddigitalisierung
 - i) Petrischale (z. B. 100 x 15 mm) oder transparente Kulturschalen aus Kunststoff in vergleichbarer Größe;
 - j) Analysewaage mit einer Messgenauigkeit von 3 Dezimalstellen (mg);
 - k) Oxi-Meter (zur Messung des gelösten Sauerstoffs);
 - l) pH-Messgerät;
 - m) Gerät zur Messung der Lichtintensität (Anzeige in lx);
 - n) verschiedene Labor-Glasgeräte und -Werkzeuge;
 - o) einstellbare Pipetten (10-5000 µl) oder Pipettensortiment in entsprechenden Größen;
 - p) Prüfchemikalie in hinreichenden Mengen zur Durchführung des Tests, vorzugsweise aus einer Charge;
 - q) Analysegeräte zur Untersuchung der zu prüfenden Chemikalien bzw. ein entsprechender Analyse-Dienstleister.

Prüfbarkeit der Chemikalie

6. Der AMA beruht auf einem Protokoll zur Exposition in Wasser, bei dem die Prüfchemikalie über ein Durchflusssystem in die Becken geleitet wird. Mit Durchflusssystemen sind jedoch Einschränkungen hinsichtlich der Chemikaliertypen verbunden, die geprüft werden können; maßgeblich sind die jeweiligen physikalischen und chemischen Eigenschaften der Chemikalie. Vor der Anwendung dieses Protokolls sind daher grundlegende Informationen zur jeweiligen Chemikalie zu beschaffen, die für die Durchführbarkeit des Tests von Bedeutung sind; außerdem ist das *OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* (4) zu konsultieren. Folgende Merkmale sind Anzeichen dafür, dass die betreffende Chemikalie in aquatischen Systemen vielleicht schwierig zu untersuchen ist: hohe Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{ow}$), hohe Flüchtigkeiten, Hydrolyse- und Photolysetendenz im Labor bei Umgebungsbeleuchtung. Ob Chemikalien geprüft werden können, hängt unter Umständen noch von weiteren Faktoren ab, die im Einzelfall ebenfalls zu berücksichtigen sind. Wenn die zu untersuchende Chemikalie mit einem Durchflusssystem nicht getestet werden kann, ist vielleicht ein System mit statischer Erneuerung geeignet. Kommt bei einer Chemikalie keine dieser beiden Möglichkeiten in Betracht, kann die Chemikalie mit diesem Protokoll nicht geprüft werden.

Expositionssystem

7. Statt eines Systems mit statischer Erneuerung ist vorzugsweise ein Durchfluss-Verdünnungssystem zu verwenden. Wenn die physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften einer Prüfchemikalie die Verwendung eines Durchfluss-Verdünnungssystems nicht zulassen, kann ein alternatives Expositionssystem (z. B. ein System mit statischer Erneuerung) eingesetzt werden. Bestandteile des Systems, die mit Wasser in Berührung kommen, müssen aus Glas, Edelstahl und/oder Polytetrafluorethylen bestehen. Wenn die Untersuchungsergebnisse nicht beeinträchtigt werden, kann allerdings auch geeignetes Kunststoffmaterial verwendet werden. Als Expositionsbecken sind Glas- oder Edelstahlaquarien mit Standrohren, einem Volumen zwischen 4,0 und 10,0 l und einer Wassertiefe von mindestens 10-15 cm zu verwenden. Das System muss für sämtliche Expositionskonzentrationen und eine Kontrolle sowie vier Replikate pro Behandlung ausgelegt sein. Der Durchfluss in die einzelnen Becken muss konstant sein; dabei sind sowohl die Aufrechterhaltung der biologischen Bedingungen als auch die Exposition durch die Chemikalie zu berücksichtigen (z. B. 25 ml/min). Die Becken mit den Prüfkonzentrationen sind im Expositionssystem randomisiert aufzustellen, um Beeinflussungen infolge der Aufstellung zu reduzieren (u. a. geringfügige Unterschiede in Temperatur oder Lichtintensität). Mit Leuchtstofflampen wird eine Photoperiode von 12 h Licht : 12 h Dunkelheit mit einer Intensität von 600-2000 lx (Lumen/m^2) auf der Wasseroberfläche hergestellt. In den Becken müssen eine Wassertemperatur von 22 ± 1 °C und ein pH-Wert von 6,5-8,5 aufrechterhalten werden; die Konzentration an gelöstem Sauerstoff in den Becken mit den verschiedenen Testkonzentrationen muss $> 3,5$ mg/l sein (> 40 % der Luftsättigung). Mindestens die Wassertemperatur, der pH-Wert und der Anteil an gelöstem Sauerstoff sind wöchentlich zu messen. Die Temperatur sollte vorzugsweise in mindestens einem Prüfgefäß kontinuierlich gemessen werden. In Anlage 1 werden die

Versuchsbedingungen des Prüfprotokolls beschrieben. Weitere Informationen zum Aufbau von Durchfluss-Expositionssystemen und/oder von Systemen mit statischer Erneuerung sind dem *ASTM Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (5) sowie den Beschreibungen allgemeiner aquatischer Toxizitätsprüfungen zu entnehmen.

Wasserqualität

8. Für den Test kann beliebiges vor Ort verfügbares Wasser (z. B. Quellwasser oder mit Aktivkohle gefiltertes Leitungswasser) verwendet werden, bei dem *X.-laevis*-Larven normal wachsen und sich entwickeln. Da die Wasserqualität je nach Standort von Region zu Region sehr unterschiedlich sein kann, ist die Wasserqualität insbesondere dann zu analysieren, wenn keine historischen Daten über die Verwendbarkeit des Wassers für die Aufzucht von *Xenopus* verfügbar sind. Besonders ist darauf zu achten, dass das Wasser frei von Kupfer, Chlor und Chloraminen ist; diese Chemikalien sind für Frösche und Larven giftig. Außerdem wird empfohlen, das Wasser auf eine Grundbelastung durch Fluorid, Perchlorat und Chlorat (bei der Desinfektion von Trinkwasser entstehende Nebenprodukte) zu untersuchen, da es sich bei den betreffenden Anionen um Substrate des Jodtransports der Schilddrüse handelt, die in erhöhten Anteilen das Ergebnis der Studie beeinflussen können. Die Analysen sind vor Beginn der Tests vorzunehmen; die genannten Anionen dürfen normalerweise in dem für den Test vorgesehenen Wasser nicht verwendet werden.

Jodkonzentration des Testwassers

9. Damit die Schilddrüse Hormone synthetisieren kann, muss für die Larven im Wasser und im Futter hinreichend Jod verfügbar sein. Gegenwärtig liegen keine empirisch ermittelten Leitlinien für mindestens erforderliche Jodkonzentrationen vor. Die Jodverfügbarkeit kann jedoch die Empfindlichkeit verändern, mit der das Schilddrüsensystem auf Wirkstoffe reagiert, die auf die Schilddrüse wirken. Es ist bekannt, dass Jod die Grundaktivität der Schilddrüse beeinflusst; dies ist bei der Auswertung der Ergebnisse histopathologischer Untersuchungen der Schilddrüse zu beachten. Daher sind Jodkonzentrationen, die in dem für den Test vorgesehenen Wasser gemessen wurden, zu protokollieren. Den verfügbaren Daten aus den Validierungsstudien zufolge hat sich das Protokoll bei Jodkonzentrationen (I) zwischen 0,5 und 10 µg/l im Testwasser als geeignet erwiesen. Im Idealfall sollte die Jodkonzentration im zu verwendenden Wasser bei 0,5 µg/l liegen. Wenn das Testwasser aus entionisiertem Wasser rekonstituiert wird, muss Jod in einer Konzentration von mindestens 0,5 µg/l hinzugegeben werden. Jegliche weitere Zugabe von Jod oder sonstigen Salzen zum Testwasser ist im Bericht zu vermerken.

Halten der Tiere

Haltung der adulten Tiere und Zucht

10. Die Haltung der adulten Tiere und die Zucht erfolgen entsprechend den Standardleitlinien; weitere Informationen sind der Standardanleitung zur Durchführung des Froschemryo-Teratogeneseassay-*Xenopus* (Fetax) (6) zu entnehmen. Diese Standardleitlinien sind ein Beispiel für geeignete Haltungs- und Zuchtverfahren; eine strenge Befolgung ist aber nicht erforderlich. Um die

Laichreifung zu induzieren, wird Paaren (3-5) von adulten weiblichen und männlichen Tieren humanes Choriongonadotropin (hCG) injiziert. Weiblichen und männlichen Exemplaren werden etwa 800 IU-1000 IU bzw. 600 IU-800 IU hCG gelöst in 0,6- bis 0,9%iger Salzlösung gespritzt. Die Zuchtpaare werden in großen Becken ohne Störungen unter statischen Bedingungen gehalten, um den Amplexus zu fördern. Die Unterseite der Brutbecken sollte jeweils einen zweiten Boden aus Edelstahl- oder Kunststoffgitter enthalten, durch den der Laich auf den Boden des Beckens sinken kann. Frösche, die am späten Nachmittag eine Injektion erhalten haben, laichen meist am Vormittag des Folgetages. Nachdem eine hinreichende Anzahl an Eiern abgelegt und befruchtet wurden, sind die adulten Tiere aus den Brutbecken zu nehmen.

Versorgung und Auswahl der Larven

11. Nachdem die adulten Tiere aus den Brutbecken genommen wurden, werden die Eier entnommen und anhand einer repräsentativen Teilprobe der Embryos aus allen Brutbecken hinsichtlich ihrer Lebensfähigkeit beurteilt. Der beste Laich (möglichst sollten 2-3 Laichproben auf ihre Qualität untersucht werden) wird aufbewahrt; die Qualität des Laichs wird anhand der zu erwartenden Lebensfähigkeit der Embryos und einer angemessenen Anzahl von Embryos (mindestens 1500) beurteilt. Alle in der Studie verwendeten Tiere sollten aus einem einzigen Laich stammen; der abgelegte Laich darf also nicht gemischt werden. Die Embryos werden in eine große flache Schale oder Schüssel gegeben, und alle offensichtlich toten oder anomal ausgebildeten Eier (siehe Definition in (5)) werden mit einer Pipette entfernt. Die gesunden Embryos aus den drei Gelegen werden in drei getrennte Brutbecken gesetzt. Vier Tage nach dem Einsetzen in die Brutbecken wird der gemessen an seiner Lebensfähigkeit und der Anzahl der geschlüpften Tiere beste Laich ausgewählt, und die Larven werden in eine geeignete Anzahl an Aufzuchtbecken mit einer Temperatur von 22 ± 1 °C gesetzt. Außerdem werden einige zusätzliche Larven in weitere Becken gesetzt, die verwendet werden können, wenn in der ersten Woche Tiere in den Aufzuchtbecken sterben. So können die Besatzdichte aufrechterhalten und Entwicklungsunterschiede innerhalb der Kohorte eines einzigen Laichs reduziert werden. Alle Aufzuchtbecken sind täglich durch Absaugen zu reinigen. Vorsichtshalber sollten keine Latexhandschuhe, sondern Handschuhe aus Vinyl oder Nitril verwendet werden. In der ersten Woche werden tote Larven täglich entfernt und durch neue Larven ersetzt, um die Besatzdichte aufrechtzuerhalten. Die Fütterung muss mindestens zweimal täglich erfolgen.
12. Vor der Exposition werden die Larven (Kaulquappen) an die Bedingungen der eigentlichen Testphase gewöhnt (Futkertyp, Temperatur, Photoperiode und Kulturmedium). Daher sollte in der Phase vor der Exposition dasselbe Kultur-/Verdünnungswasser verwendet werden wie in der Expositionsphase. Wenn die Larven vor der Exposition in einer statischen Kultur gehalten werden, ist das Kulturmedium mindestens zweimal wöchentlich vollständig zu ersetzen. Eine überhöhte Besatzdichte infolge einer zu großen Anzahl an Larven in der Phase vor der Exposition ist zu vermeiden, weil dies die Entwicklung der Larven während der anschließenden Testphase deutlich beeinträchtigen könnte. Daher sollte eine Besatzdichte von etwa 4 Larven/l Kulturmedium (statisches Expositionssystem) bzw. 10 Larven/l Kulturmedium (bei einem Durchfluss von z. B. 50 ml/min vor der Exposition bzw. im Kultursystem) nicht überschritten werden. Unter diesen Bedingungen müssten sich die Larven innerhalb von zwölf Tagen von den Stadien

45/46 bis zu Stadium 51 entwickeln. Repräsentative Larven dieser Stammpopulation sind täglich hinsichtlich ihres Entwicklungsstadiums zu prüfen, um den ungefähren Zeitpunkt für den Beginn der Exposition abschätzen zu können. Es ist sorgfältig darauf zu achten, dass Belastungen und Verletzungen der Larven minimiert werden, insbesondere beim Umsetzen der Larven, beim Reinigen der Aquarien und ganz allgemein beim Umgang mit den Larven. Belastende Umgebungsbedingungen/Maßnahmen sind zu vermeiden (beispielsweise hoher und/oder kontinuierlicher Lärm, Klopfen an die Aquarien, Schwingungen in den Aquarien, übermäßige Aktivität im Labor und rasche Änderungen der Umgebungsbedingungen (Beleuchtung, Temperatur, pH-Wert, gelöster Sauerstoff, Wasserdurchfluss usw.)). Wenn die Larven innerhalb von 17 Tagen nach der Befruchtung Stadium 51 nicht erreicht haben, ist dies möglicherweise auf übermäßige Stressbelastung zurückzuführen.

Kultivierung und Füttern der Larven

13. Während der gesamten Phase vor der Exposition (nach Nieuwkoop und Faber (NF) Stadium 45/46) (8) und während der gesamten Testdauer von 21 Tagen werden die Larven z. B. mit handelsüblichem Larvenfutter versorgt, das auch in den Validierungsstudien verwendet wird (siehe auch Anlage 1); alternativ kann auch ein sonstiges Futter verwendet werden, das sich für die Durchführung des Amphibien-Metamorphose-Assays in gleichwertiger Weise als geeignet erwiesen hat. Das Fütterungsprotokoll in der Phase vor der Exposition ist sorgfältig auf den Bedarf der sich entwickelnden Larven abzustimmen. Frisch geschlüpften Larven sind also mehrmals täglich (mindestens zweimal) kleinere Futtermengen anzubieten. Es darf jedoch nicht zu viel Futter bereitgestellt werden; ansonsten *i)* wird die Wasserqualität beeinträchtigt, und *ii)* führen Futterpartikel und Detritus zum Verstopfen der Kiemen. In den Validierungsstudien ist die tägliche Futtermenge entsprechend dem Wachstum der Larven bis auf etwa 30 mg/Tier/Tag kurz vor Beginn des Tests zu erhöhen. Das im Handel erhältliche Futter hat sich in den Validierungsstudien als geeignet erwiesen, um ein angemessenes Wachstum und eine angemessene Entwicklung von *X.-laevis*-Larven zu ermöglichen; es besteht aus feinen Partikeln, die in der Wassersäule lange Zeit gelöst bleiben und mit dem Durchfluss ausgewaschen werden. Daher ist die gesamte tägliche Futtermenge auf kleinere Portionen zu verteilen, die mindestens zweimal täglich verabreicht werden. Das Fütterungsprotokoll für dieses Futter ist Tabelle 1 zu entnehmen. Die Häufigkeit der Fütterung wird protokolliert. Das Futter kann trocken oder als mit Verdünnungswasser hergestellte Stammlösung verabreicht werden. Diese Stammlösung wird jeden zweiten Tag frisch zubereitet und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 1. Fütterungsprotokoll bei handelsüblichem Larvenfutter in den Validierungsstudien mit *X.-laevis*-Larven während der In-vivo-Phase des AMA mit einem Durchflusssystem

Studientag	Futtermenge (mg Futter/Tier/Tag)
0-4	30
5-7	40
8-10	50

11-14	70
15-21	80

Analytik

14. Vor der Durchführung einer Studie muss ausgehend von verfügbaren Informationen über die Löslichkeit, die Abbaubarkeit und die Flüchtigkeit die Stabilität der Prüfchemikalie ermittelt werden. Aus den Becken mit den Replikaten in den verschiedenen Konzentrationen werden zu Beginn des Tests (Tag 0) sowie während des Tests wöchentlich mindestens vier Proben der Testlösungen für chemische Analysen entnommen. Außerdem sollten die einzelnen Testkonzentrationen während der Vorbereitung des Systems vor Beginn des Tests analysiert werden, um das Systemverhalten zu prüfen. Ferner wird empfohlen, die Stammlösungen beim Wechseln zu analysieren, insbesondere wenn das Volumen der Stammlösung die Chemikalie nicht in hinreichender Menge für die gesamte Dauer der regelmäßigen Probenahmen enthält. Wenn Chemikalien in einzelnen oder allen im Test verwendeten Konzentrationen nicht nachgewiesen werden können, sind die Stammlösungen zu messen und die Durchflussraten des Systems zu protokollieren, um die nominellen Konzentrationen berechnen zu können.

Applikation der Chemikalie

15. Die Prüfchemikalie kann je nach physikalisch-chemischen Eigenschaften auf unterschiedliche Weise in das Testsystem eingebracht werden. Wasserlösliche Chemikalien können in Aliquoten des Testwassers in einer Konzentration gelöst werden, mit der die für den Test vorgesehene Zielkonzentration in einem Durchflusssystem erreicht wird. Chemikalien, die bei Raumtemperatur flüssig sind und sich nur beschränkt in Wasser lösen, können über Flüssig:Flüssig-Sättigungssäulen zugeführt werden. Chemikalien, die bei Raumtemperatur fest sind und sich nur beschränkt in Wasser lösen, können über Sättigungssäulen mit Glaswolle eingebracht werden (7). Vorzugsweise ist ein trägerfreies Testsystem zu verwenden; die Prüfchemikalien haben jedoch unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften, die wahrscheinlich unterschiedliche Ansätze bei der chemischen Aufbereitung des Wassers erfordern. Aus den folgenden Gründen sollten vorzugsweise weder Lösungsmittel noch Träger verwendet werden: *i)* Bestimmte Lösungsmittel können ihrerseits toxisch wirken und/oder unerwünschte oder unerwartete endokrine Reaktionen auslösen; *ii)* die Prüfung von Chemikalien oberhalb ihrer Wasserlöslichkeit (was bei Verwendung von Lösungsmitteln häufig vorkommt) kann die Genauigkeit beeinträchtigen, mit der die wirksamen Konzentrationen ermittelt werden; und *iii)* die Verwendung von Lösungsmitteln in länger dauernden Tests kann aufgrund der Aktivität von Mikroorganismen zur Entwicklung erheblicher „Biofilme“ führen. Bei schwierig zu testenden Chemikalien kann wenn unbedingt erforderlich ein Lösungsmittel eingesetzt werden; zur Ermittlung der besten Methode ist das *OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* zu konsultieren (4). Welches Lösungsmittel zu verwenden ist, hängt von den chemischen Eigenschaften der Chemikalie ab. Bei aquatischen Toxizitätstests haben sich u. a. Aceton, Ethanol, Methanol, Dimethylformamid und Triethylen-Glykol als wirksam erwiesen. Wenn ein Lösungsmittelträger verwendet wird, müssen die Lösungsmittelkonzentrationen unter der chronischen höchsten geprüften

Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkung (NOEC) liegen; die OECD-Leitlinie empfiehlt höchstens 100 µl/l; in einer kürzlich veröffentlichten Änderung wird eine Lösungsmittelkonzentration von nur 20 µl/l Verdünnungswasser empfohlen (12). Wenn Lösungsmittelträger verwendet werden, sind zusätzlich zu den Kontrollen ohne Lösungsmittel auch geeignete Lösungsmittelkontrollen zu untersuchen (sauberes Wasser). Kann eine Chemikalie nicht mit Wasser zugeführt werden (entweder aufgrund der physikalisch-chemischen Merkmale (geringe Löslichkeit) oder wegen der eingeschränkten chemischen Verfügbarkeit), kann eine Verabreichung mit dem Futter in Betracht gezogen werden. Zur Verabreichung über das Futter wurden gewisse Untersuchungen durchgeführt; dieser Expositionspfad ist allgemein aber nicht üblich. Die ausgewählte Methode ist zu dokumentieren und analytisch zu verifizieren.

Auswahl der Testkonzentrationen

Bestimmung der höchsten Testkonzentration

16. Bei diesem Test entspricht die höchste Konzentration der Löslichkeitsgrenze der Prüfchemikalie bzw. – bei akut toxischen Chemikalien – der höchsten noch verträglichen Konzentration (*Maximum Tolerated Concentration* = MTC) oder beschränkt sich auf 100 mg/l; maßgeblich ist die jeweils niedrigste Konzentration.
17. Als MTC wird die höchste Testkonzentration der Chemikalie bezeichnet, bei der die akute Mortalität weniger als 10 % beträgt. Dieser Ansatz geht davon aus, dass empirische Daten zur akuten Mortalität vorliegen, nach denen die MTC bestimmt werden kann. Die Abschätzung der MTC ist unter Umständen ungenau und setzt in der Regel einschlägige Erfahrung voraus. Die Verwendung von Regressionsmodellen dürfte der technisch solideste Ansatz für die Bestimmung der MTC sein; eine brauchbare Abschätzung der MTC kann aber auch auf vorhandenen akuten Daten beruhen; in diesem Fall ist 1/3 des akuten LC₅₀-Werts anzunehmen. Für die im Test verwendete Art liegen allerdings vielleicht keine Daten zur akuten Toxizität vor. Wenn für eine Art keine Daten zur akuten Toxizität verfügbar sind, kann ein auf 96 Stunden angelegter Test zur Ermittlung des LC₅₀-Werts mit repräsentativen Larven (d. h. mit Larven aus demselben Stadium wie die für den AMA zu verwendenden Larven) durchgeführt werden. Wenn Daten anderer aquatischer Arten verfügbar sind (z. B. ermittelte LC₅₀-Werte bei Fischen oder sonstigen Amphibienarten), kann die wahrscheinliche MTC mit entsprechender Erfahrung durch Extrapolation auf andere Arten bestimmt werden.
18. Wenn die Chemikalie nicht akut toxisch und bei einer Konzentration über 100 mg/l löslich ist, wird die Konzentration von 100 mg/l als höchste Testkonzentration (HTC = *Highest Test Concentration*) betrachtet, da diese Konzentration in der Regel als „praktisch ungiftig“ angesehen wird.
19. Methoden zur statischen Erneuerung werden zwar nicht empfohlen, können aber verwendet werden, wenn die MTC mit Durchflussmethoden nicht erreicht werden kann. Wenn Methoden zur statischen Erneuerung zur Anwendung kommen, ist die Stabilität der Konzentration der Prüfchemikalie zu dokumentieren; die Konzentration muss innerhalb der Grenzwerte der Leistungskriterien erhalten werden. Zu empfehlen ist eine Erneuerung alle 24 Stunden: Erneuerungsperioden von über 72 Stunden sind

nicht annehmbar. Außerdem müssen jeweils am Ende der Erneuerungsperioden unmittelbar vor der Erneuerung Parameter für die Wasserqualität (beispielsweise gelöster Sauerstoff, Temperatur oder pH-Wert) gemessen werden.

Testkonzentrationsbereich

20. Es werden *mindestens* drei Testkonzentrationen und eine Kontrolle mit sauberem Wasser (sowie erforderlichenfalls eine Kontrolle mit einem Trägerstoff) benötigt. Die höchste und die niedrigste Testkonzentration müssen sich mindestens um eine Größenordnung unterscheiden. Der Abstandsfaktor der Dosierungen darf höchstens 0,1 und muss mindestens 0,33 sein.

VERFAHREN

Beginn und Durchführung des Tests

Tag 0

21. Die Exposition wird begonnen, wenn in der noch nicht der Prüfchemikalie ausgesetzten Stammpopulation eine hinreichende Anzahl an Larven Entwicklungsstadium 51 (nach Nieuwkoop und Faber) (8) erreicht hat und höchstens 17 Tage nach der Befruchtung vergangen sind. Zur Auswahl der Testtiere werden gesunde und normal aussehende Larven der Stammpopulation in einem Gefäß mit einer geeigneten Menge an Verdünnungswasser gepoolt. Zur Bestimmung des Entwicklungsstadiums müssen die Larven mit einem kleinen Netz oder einem Sieb einzeln aus dem Sammelbecken entnommen und in eine durchsichtige Messkammer (z. B. eine 100-mm-Petrischale) mit Verdünnungswasser gegeben werden. Bei der Bestimmung des Stadiums sollte keine Betäubung vorgenommen werden; einzelne Larven können jedoch vor der Untersuchung mit 100 mg/l Tricainmethansulfonat (z. B. MS-222) betäubt werden, das in geeigneter Weise mit Natriumbicarbonat auf einen pH-Wert von 7,0 gepuffert wurde. Wenn das Betäubungsmittel MS-222 angewandt wird, sollten Informationen über die richtige Anwendung bei erfahrenen Labors eingeholt werden; die Methode ist zusammen mit den Testergebnissen zu protokollieren. Beim Umsetzen sind die Tiere sorgfältig zu behandeln, um Stressbelastung während der Behandlung zu minimieren und um Verletzungen zu vermeiden.
22. Das Entwicklungsstadium der Tiere wird mit einem binokularen Präpariermikroskop bestimmt. Um die Unterschiede der Entwicklungsstadien zu minimieren, müssen die jeweiligen Entwicklungsstadien möglichst genau bestimmt werden. Nach Nieuwkoop und Faber (8) ist das wichtigste Anzeichen für das Erreichen von Stadium 41 die Morphologie der Hinterbeine. Die morphologischen Merkmale der Hinterbeine sind unter dem Mikroskop zu prüfen. Anhand auffälliger morphologischer Merkmale lässt sich das Stadium zuverlässig bestimmen, umfassende Informationen zur Bestimmung des Entwicklungsstadiums der Larven sind hingegen dem vollständigen Leitfaden von Nieuwkoop und Faber (8) zu entnehmen. Eine normale Entwicklung vorausgesetzt, kann mithilfe der folgenden Tabelle die Bestimmung der Entwicklungsstadien im gesamten Test vereinfacht und standardisiert werden, indem die auffälligen morphologischen Merkmale ermittelt werden, die mit den jeweiligen Stadien

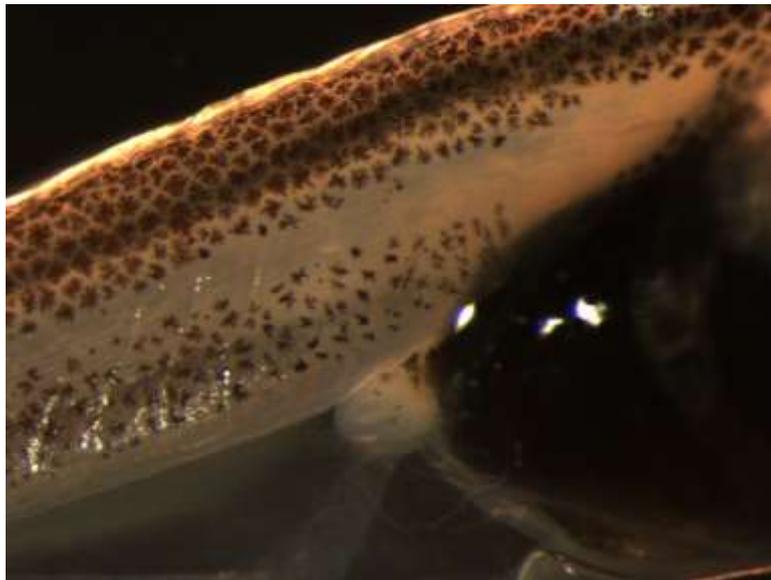
verbunden sind.

Tabelle 2. Auffällige morphologische Merkmale von Entwicklungsstadien nach der Beschreibung von Nieuwkoop und Faber

Auffällige morphologische Merkmale	Entwicklungsstadium																
	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	
Hinterbeine	X	X	X	X	X	X	X										
Vorderbeine						X	X	X	X	X							
Kraniofaziale Struktur											X	X	X	X			
Morphologie des Geruchsnerfs												X	X	X			
Schwanzlänge														X	X	X	X

23. Bei Beginn des Tests müssen alle Larven das Stadium 51 erreicht haben. Das auffälligste morphologische Merkmal dieses Entwicklungsstadiums ist die Morphologie der Hinterbeine (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1. Morphologie der Hinterbeine bei einer *X.-laevis*-Larve in Stadium 51.



24. Neben dem Entwicklungsstadium kann für die Auswahl auch die Größe der Versuchstiere berücksichtigt werden. Dazu ist die gesamte Körperlänge (nicht die Kopf-Rumpf-Länge) an Tag 0 bei einer Unterprobe von etwa 20 Larven im NF-Stadium 51 zu messen. Nach der Berechnung der mittleren Körperlänge dieser Gruppe können Mindest- und Höchstwerte für die gesamte Körperlänge der Versuchstiere zuzüglich einer Toleranz von ± 3 mm festgelegt werden (Mittelwerte der gesamten Körperlänge im Bereich von 24,0-28,1 mm für Larven im Stadium 51). Das Entwicklungsstadium ist jedoch das Hauptkriterium dafür, ob die einzelnen Tiere für den Test verwendet werden können. Larven mit offensichtlichen groben Fehlbildungen

oder Verletzungen sind vom Test auszuschließen.

25. Larven, die die oben beschriebenen Anforderungen an das Entwicklungsstadium erfüllen, werden in einem Becken mit sauberem Kulturwasser gehalten, bis die Bestimmung des Entwicklungsstadiums abgeschlossen ist. Nach der Bestimmung des Entwicklungsstadiums werden die Larven randomisiert auf die Expositionsbecken verteilt, bis sich in jedem Becken 20 Larven befinden. Danach werden die einzelnen Becken auf Tiere mit Auffälligkeiten (Verletzungen, ungewöhnliches Schwimmverhalten usw.) untersucht. Offensichtlich nicht gesunde Larven sind aus den Becken zu entfernen und durch frisch ausgewählte Larven aus dem Sammelbecken zu ersetzen.

Beobachtungen

26. Detailliertere Informationen über Verfahren zum Abschluss des Tests und zur Behandlung der Larven sind dem *OECD Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology* (9) zu entnehmen.

Messungen an Tag 7

27. An Tag 7 werden aus jedem Testbecken fünf zufällig ausgewählte Larven pro Replikat entnommen. Das Randomisierungsverfahren muss gewährleisten, dass für alle Tiere die gleiche Auswahlwahrscheinlichkeit gegeben ist. Dies kann mit einem beliebigen Randomisierungsverfahren sichergestellt werden; allerdings müssen alle Larven entnommen werden. Nicht ausgewählte Larven werden wieder in das ursprüngliche Becken gesetzt. Die ausgewählten Larven werden getötet, indem sie (z. B.) in 150-200 mg/l MS-222 (mit Natriumbicarbonat auf pH 7,0 gepuffert) eingelegt werden. Die getöteten Larven werden mit Wasser abgespült und trockengetupft; anschließend wird das Körpergewicht mit einer Genauigkeit von 1 mg bestimmt. Bei den Larven werden jeweils die Länge der Hinterbeine, die Kopf-Rumpf-Länge und (mit einem Präpariermikroskop) das Entwicklungsstadium bestimmt.

Messungen an Tag 21 (Beendigung des Tests)

28. Am Ende des Tests (an Tag 21) werden die übrigen Larven aus den Testbecken entnommen und wie oben beschrieben getötet, indem sie (z. B.) in 150-200 mg/l MS-222 (mit Natriumbicarbonat auf pH 7,0 gepuffert) eingelegt werden. Die Larven werden mit Wasser abgespült und trockengetupft; anschließend wird das Körpergewicht mit einer Genauigkeit von 1 mg bestimmt. Für die Larven werden jeweils das Entwicklungsstadium, die Kopf-Rumpf-Länge und die Länge der Hinterbeine bestimmt.
29. Alle Larven werden zur anschließenden histologischen Untersuchung entweder als Ganzkörperproben oder als Kopfgewebe-Proben, einschließlich Unterkiefer, 48-72 Stunden in Davidson-Fixierlösung gelegt. Für die histologischen Untersuchungen sind insgesamt fünf Larven pro Replikatbecken zu entnehmen. Da die Höhe der folliculären Zellen vom Entwicklungsstadium abhängt (10), sollten für die histologische Untersuchung am besten möglichst Exemplare im gleichen Entwicklungsstadium verwendet werden. Um Exemplare im gleichen Entwicklungsstadium auszuwählen, sind sämtliche Larven zunächst einer Bestimmung

des Entwicklungsstadiums zu unterziehen, bevor sie ausgewählt und anschließend zur Datenerfassung untersucht werden. Dieser Schritt ist erforderlich, weil aufgrund der normalen Entwicklungsunterschiede auch in den Becken mit den einzelnen Replikaten unterschiedliche Entwicklungsstadien erreicht werden.

30. Die für die histopathologischen Untersuchungen ausgewählten Tiere (n = 5 pro Replikat) sollten möglichst dem Median der Entwicklungsstadien der Kontrollen (gepoolte Replikate) entsprechen. Wenn sich in einzelnen Replikatbecken mehr als fünf Larven im betreffenden Stadium befinden, sind fünf Larven zufällig auszuwählen.
31. Wenn sich in Replikatbecken weniger als fünf Larven im betreffenden Stadium befinden, sind zufällig ausgewählte Larven des nächstniedrigeren oder -höheren Entwicklungsstadiums zu entnehmen (insgesamt bis zu fünf Larven pro Replikat). Vorzugsweise sollte die Entscheidung zur Untersuchung weiterer Larven aus dem nächsthöheren oder -niedrigeren Entwicklungsstadium auf einer Gesamtbewertung der Verteilung der Entwicklungsstadien in den Kontrollen und in den Becken mit den Testkonzentrationen beruhen. Wenn die Exposition eine Entwicklungsverzögerung bewirkt, sollten also zusätzliche Larven aus dem nächstniedrigeren Entwicklungsstadium verwendet werden. Bewirkt die Exposition eine schnellere Entwicklung, sollten zusätzliche Larven aus dem nächsthöheren Entwicklungsstadium verwendet werden.
32. Bei erheblichen Veränderungen in der Entwicklung der Larven infolge der Exposition gegenüber einer Prüfchemikalie gibt es unter Umständen keine Überschneidungen der Verteilung der verschiedenen Entwicklungsstadien bei den Becken mit den Prüfchemikalien mit dem berechneten Median der Entwicklungsstadien der Kontrollen. Nur in diesen Fällen ist der Auswahlprozess zu modifizieren, indem ein vom Median der Entwicklungsstadien der Kontrollen abweichendes Stadium verwendet wird, um für die histopathologische Untersuchung der Schilddrüse eine Entnahme von Larven mit übereinstimmenden Entwicklungsstadien zu erzielen. Zudem werden bei unbestimmten (d. h. asynchronen) Stadien von jedem Replikat fünf Larven zufällig zur histologischen Analyse ausgewählt. Die Entnahme von Larven, die sich nicht in einem dem Median der Entwicklungsstadien der Kontrolle entsprechenden Entwicklungsstadium befinden, ist zu protokollieren.

Bestimmung biologischer Endpunkte

33. Während der 21-tägigen Expositionsdauer werden primäre Endpunkte an den Tagen 7 und 21 gemessen; die Testtiere werden jedoch täglich einer visuellen Prüfung unterzogen. Tabelle 3 bietet einen Überblick über die Endpunkte der Messungen und die Zeitpunkte, zu denen Beobachtungen vorzunehmen sind. Detailliertere Informationen über technische Verfahren zur Messung von apikalen Endpunkten und von histologischen Untersuchungen sind den OECD-Leitfäden zu entnehmen (9).

Tabelle 3. Zeitpunkte der Beobachtungen zur Kontrolle primärer Endpunkte im AMA

Apikale Endpunkte	Täglich	Tag 7	Tag 21
- Mortalität	•		
- Entwicklungsstadium		•	•

Apikale	- Länge der Hinterbeine		•	•
	- Kopf-Rumpf-Länge		•	•
	- Feuchtmasse der Larven		•	•
	- Histologische Untersuchung der Schilddrüse			•

Endpunkte

34. Das Entwicklungsstadium, die Länge der Hinterbeine, die Kopf-Rumpf-Länge und die Feuchtmasse sind die apikalen Endpunkte des AMA; diese Endpunkte werden im Folgenden kurz erläutert. Weitere technische Informationen zur Erfassung dieser Daten sind den Leitfäden mit den Verfahren für computergestützte Analysen zu entnehmen, auf die in der Anlage verwiesen wird; die Berücksichtigung dieser Leitfäden ist zu empfehlen.

Entwicklungsstadium

35. Das Entwicklungsstadium von *X.-laevis*-Larven wird anhand der entsprechenden Kriterien von Nieuwkoop und Faber (8) bestimmt. Aufgrund von Daten zu den Entwicklungsstadien wird festgestellt, ob eine Entwicklung beschleunigt, asynchron oder verzögert verläuft oder nicht beeinträchtigt wird. Eine beschleunigte oder verzögerte Entwicklung ist aus einem Vergleich des Medians der Entwicklungsstadien der Kontrollen und der Gruppen mit den Testkonzentrationen zu erkennen. Eine asynchrone Entwicklung ist zu protokollieren, wenn die untersuchten Gewebe zwar keine Fehlbildungen oder Anomalien aufweisen, die relativen Zeitpunkte der Morphogenese oder der Entwicklung verschiedener Gewebe eines einzelnen Tieres aber uneinheitlich sind.

Länge der Hinterbeine

36. Die Differenzierung und das Wachstum der Hinterbeine werden durch Schilddrüsenhormone gesteuert und sind wesentliche Merkmale, die bereits für die Bestimmung des Entwicklungsstadiums herangezogen werden. Die Entwicklung der Hinterbeine wird bei der Bestimmung des Entwicklungsstadiums als qualitativer Aspekt berücksichtigt; hier wird sie jedoch als quantitativer Endpunkt betrachtet. Daher wird die Länge der Hinterbeine als Endpunkt gemessen, um Wirkungen auf die Schilddrüsenachse zu erkennen (Abbildung 2). Um eine konsistente Erfassung zu gewährleisten, wird immer die Länge des linken Hinterbeins ermittelt. Die Länge der Hinterbeine wird sowohl an Tag 7 als auch an Tag 21 des Tests gemessen. An Tag 7 wird die Länge bei gestrecktem Hinterbein gemessen, wie in Abbildung 2 dargestellt. An Tag 21 dagegen gestaltet sich die Messung der Hinterbeine wegen der Beugung der Beine schwieriger. An diesem Tag wird daher von der Körperwand aus über die Mittellinie des Beins und über alle Winkel gemessen. Änderungen der Hinterbeinlänge an Tag 7 werden auch dann als signifikant für eine potenzielle Aktivität der Schilddrüse betrachtet, wenn sie an Tag 21 nicht mehr auffallen. Die Längenmessungen werden anhand von Digitalfotos mithilfe einer Software zur Bildanalyse vorgenommen, wie im *OECD Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology* (9) beschrieben.

Körperlänge und Feuchtmasse

37. Im Prüfprotokoll ist die Messung der Kopf-Rumpf-Länge (KRL) (Abbildung 2) und der Feuchtmasse vorgesehen, um mögliche Wirkungen der Prüfchemikalien auf das Wachstum der Larven im Vergleich zur Kontrollgruppe beurteilen zu können; außerdem ermöglichen die Messwerte den Nachweis einer allgemeinen Toxizität der Prüfchemikalie. Da die Entfernung des anhaftenden Wassers bei Gewichtsmessungen für die Larven belastend sein und die Haut der Larven beschädigt werden kann, werden die entsprechenden Messungen an Tag 7 nur an einer Unterprobe der Larven und erst am letzten Tag des Tests (Tag 21) an allen übrigen Larven vorgenommen. Bei der Messung wird regelmäßig das kraniale Ende der Kloake als caudale Begrenzung angenommen.
38. Das Wachstum der Larven wird anhand der Kopf-Rumpf-Länge (KRL) beurteilt (siehe Abbildung 2).

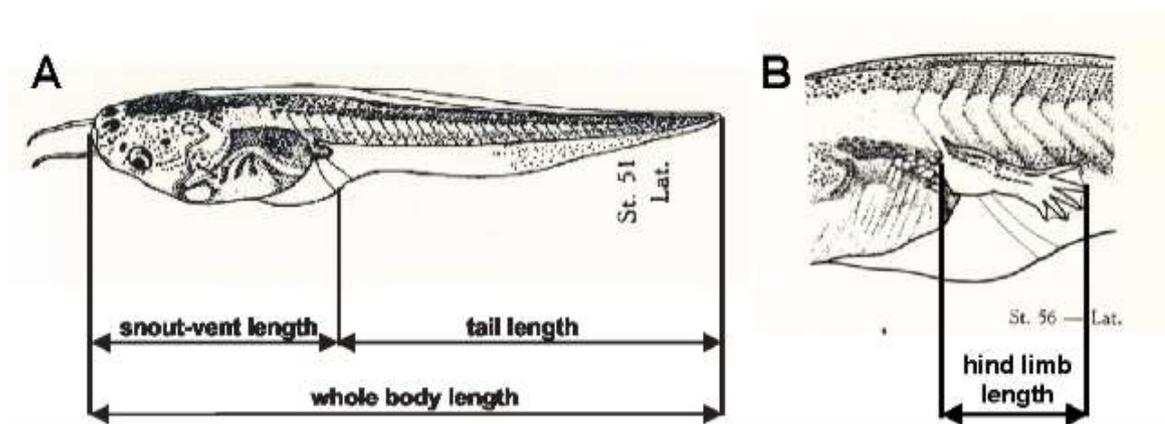


Abbildung 2. Verfahren zur Messung von (A) Körperlänge und (B) Hinterbeinlänge bei *X.-laevis*-Larven (1).

Histologische Untersuchung der Schilddrüse

39. Das Entwicklungsstadium und die Hinterbeinlänge sind wichtige Endpunkte bei der Bewertung expositionsbezogener Änderungen der Metamorphose; eine Entwicklungsverzögerung an sich kann aber nicht als diagnostischer Indikator für eine antithyroidale Aktivität betrachtet werden. Einige Änderungen sind vielleicht nur in regelmäßigen histopathologischen Analysen feststellbar. Diagnosekriterien sind u. a. eine Hypertrophie/Atrophie der Schilddrüse, eine Hypertrophie der follikulären Zellen, eine Hyperplasie der follikulären Zellen und als zusätzliche qualitative Kriterien: das Follikellumen, die Kolloidqualität und die Höhe/Form der follikulären Zellen. Die Symptome sind mit vier Schweregraden zu erfassen. Informationen über die Entnahme und die Behandlung von Proben für histologische Analysen sowie zur Durchführung histologischer Analysen von Gewebeproben sind den Veröffentlichungen „*Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 - Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation*“ und „*Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 – Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas*“ (9) zu entnehmen. Labors, die den Test zum ersten Mal durchführen, sollten sich von erfahrenen Pathologen schulen lassen, bevor sie selbst histologische Analysen und Untersuchungen der Schilddrüse vornehmen. Bei offensichtlichen und signifikanten

Änderungen der apikalen Endpunkte, die auf eine beschleunigte Entwicklung oder eine Asynchronie schließen lassen, ist eine histopathologische Analyse der Schilddrüse unter Umständen nicht erforderlich. Sind allerdings keine offensichtlichen morphologischen Änderungen oder Entwicklungsverzögerungen erkennbar, müssen histologische Analysen vorgenommen werden.

Mortalität

40. Alle Testbecken sind täglich auf tote Larven zu prüfen, und für alle Becken ist jeweils die Anzahl der toten Larven zu protokollieren. Wenn Mortalitäten festgestellt werden, sind grundsätzlich Datum, Konzentration und Beckennummer zu vermerken. Bemerkte tote Tiere sind umgehend aus den Becken zu entfernen. Mortalitäten von mehr als 10 % können auf ungeeignete Testbedingungen oder toxische Wirkungen der Prüfchemikalie hindeuten.

Zusätzliche Beobachtungen

41. Anomales Verhalten und offensichtliche erhebliche Fehlbildungen und Läsionen sind zu protokollieren. Wenn anomales Verhalten, erhebliche Fehlbildungen oder Läsionen festgestellt werden, sind grundsätzlich Datum, Konzentration und Beckennummer zu vermerken. Normal ist, wenn sich die Larven in der Wassersäule so bewegen, dass sich der Schwanz über dem Kopf befindet, die Schwanzflosse regelmäßig rhythmisch schlägt, die Tiere regelmäßig an die Wasseroberfläche kommen, durch die Kiemen atmen und auf Reize reagieren. Anomal wäre beispielsweise, wenn die Larven auf der Oberfläche treiben, am Boden des Beckens liegen, mit dem Bauch nach oben oder unregelmäßig schwimmen, nicht an die Oberfläche kommen und nicht auf Reize reagieren. Außerdem sind deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen im Hinblick auf die Futteraufnahme zu protokollieren. Erhebliche Fehlbildungen und Läsionen sind etwa morphologische Anomalien (z. B. Fehlbildungen der Beine), blutende Läsionen oder durch Bakterien oder Pilze verursachte Infektionen, um nur einige Beispiele zu nennen. Die entsprechenden Beobachtungen sind qualitativer Art; sie sind klinischen Anzeichen für Krankheiten/Stressbelastung vergleichbar und in Relation zu den Tieren in den Kontrollen zu sehen. Wenn in den Becken mit der Prüfchemikalie Fehlbildungen oder Läsionen in größerem Umfang und häufiger auftreten als in den Kontrollen, ist dies als Beleg für eine offensichtliche Toxizität zu betrachten.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Datenerfassung

42. Alle Daten sind mit elektronischen Systemen oder manuell entsprechend der guten Laborpraxis (GLP) zu erfassen. Folgende Informationen sollten ermittelt werden:

Prüfchemikalie:

- Beschreibung der Prüfchemikalie: physikalisch-chemische Merkmale; Angaben zur Stabilität und zur biologischen Abbaubarkeit;
- chemische Informationen und Daten: Methode und Häufigkeit der Herstellung von Verdünnungen; zu den Informationen über die Prüfchemikalien zählen die

tatsächlichen und die nominellen Konzentrationen der Prüfchemikalien sowie gegebenenfalls auch von Chemikalien, die nicht als Ausgangskemikalien zu betrachten sind. Die Konzentration der Prüfchemikalie muss unter Umständen in den Stammlösungen und in den Testlösungen gemessen werden;

- Lösungsmittel (wenn nicht nur Wasser verwendet wird): Begründung der Auswahl des jeweiligen Lösungsmittels und Beschreibung des Lösungsmittels (Beschaffenheit und verwendete Konzentration);

Prüfbedingungen:

- Daten zu den Prüfbedingungen: Die Daten umfassen Beobachtungen zum Funktionieren des Testsystems sowie zur Testumgebung und zur Infrastruktur. Typische Daten sind beispielsweise Umgebungstemperatur, Testtemperatur, Photoperiode, Zustand kritischer Bestandteile des Expositionssystems (z. B. Pumpen, Zykluszähler, Druckwerte), Durchflusswerte, Wasserstände, Wechsel der Vorratsflaschen und Angaben zur Fütterung. Zu den allgemeinen Parametern der Wasserqualität zählen der pH-Wert, der Anteil an gelöstem Sauerstoff, die Leitfähigkeit, der Gesamtgehalt an Jod, die Alkalität und die Härte;
- Abweichungen von der Prüfmethode: Zu erfassen sind alle Informationen über Abweichungen von der Prüfmethode; außerdem sind die Abweichungen ausführlicher zu beschreiben;

Ergebnisse:

- Biologische Beobachtungen und Daten: tägliche Beobachtungen zur Mortalität, Nahrungsaufnahme, anomalem Schwimmverhalten, Lethargie, Gleichgewichtsverlust, Fehlbildungen, Läsionen usw.; zu bestimmten vorab festgelegten Zeitpunkten sind folgende Beobachtungen und Daten zu erfassen: Entwicklungsstadium, Länge der Hinterbeine, Kopf-Rumpf-Länge und Feuchtmasse;
- statistische Analyseverfahren und Gründe für die Auswahl der verwendeten Verfahren; Ergebnisse der statistischen Analysen, vorzugsweise in tabellarischer Form;
- histologische Daten: Zu diesen Daten zählen ausführlichere Beschreibungen sowie Angaben zur Ausprägung und zur Häufigkeit bestimmter Beobachtungen, wie im Leitliniendokument zu histopathologischen Untersuchungen erläutert;
- spontane Bemerkungen: Ausführlichere Beschreibungen der Studie, die sich keiner der vorstehenden Kategorien zuordnen lassen.

Berichtlegung

43. Anlage 2 enthält Tabellen zur täglichen Datenerfassung, die als Orientierung für die Eingabe von Rohdaten und für Berechnungen zusammenfassender Statistiken verwendet werden können. Außerdem werden Tabellen zur Eingabe zusammengefasster Endpunktdaten bereitgestellt. Tabellen für histologische Bewertungen sind Anlage 2 zu entnehmen.

Leistungskriterien und Annehmbarkeit/Validität des Tests

44. Bei erheblichen Abweichungen von der Prüfmethode sind die ermittelten Daten für Beurteilungen und für Berichte im Allgemeinen nicht annehmbar. Daher wurden die folgenden Kriterien (Tabelle 4) als Leitlinien zur qualitativen Bewertung der durchgeführten Tests und des allgemeinen Verhaltens der Kontrollorganismen

entwickelt.

Tabelle 4. Leistungskriterien des AMA.

Kriterium	Annehmbare Grenzwerte
Prüfkonzentrationen	Kultivierung über eine Testdauer von 21 Tagen bei $\leq 20\%$ VK (Variabilität der gemessenen Testkonzentration)
Mortalität in Kontrollen	$\leq 10\%$ – In den Kontrollen muss die Mortalität auf zwei Larven pro Replikat begrenzt sein.
Mindest-Medianwert der Entwicklungsstadien der Kontrollen am Ende des Tests	57
Spanne der Entwicklungsstadien in der Kontrollgruppe	Das 10. und das 90. Perzentil der Verteilung der Entwicklungsstadien dürfen sich um höchstens vier Stadien unterscheiden.
Gelöster Sauerstoff	$\geq 40\%$ Luftsättigung*
pH-Wert	Der pH-Wert muss zwischen 6,5 und 8,5 gehalten werden. Die einzelnen Replikate/Konzentrationen dürfen sich höchstens um 0,5 unterscheiden.
Wassertemperatur	$22 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ – Die einzelnen Replikate/Konzentrationen dürfen sich höchstens um $0,5\text{ }^\circ\text{C}$ unterscheiden.
Testkonzentrationen ohne offensichtliche Toxizität	≥ 2
Leistungsfähigkeit der Replikate	Im gesamten Test dürfen nicht mehr als 2 Replikate beeinträchtigt sein.
Besondere Bedingungen bei Verwendung eines Lösungsmittels	Wenn ein Trägerlösungsmittel verwendet wird, sind jeweils eine Kontrolle mit dem Lösungsmittel und eine Kontrolle mit sauberem Wasser zu verwenden und die Ergebnisse zu protokollieren.
	Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen mit dem Lösungsmittel und mit dem Wasser sind in besonderer Weise zu behandeln (s. u.).
Besondere Bedingungen bei Systemen mit statischer Erneuerung	Repräsentative chemische Analysen vor und nach der Erneuerung sind im Bericht zu vermerken.
	Unmittelbar vor der Erneuerung wird der Ammoniakgehalt gemessen.
	Unmittelbar vor der Erneuerung sind alle in Anlage 1 Tabelle 1 genannten Parameter für die Wasserqualität zu messen.
	Erneuerungen sind spätestens nach 72 Stunden vorzunehmen.
	Angemessenes Fütterungsprotokoll (50 % der täglichen Menge von handelsüblichem

*Die Belüftung des Wassers kann durch Sprudler erfolgen. Die Sprudler sind auf eine Intensität einzustellen, die die Larven nicht unnötig belastet.

Validität des Tests

45. Ein Test kann dann als annehmbar/gültig betrachtet werden, wenn die folgenden Anforderungen erfüllt sind:

Ein gültiger Test ergibt hinsichtlich der Aktivität der Schilddrüse einen negativen Befund:

- (1) Bei einer Konzentration der Prüfchemikalie (und in den Kontrollen) darf die Mortalität höchstens bei 10 % liegen. In allen Replikaten muss sich die Mortalität auf drei Larven beschränken; ansonsten ist das Replikat als beeinträchtigt zu betrachten.
- (2) Für die Analysen müssen mindestens zwei Konzentrationen (sowie die betreffenden vier nicht beeinträchtigten Replikate) zur Verfügung stehen.
- (3) Für die Analysen müssen zwei Konzentrationen ohne offensichtlich toxische Wirkung verfügbar sein.

Ein gültiger Test ergibt hinsichtlich der Aktivität der Schilddrüse einen positiven Befund:

- (1) In der Kontrollgruppe muss sich die Mortalität auf zwei Larven/Replikate beschränken.

Entscheidungslogik des AMA

46. Die Entscheidungslogik wurde für den AMA entwickelt, um eine logische Struktur für die Durchführung des Bioassays und für die Interpretation der Ergebnisse bereitzustellen (siehe Flussdiagramm in Abbildung 3). In der Entscheidungslogik werden im Wesentlichen die Endpunkte gewichtet. Eine beschleunigte Entwicklung, eine asynchrone Entwicklung und die histopathologische Untersuchung der Schilddrüse werden stark gewichtet, während eine verzögerte Entwicklung, die Kopf-Rumpf-Länge und die Feuchtmasse als Parameter, die von einer potenziellen Toxizität beeinträchtigt werden könnten, weniger schwer gewichtet werden.

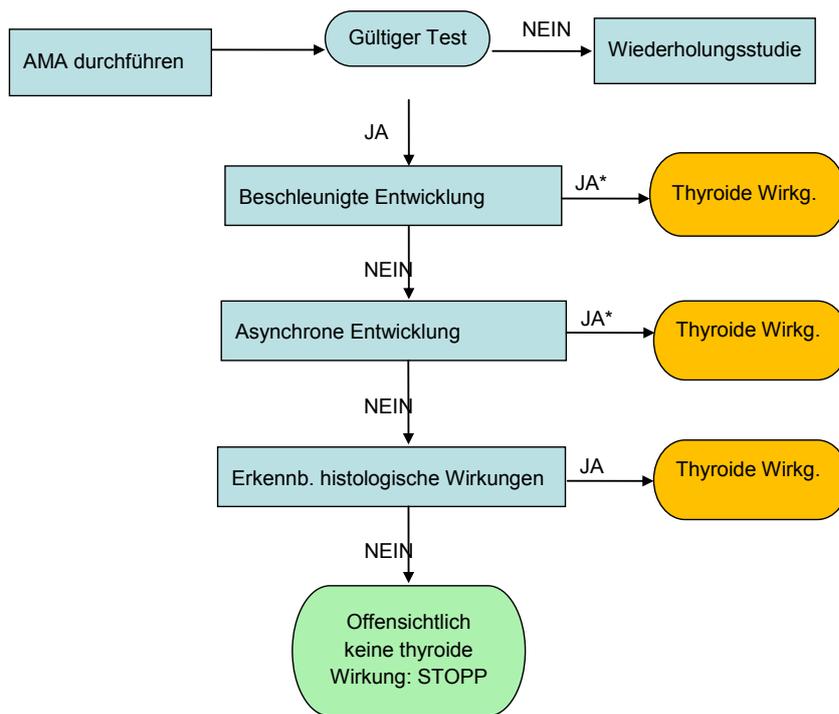


Abbildung 3. Entscheidungslogik des AMA

- * Zum Teil werden von zuständigen Behörden auch bei erheblichen Unterschieden in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien und bei asynchroner Entwicklung histologische Untersuchungen verlangt. Labors, die diesen Test vornehmen, sollten sich vor Durchführung des Tests bei den zuständigen Behörden erkundigen, welche Endpunkte verlangt werden.

Beschleunigte Entwicklung (anhand der Entwicklungsstadien sowie aufgrund der Kopf-Rumpf-Länge und der Hinterbeinlänge zu ermitteln)

47. Eine beschleunigte Entwicklung ist ausschließlich infolge von Wirkungen bekannt, die von Schilddrüsenhormonen verursacht werden. Sie kann bei peripheren Geweben auf eine unmittelbare Wechselwirkung mit dem Schilddrüsenhormonrezeptor (z. B. mit T4) oder auf Wirkungen zurückzuführen sein, die eine Änderung des Spiegels der zirkulierenden Schilddrüsenhormone nach sich ziehen können. In beiden Fällen wird dies als hinreichendes Anzeichen dafür betrachtet, dass sich die Chemikalie auf die Aktivität der Schilddrüse auswirkt. Zur Feststellung einer beschleunigten Entwicklung bestehen zwei Möglichkeiten. Erstens kann das allgemeine Entwicklungsstadium nach dem von Nieuwkoop und Faber (8) beschriebenen Standardansatz bewertet werden. Zweitens können spezifische morphologische Merkmale quantifiziert werden (z. B. die Hinterbeinlänge an den Tagen 7 und 21, die mit einer agonistischen Wirkung auf den Schilddrüsenhormonrezeptor in Zusammenhang steht). Wenn bei dem Test eine statistisch signifikant beschleunigte Entwicklung der Hinterbeinlänge festzustellen ist, ist dies ein Hinweis darauf, dass die Chemikalie auf die Schilddrüse wirkt.

48. Die Bewertung der Testtiere auf eine im Vergleich zur Kontrollpopulation beschleunigte Entwicklung beruht auf den Ergebnissen statistischer Analysen der folgenden vier Endpunkte:
- Hinterbeinlänge (normalisiert auf die KRL) an Tag 7 des Tests
 - Hinterbeinlänge (normalisiert auf die KRL) an Tag 21 des Tests
 - Entwicklungsstadium an Tag 7 des Tests
 - Entwicklungsstadium an Tag 21 des Tests
49. Die statistischen Analysen der Hinterbeinlängen sind anhand der Länge des linken Hinterbeins vorzunehmen. Die Hinterbeinlänge wird entsprechend dem Verhältnis der Hinterbeinlänge zur Kopf-Rumpf-Länge eines Exemplars normalisiert. Danach wird der Mittelwert der normalisierten Werte der einzelnen Konzentrationen verglichen: Anzeichen für eine beschleunigte Entwicklung ist ein signifikanter Anstieg der mittleren Hinterbeinlänge (normalisiert) in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 7 und/oder Tag 21 des Tests (siehe Anlage 3).
50. Die statistischen Analysen der Entwicklungsstadien werden vorgenommen, nachdem die Entwicklungsstadien aufgrund der von Nieuwkoop und Faber beschriebenen morphologischen Kriterien (8) bestimmt wurden. Eine beschleunigte Entwicklung ist dann gegeben, wenn an Tag 7 und/oder Tag 21 des Tests bei der multiquantalen Analyse ein signifikanter Anstieg der Werte eines Entwicklungsstadiums in einer Behandlungsgruppe festgestellt wird.
51. Beim AMA wird eine signifikante Wirkung auf einen der vier oben genannten Endpunkte als hinreichender Beleg für eine beschleunigte Entwicklung betrachtet. Signifikante Wirkungen auf die Hinterbeinlänge zu einem bestimmten Zeitpunkt müssen also nicht durch signifikante Wirkungen auf die Hinterbeinlänge zu anderen Zeitpunkten oder auf das Entwicklungsstadium zum betreffenden Zeitpunkt bestätigt werden. Und signifikante Wirkungen auf das Entwicklungsstadium zu einem bestimmten Zeitpunkt müssen also nicht durch signifikante Wirkungen auf das Entwicklungsstadium zu anderen Zeitpunkten oder durch signifikante Wirkungen auf die Hinterbeinlänge zum betreffenden Zeitpunkt bestätigt werden. Die Anzeichen für eine beschleunigte Entwicklung gewinnen jedoch an Bedeutung, wenn signifikante Wirkungen für mehrere Endpunkte festgestellt werden.

Asynchrone Entwicklung (ermittelt anhand von Kriterien zur Bestimmung des Entwicklungsstadiums)

52. Eine asynchrone Entwicklung ist durch die Unterbrechung der relativen zeitlichen Entwicklung der Morphogenese oder durch die Entwicklung unterschiedlicher Gewebe bei einer einzelnen Larve gekennzeichnet. Wenn das Entwicklungsstadium eines Organismus aufgrund der für ein bestimmtes Stadium als typisch betrachteten morphologischen Endpunkte nicht bestimmt werden kann, durchlaufen die Gewebe eine asynchrone Metamorphose. Eine asynchrone Entwicklung ist ein Anzeichen für eine Aktivität der Schilddrüse. Die einzigen bekannten Wirkungen, die eine asynchrone Entwicklung verursachen können, sind Wirkungen von Chemikalien auf periphere Schilddrüsenhormone und/oder auf den Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone bei der Ausbildung von Geweben, wie dies beispielsweise bei Deiodinaseinhibitoren zu beobachten ist.

53. Die Bewertung von Testtieren hinsichtlich einer asynchronen Entwicklung im Vergleich zur Kontrollpopulation beruht auf einer groben morphologischen Beurteilung der Testtiere an Tag 7 und an Tag 21 des Tests.
54. Die Beschreibung der normalen Entwicklung von *Xenopus laevis* durch Nieuwkoop und Faber (8) bietet den Rahmen für die Bestimmung der Abfolge einer normalen Gewebebildung. Der Begriff „asynchrone Entwicklung“ bezieht sich speziell auf die Abweichungen von der allgemeinen morphologischen Entwicklung der Larven, die die Bestimmung eines Entwicklungsstadiums nach den Kriterien von Nieuwkoop und Faber (8) unmöglich machen, weil wesentliche morphologische Merkmale unterschiedlichen Stadien zuzuordnen sind.
55. Entsprechend dem Wortsinn des Begriffs der „asynchronen Entwicklung“ sind nur die Fälle zu berücksichtigen, in denen hinsichtlich der Bildung bestimmter Gewebe im Vergleich zu anderen Geweben Unterschiede festzustellen sind. Einige klassische Phänotypen sind die verzögerte oder fehlende Entwicklung der vorderen Extremitäten trotz normaler oder sogar rascher voranschreitender Ausprägung der Hinterbeine und des Schwanzgewebes oder die vorzeitige Resorption der Kiemen gemessen an der Morphogenese der Hinterbeine und der Resorption des Schwanzes. Die Entwicklung eines Tieres wird dann als asynchron bewertet, wenn ein Tier keinem bestimmten Stadium zugeordnet werden kann, weil wesentliche Kriterien für ein Entwicklungsstadium nach Nieuwkoop und Faber (8) mehrheitlich nicht erfüllt sind oder weil die Ausprägung eines oder mehrerer wesentlicher Merkmale erheblich verzögert oder beschleunigt ist (z. B. Schwanz vollständig resorbiert, Vorderbeine aber noch nicht durchgebrochen). Bei der entsprechenden qualitativen Beurteilung sind sämtliche von Nieuwkoop und Faber (8) genannten Merkmale zu berücksichtigen. Die Entwicklungsstadien der verschiedenen wesentlichen beobachteten Merkmale der Tiere brauchen allerdings nicht protokolliert zu werden. Wenn bei einem Tier eine asynchrone Entwicklung festgestellt wurde, werden die Tiere keinem Entwicklungsstadium nach Nieuwkoop und Faber (8) zugeordnet.
56. Ein entscheidendes Kriterium für die Einstufung anomaler morphologischer Entwicklungen als „asynchrone Entwicklung“ ist eine Störung des relativen zeitlichen Verlaufs des Gewebebaus und der Morphogenese von Geweben ohne offensichtliche Anomalie der Morphologie der betreffenden Gewebe an sich. Eine erhebliche morphologische Anomalie ist beispielsweise gegeben, wenn die Morphogenese der Hinterbeine gemessen an der Entwicklung anderer Gewebe das Kriterium der „asynchronen Entwicklung“ erfüllt; fehlende Hinterbeine, anomale Fehlentwicklung von Fingern oder Zehen (z. B. Ektrodaktylie oder Polydaktylie) oder sonstige offensichtliche Fehlbildungen der Extremitäten sind hingegen nicht als „asynchrone Entwicklung“ zu bewerten.
57. In diesem Zusammenhang gelten etwa die Morphogenese der Hinter- und der Vorderbeine, der Durchbruch der Vorderbeine, das Stadium der Schwanzresorption (sowie insbesondere die Resorption der Schwanzflosse) und die Morphologie des Kopfes (z. B. die Größe der Kiemen und das Stadium der Kiemenresorption, die Morphologie des Unterkiefers und das Hervortreten des Meckelschen Knorpels) als wesentliche morphologische Merkmale, die hinsichtlich der zeitlich abgestimmten Metamorphose bewertet werden müssen.

58. Je nach Art der chemischen Wirkung können unterschiedliche allgemeine morphologische Phänotypen auftreten. Klassische Phänotypen sind die verzögerte oder fehlende Entwicklung der vorderen Extremitäten trotz normaler oder sogar rascher voranschreitender Entwicklung der Hinterbeine und des Schwanzgewebes oder die Resorption der Kiemen vor der Entwicklung der Hinterbeine und dem Umbau des Schwanzes.

Histopathologie

59. Wenn eine Chemikalie keine offensichtlich toxische Wirkung verursacht, die Entwicklung nicht beschleunigt und nicht zu asynchroner Entwicklung führt, wird die Histopathologie der Schilddrüsen gemäß dem betreffenden Leitliniendokument (9) bewertet. Eine verzögerte Entwicklung ohne feststellbare toxische Wirkung ist ein starker Indikator für eine Wirkung auf die Schilddrüse; die Analyse aufgrund der Entwicklungsstadien ist jedoch weniger empfindlich und hat eine geringere diagnostische Aussagekraft als die histopathologische Analyse der Schilddrüse. In diesem Fall müssen daher die Schilddrüsen histopathologisch untersucht werden. Wirkungen auf die Histologie der Schilddrüse wurden auch ohne begleitende Wirkungen auf die Morphologie nachgewiesen. Wenn in histopathologischen Untersuchungen der Schilddrüse Veränderungen festgestellt werden, ist festzustellen, dass die betreffende Chemikalie auf die Schilddrüse wirkt. Werden keine Entwicklungsverzögerungen oder histologische Läsionen an den Schilddrüsen festgestellt, wird davon ausgegangen, dass die Chemikalie nicht auf die Schilddrüse wirkt. Die Schilddrüse wird nämlich durch TSH gesteuert, und alle Chemikalien, die auf zirkulierende Schilddrüsenhormone so wirken, dass sie die TSH-Sekretion verändern, führen zu histopathologischen Veränderungen der Schilddrüse. Das zirkulierende Schilddrüsenhormon kann auf verschiedene Weise und durch unterschiedliche Mechanismen verändert werden. Der Hormonspiegel der Schilddrüse ist zwar ein Anzeichen für eine Wirkung auf die Schilddrüse; er ist jedoch nicht hinreichend, um festzustellen, auf welche Weise oder über welchen Mechanismus die betreffende Reaktion erfolgt.
60. Da dieser Endpunkt nicht ohne weiteres mit grundlegenden statistischen Ansätzen analysiert werden kann, ist eine auf die Exposition gegenüber einer Chemikalie zurückzuführende Wirkung durch einen sachverständigen Pathologen festzustellen.

Verzögerte Entwicklung (anhand der Entwicklungsstadien sowie anhand von Hinterbeinlänge, Körpergewicht und Kopf-Rumpf-Länge zu ermitteln)

61. Eine verzögerte Entwicklung kann durch auf die Schilddrüse wirkende Mechanismen und durch indirekte Toxizität bedingt sein. Geringe Entwicklungsverzögerungen in Verbindung mit offensichtlichen Anzeichen für eine toxische Wirkung lassen auf eine unspezifische toxische Wirkung schließen. Die Bewertung einer nicht auf die Schilddrüse wirkenden Toxizität ist ein wesentlicher Bestandteil des Tests, der dazu dienen soll, die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse zu reduzieren. Übermäßige Mortalität ist ein offensichtliches Anzeichen für anderweitige toxische Mechanismen. Auch geringe Wachstumsbeeinträchtigungen, die z. B. aufgrund der Feuchtmasse und/oder der Kopf-Rumpf-Länge festgestellt werden, lassen auf eine nicht auf die Schilddrüse wirkende Toxizität schließen. Ein offensichtlich stärkeres Wachstum ist häufig bei Chemikalien zu beobachten, die die normale Entwicklung

beeinträchtigen. Entsprechend deutet das Vorkommen größerer Tiere nicht zwangsläufig auf eine nicht auf die Schilddrüse wirkende Toxizität hin. Das Wachstum sollte jedoch nie der einzige Parameter sein, auf den sich die Feststellung einer Toxizität für die Schilddrüse stützt. Um eine Wirkung auf die Schilddrüse konstatieren zu können, sollten zusätzlich zum Wachstum auch das Entwicklungsstadium und die Ergebnisse einer histopathologischen Untersuchung der Schilddrüse herangezogen werden. Bei der Feststellung einer offensichtlichen Toxizität sind auch andere Endpunkte zu berücksichtigen, u. a. Ödeme, hämorrhagische Läsionen, Lethargie, verringerte Nahrungsaufnahme und erratisches/verändertes Schwimmverhalten. Wenn bei allen Testkonzentrationen Anzeichen einer offensichtlichen Toxizität festgestellt werden, ist die Prüfchemikalie zunächst einer erneuten Bewertung bei niedrigeren Konzentrationen zu unterziehen, bevor entschieden wird, ob die Chemikalie potenziell auf die Schilddrüse wirkt oder keine Wirkung auf die Schilddrüse hat.

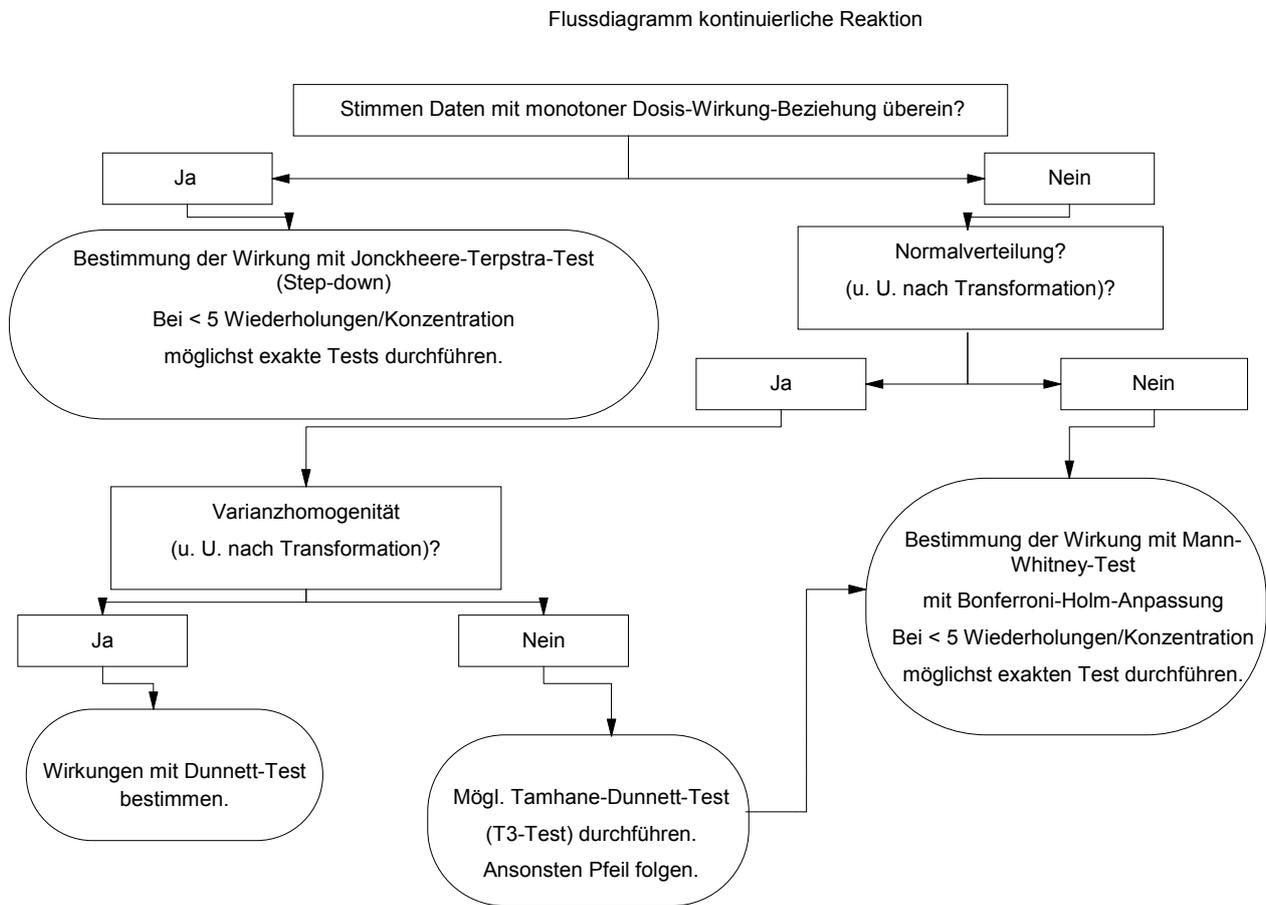
62. Statistisch signifikante Entwicklungsverzögerungen ohne sonstige Anzeichen einer offensichtlichen Toxizität deuten auf eine Wirkung der jeweiligen Chemikalie auf die Schilddrüse hin (als Antagonist). Wenn keine starken statistischen Abhängigkeiten bestehen, kann dieser Befund durch Ergebnisse einer histopathologischen Untersuchung der Schilddrüse bestätigt werden.

Statistische Analysen

63. Statistische Datenanalysen sollten nach den Verfahren im Dokument „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*“ (11) durchgeführt werden. Für alle kontinuierlichen quantitativen Endpunkte (Hinterbeinlänge, Kopf-Rumpf-Länge, Feuchtmasse), die mit einer monotonen Dosis-Wirkungs-Beziehung einhergehen, ist der Jonckheere-Terpstra-Test (Step-down) vorzunehmen, um eine signifikante Wirkung infolge der Exposition feststellen zu können.
64. Wenn kontinuierliche Endpunkte nicht im Einklang mit einer monotonen Dosis-Wirkungs-Beziehung stehen, sind die Daten auf Normalverteilung (vorzugsweise mit dem Shapiro-Wilk- oder dem Anderson-Darling-Test) und auf Varianzhomogenität (vorzugsweise mit dem Levene-Test zu prüfen). Beide Tests werden mit den Residuen einer ANOVA durchgeführt. Anstelle der Durchführung dieser förmlichen Tests auf Normalverteilung und Varianzhomogenität können auch Fachleute konsultiert werden; Tests sind jedoch zu bevorzugen. Wenn eine Abweichung von der Normalverteilung oder eine Varianzheterogenität festgestellt wird, ist eine normalisierende bzw. die Varianz stabilisierende Transformation zu versuchen. Ergibt sich (vielleicht nach einer Transformation) eine Normalverteilung mit homogener Varianz, wird mit dem Dunnett-Test eine signifikante Wirkung festgestellt. Wenn (unter Umständen nach einer Transformation) eine Normalverteilung mit heterogener Varianz festgestellt wird, ist mit dem Tamhane/Dunnett-Test, dem T3-Test oder dem Mann-Whitney-Wilcoxon-U-Test eine signifikante Wirkung zu ermitteln. Führt die Transformation nicht zu einer Normalverteilung, ist nach einer Anpassung der p-Werte nach Bonferroni-Holm ebenfalls mit dem Mann-Whitney-Wilcoxon-U-Test eine signifikante Wirkung festzustellen. Der Dunnett-Test wird unabhängig von einem F-Test im Rahmen einer ANOVA durchgeführt, und der Mann-Whitney-Test erfolgt unabhängig von einem allgemeinen Kruskal-Wallis-Test.

65. Wenngleich eine signifikante Mortalität nicht erwartet wird, ist die Mortalität doch durch einen Cochran-Armitage-Test im Step-down-Verfahren zu prüfen, bei dem die Daten mit der monotonen Dosis-Wirkungs-Beziehung übereinstimmen; ansonsten ist ein Exakter Test nach Fisher mit einer Anpassung nach Bonferroni-Holm vorzunehmen.
66. Eine signifikante Wirkung der Exposition auf die Entwicklungsstadien wird mit dem Jonckheere-Terpstra-Test im Step-down-Verfahren bezogen auf die Mediane der Replikate ermittelt. Alternativ und vorzugsweise sollte die Wirkung mit einem multiquantalen Jonckheere-Test vom 20. bis zum 80. Perzeptil festgestellt werden, da so Änderungen des Verteilungsprofils berücksichtigt werden können.
67. Bei der Analyse ist von den Replikaten auszugehen; beim Jonckheere-Terpstra- und beim Mann-Whitney-U-Test besteht das Datenmaterial aus den Medianen der Replikate und beim Dunnett-Test aus den Mittelwerten der Replikate. Eine monotone Dosis-Wirkungs-Beziehung kann aus den Mittelwerten oder Medianen der Replikate und der Testkonzentrationen nach Augenschein oder durch förmliche Tests (s. o.) festgestellt werden (11). Wenn weniger als fünf Replikate pro Testkonzentration oder pro Kontrolle verfügbar sind, sollten der Jonckheere-Terpstra- und der Mann-Whitney-Tests möglichst exakt durchgeführt werden. Bei allen Tests wird eine Signifikanz von 0,05 als statistisch relevant betrachtet.
68. Abbildung 4 zeigt ein Flussdiagramm zur Durchführung statistischer Prüfungen bei kontinuierlichen Daten.

Abbildung 4. Flussdiagramm statistischer Verfahren für kontinuierliche Daten zur Dosis-Wirkungs-Beziehung, Fehler im Bild



Besondere Erwägungen zur Datenanalyse

Behandlung von Konzentrationen mit offensichtlich toxischer Wirkung

69. Um festzustellen, ob ein Replikat oder eine Testkonzentration insgesamt offensichtlich toxisch wirkt und von der Analyse ausgeschlossen werden muss, sind mehrere Faktoren zu berücksichtigen. Eine offensichtliche Toxizität ist bei > 2 toten Larven in einem Replikat gegeben, wenn die Mortalität nicht durch einen technischen Fehler, sondern nur durch die toxische Wirkung zu erklären ist. Andere Anzeichen einer offensichtlichen Toxizität sind Hämorrhagien, Verhaltensauffälligkeiten, anomales Schwimmverhalten, Anorexie und sonstige klinische Anzeichen einer Erkrankung. Bei Anzeichen einer subletalen Toxizität können qualitative Untersuchungen erforderlich sein; in diesen Fällen ist grundsätzlich ein Vergleich mit der Kontrollgruppe mit sauberem Wasser vorzunehmen.

Lösungsmittelkontrollen

70. Die Verwendung eines Lösungsmittels ist nur als letzte Möglichkeit in Betracht zu ziehen, wenn alle sonstigen Verfahren zur Applikation der betreffenden Chemikalie geprüft wurden. Wenn ein Lösungsmittel verwendet wird, ist auch eine Kontrolle mit

sauberen Wasser zu prüfen. Bei Ende des Tests werden die potenziellen Wirkungen des Lösungsmittels bestimmt. Dazu wird ein statistischer Vergleich der Kontrollgruppe mit dem Lösungsmittel und der Kontrollgruppe mit dem sauberen Wasser vorgenommen. Die wichtigsten Endpunkte für diese Analyse sind das Entwicklungsstadium, die Kopf-Rumpf-Länge und die Feuchtmasse, da diese Parameter auch durch nicht auf die Schilddrüse wirkende Toxizität beeinträchtigt werden können. Wenn bei diesen Endpunkten statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe mit dem sauberen Wasser und der Kontrollgruppe mit dem Lösungsmittel festgestellt werden, sind die in der Studie verwendeten Endpunkte für die Reaktionsparameter anhand der Kontrolle mit dem sauberen Wasser festzulegen. Besteht zwischen der Kontrolle mit dem sauberen Wasser und der Lösungsmittelkontrolle bei keiner der gemessenen Reaktionsvariablen ein statistisch signifikanter Unterschied, werden die Endpunkte für die Reaktionsparameter aus den gepoolten Werten der Kontrollen mit dem Verdünnungswasser und mit dem Lösungsmittel ermittelt.

Behandlungsgruppen mit Larven mindestens im Entwicklungsstadium 60

71. Ab Stadium 60 verringern sich Größe und Gewicht der Larven, weil Gewebe resorbiert wird und der absolute Wassergehalt zurückgeht. Messungen der Feuchtmasse und der Kopf-Rumpf-Länge können in statistischen Analysen zur Feststellung unterschiedlicher Wachstumsentwicklungen nicht in geeigneter Weise verwendet werden. Daher sollten Daten zur Feuchtmasse und zur Länge von Tieren oberhalb des NF-Entwicklungsstadiums 60 ausgeklammert und bei der Analyse der Mittelwerte oder der Mediane von Replikaten nicht verwendet werden. Zur Analyse dieser wachstumsbezogenen Parameter können zwei andere Ansätze verfolgt werden.
72. Bei einem Ansatz werden in statistischen Analysen der Feuchtmasse und/oder der KRL ausschließlich Larven mit Entwicklungsstadien ≤ 60 berücksichtigt. Dieser Ansatz dürfte hinreichend belastbare Informationen über den Umfang möglicher Wachstumseffekte ergeben, wenn nur wenige Testtiere aus den Analysen herausgenommen werden ($\leq 20\%$). Hat eine größere Anzahl an Larven ($\geq 20\%$) in mindestens einer nominellen Konzentration der Prüfchemikalie ein höheres Entwicklungsstadium als Stadium 60 erreicht, ist für alle Larven eine Zwei-Faktor-ANOVA mit geschachtelter Varianzstruktur vorzunehmen, um die Auswirkungen der jeweiligen Chemikalie auf das Wachstum der Larven zu bewerten; dabei ist zu berücksichtigen, wie sich die Entwicklung in späteren Stadien auf die Wachstumsentwicklung auswirkt. Anlage 3 enthält Leitlinien zur ANOVA mit den beiden Faktoren Gewicht und Länge.

LITERATUR

- (1) OECD (2004) Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 – Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 77, Paris.
- (2) OECD (2007) Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 – Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 76. Paris.
- (3) OECD (2008) Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 92. Paris.
- (4) 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. Paris.
- (5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96(2002), Philadelphia, PA.
- (6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - Xenopus (FETAX). E 1439-98
- (7) Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L. und Hammermeister, D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. *Chemosphere* 39, S. 539-551.
- (8) Nieuwkoop, P.D., und Faber, J. (1994) Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York.
- (9) OECD (2007) Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 82. Paris.
- (10) Dodd, M.H.I., und Dodd, J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts, B. (Hrsg.), Academic Press, New York, S. 467-599
- (11) OECD (2006) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 54. Paris

- (12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. *Aquatic Toxicology*, 76; S. 69–92.

Anlage 1

Tabelle 1: Versuchsbedingungen des 21-Tage-Amphibien-Metamorphose-Assay (21-Tage-AMA)

Testtier	<i>Xenopus-laevis</i> -Larven	
Ausgangsstadium der Larven	Nieuwkoop und Faber, Stadium 51	
Expositionsdauer	21 Tage	
Kriterien für die Auswahl der Larven	Entwicklungsstadium und Gesamtlänge (optional)	
Prüfkonzentrationen	Mindestens 3 Konzentrationen, verteilt über etwa eine Größenordnung	
Expositionsprotokoll	Durchfluss (vorzugsweise) und/oder statische Erneuerung	
Durchfluss des Prüfsystems	25 ml/min (vollständiger Austausch etwa nach 2,7 h)	
Primäre Endpunkte / Erfassungstage	Mortalität	Täglich
	Entwicklungsstadium	D 7 und 21
	Länge der Hinterbeine	D 7 und 21
	Kopf-Rumpf-Länge	D 7 und 21
	Feuchtmasse der Larven	D 7 und 21
	Histologie der Schilddrüse	D 21
Verdünnungswasser / Laborkontrolle	Entchlortes Leitungswasser (mit Aktivkohle gefiltert) oder entsprechendes Laborwasser	
Besatzdichte	20 Larven / Prüfbecken (5 / 1)	
Testlösung / Testbecken	4-10 l (mindestens 10-15 cm Wassertiefe) / Glas- oder Edelstahlbecken (z. B. 22,5 cm x 14 cm x 16,5 cm)	
Replikation	4 Replikatprüfbecken / Testkonzentration und Kontrolle	
Annehmbare Mortalität in den Kontrollen	≤ 10 % pro Replikatprüfbecken	

Fixierung der Schilddrüse	Anzahl fixierter Tiere	Alle Larven (zunächst werden 5 pro Replikat bewertet)
	Region	Kopf oder gesamter Körper
	Fixierlösung	Davidson-Fixierlösung
Fütterung	Futter	Sera Micron® oder gleichwertig
	Menge / Häufigkeit	Zum Fütterungsprotokoll mit Sera Micron® siehe Tabelle 1.
Beleuchtung	Photoperiode	12 h Licht : 12 h Dunkelheit
	Intensität	600-2000 lx (gemessen an der Wasseroberfläche)
Wassertemperatur		22 ± 1 °C
pH-Wert		6,5-8,5
Konzentration des gelösten Sauerstoffs		>3,5 mg/l (> 40 % Luftsättigung)
Stichprobenahme zur chemischen Analyse		Einmal pro Woche (4 Probenahmen / Test)

Anlage 2

BERICHTTABELLEN FÜR ROHDATEN UND ZUSAMMENFASSUNG

Tabelle 1: Allgemeine Informationen zur Prüfchemikalie

Chemische Informationen

Prüfchemikalie, Konzentrationseinheiten und Konzentrationen eingeben

Prüfchemikalie:

--

Konzentrationseinheiten:

--

Konzentration 1

--

Konzentration 2

--

Konzentration 3

--

Konzentration 4

--

Datum (Tag 0):

--

Datumsformat:
MM/TT/JJ

Datum (Tag 7):

--

Datumsformat:
MM/TT/JJ

Datum (Tag 21):

--

Datumsformat:
MM/TT/JJ

Tabelle 2: Rohdatenbogen für die Tage 7 und 21

TAG X									
DATUM 00/00/00									
	Konzentration	Behdlg. Nr.	Replikat. Nr.	Nr. des Individuums	ID-Nummer	Entwicklungsstadium	Kopf-Rumpflänge (mm)	Hinterbeinlänge (mm)	Feuchtmasse des gesamten Organismus (mg)
ZEILE	BEHANDLG.	BEHDLG. Nr.	Replikat.	INDIV.	ID-Nr.	STADIUM	KÖRPERL.	HBL	GEW.
1	0,00	1							
2	0,00	1							
3	0,00	1							
4	0,00	1							
5	0,00	1							
6	0,00	1							
7	0,00	1							
8	0,00	1							
9	0,00	1							
10	0,00	1							
11	0,00	1							
12	0,00	1							
13	0,00	1							
14	0,00	1							
15	0,00	1							
16	0,00	1							
17	0,00	1							
18	0,00	1							
19	0,00	1							
20	0,00	1							
21	0,00	2							
22	0,00	2							
23	0,00	2							
24	0,00	2							
25	0,00	2							
26	0,00	2							
27	0,00	2							
28	0,00	2							
29	0,00	2							
30	0,00	2							
31	0,00	2							
32	0,00	2							
33	0,00	2							
34	0,00	2							
35	0,00	2							
36	0,00	2							
37	0,00	2							
38	0,00	2							
39	0,00	2							
40	0,00	2							
41	0,00	3							
42	0,00	3							
43	0,00	3							
44	0,00	3							
45	0,00	3							
46	0,00	3							
47	0,00	3							
48	0,00	3							
49	0,00	3							
50	0,00	3							
51	0,00	3							
52	0,00	3							
53	0,00	3							
54	0,00	3							
55	0,00	3							
56	0,00	3							
57	0,00	3							
58	0,00	3							
59	0,00	3							
60	0,00	3							
61	0,00	4							
62	0,00	4							
63	0,00	4							
64	0,00	4							
65	0,00	4							
66	0,00	4							
67	0,00	4							
68	0,00	4							
69	0,00	4							
70	0,00	4							
71	0,00	4							
72	0,00	4							
73	0,00	4							
74	0,00	4							
75	0,00	4							
76	0,00	4							
77	0,00	4							
78	0,00	4							
79	0,00	4							
80	0,00	4							

Tabelle 3: Berechnete Summen der Endpunktdaten der Tage 7 und 21

Behandlung	Replikat	Entwicklungsstadium			KRL (mm)		Hinterbeinlänge (mm)		Gewicht (mg)	
		min	Median	max	Mittelwert	Standart-abw.	Mittelwert	Standart-abw.	Mittelwert	Standart-abw.
1	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
1	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	2	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	3	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	4	0	#NUM!	0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!

Hinweis: Die Werte in den Zellen werden anhand der Dateneingaben in Tabelle 2 berechnet.

Tabelle 4: Tägliche Mortalität

Testtag	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																
1	#Value!																
2	#Value!																
3	#Value!																
4	#Value!																
5	#Value!																
6	#Value!																
7	#Value!																
8	#Value!																
9	#Value!																
10	#Value!																
11	#Value!																
12	#Value!																
13	#Value!																
14	#Value!																
15	#Value!																
16	#Value!																
17	#Value!																
18	#Value!																
19	#Value!																
20	#Value!																
21	#Value!																
Anz. Replikate		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anz. Behandl.		0				0				0				0			

Hinweis: Die Werte in den Zellen werden anhand der Dateneingaben in Tabelle 1 berechnet.

Tabelle 5: Kriterien für die Wasserqualität

Expositionssystem (Durchfluss/statische Erneuerung):
Temperatur:
Lichtintensität:
Hell-Dunkel-Zyklus:
Futter:
Fütterungsprotokoll:
pH-Wert des Wassers:
Jodkonzentration des Testwassers:

Tabelle 6: Zusammenfassung chemische Daten

Name der Chemikalie:																					
CAS-Nr.:																					
Testtag	Datum	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	00/00/00																				
1	#Value!																				
2	#Value!																				
3	#Value!																				
4	#Value!																				
5	#Value!																				
6	#Value!																				
7	#Value!																				
8	#Value!																				
9	#Value!																				
10	#Value!																				
11	#Value!																				
12	#Value!																				
13	#Value!																				
14	#Value!																				
15	#Value!																				
16	#Value!																				
17	#Value!																				
18	#Value!																				
19	#Value!																				
20	#Value!																				
21	#Value!																				

Hinweis: Die Werte in den Zellen werden anhand der Dateneingaben in Tabelle 1 berechnet.

Tabelle 7: Histopathologische Berichtstabellen – Kernkriterien

Datum:

Chemikalie:

		Hypertrophie der Schilddrüse	Atrophie der Schilddrüse	Hypertrophie der follikulären Zellen	Hyperplasie der follikulären Zellen
Kontrolle Tier-ID – Replikat 1					
Kontrolle Tier-ID – Replikat 2					
Summe:					

Pathologie:

		Hypertrophie der Schilddrüse	Atrophie der Schilddrüse	Hypertrophie der follikulären Zellen	Hyperplasie der follikulären Zellen
Dosis Tier-ID – Replikat 1					
Dosis Tier-ID – Replikat 2					
Summe:					

		Hypertrophie der Schilddrüse	Atrophie der Schilddrüse	Hypertrophie der follikulären Zellen	Hyperplasie der follikulären Zellen
Dosis Tier-ID – Replikat 1					
Dosis Tier-ID – Replikat 2					
Summe:					

		Hypertrophie der Schilddrüse	Atrophie der Schilddrüse	Hypertrophie der follikulären Zellen	Hyperplasie der follikulären Zellen
Dosis Tier-ID – Replikat 1					
Dosis Tier-ID – Replikat 2					
Summe:					

Tabelle 8: Weitere histopathologische Kriterien

Datum: _____ Chemikalie: _____

		Zunahme des Follikellumens	Verringerung des Follikellumens
Kontrolle Tier-ID – Replikat 2			
Kontrolle Tier-ID – Replikat 1			
Summe:			

		Zunahme des Follikellumens	Verringerung des Follikellumens
Dosis Tier-ID – Replikat 2			
Dosis Tier-ID – Replikat 1			
Summe:			

Pathologie: _____

		Zunahme des Follikellumens	Verringerung des Follikellumens
Dosis Tier ID - Replikat 2			
Dosis Tier ID - Replikat 1			
Summe:			

		Zunahme des Follikellumens	Verringerung des Follikellumens
Dosis Tier-ID – Replikat 2			
Dosis Tier-ID – Replikat 1			
Summe:			

Tabelle 9: Ausformulierte Beschreibungen der histopathologischen Ergebnisse

Datum:

Chemikalie:

Pathologie:

Ausformulierte Beschreibung

Kontrolle Tier-ID – Replik 1		
Kontrolle Tier-ID – Replik 2		
Kontrolle Tier-ID – Replik 1		
Dosis Tier-ID – Replik 2		

Dosis Tier-ID – Replik 1		
Dosis Tier-ID – Replik 2		

Dosis Tier-ID – Replik 1		
Dosis Tier-ID – Replik 2		

Tabelle 10: Zusammenfassende Übersicht Tag x (7 oder 21) des AMA

Endpunkt	Replik	Kontrolle				Dosis 1					Dosis 2					Dosis 3				
		Mittelwert	SD	CV	N	Mittelwert	SD	CV	N	p-Wert	Mittelwert	SD	CV	N	p-Wert	Mittelwert	SD	CV	N	p-Wert
Hinterbeinlänge (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Mittelwert:																			
KRL (mm)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Mittelwert:																			
Feuchtmasse (mg)	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Mittelwert:																			

Tabelle 11: Zusammenfassende Übersicht Tag x (7 oder 21) Daten zu Entwicklungsstadien im AMA

	Replik	Kontrolle				Dosis 1					Dosis 2					Dosis 3				
		Median	min	max	N	Median	min	max	N	p-Wert	Median	min	max	N	p-Wert	Median	min	max	Median	p-Wert
Entwicklungsstadium	1																			
	2																			
	3																			
	4																			
	Mittelwert:																			

Anlage 3

ALTERNATIVE GEWICHTS- UND LÄNGENANALYSE IN SPÄTEN ENTWICKLUNGSSTADIEN BEI > 20 % DER LARVEN IN EINER ODER MEHREREN KONZENTRATIONEN

Befindet sich eine größere Anzahl an Larven ($\geq 20\%$) in mindestens einer nominellen Konzentration der Prüfchemikalie in einem höheren Entwicklungsstadium als Stadium 60, ist für alle Larven eine Zwei-Faktor-ANOVA mit geschachtelter Varianzstruktur vorzunehmen, um die Auswirkungen der jeweiligen Chemikalie auf das Wachstum der Larven zu bewerten; dabei ist zu berücksichtigen, wie sich die Entwicklung in späteren Stadien auf die Wachstumsentwicklung auswirkt.

Vorgeschlagen wird die Verwendung aller Daten; dabei ist jedoch der Effekt eines späten Entwicklungsstadiums zu berücksichtigen. Die entsprechende Prüfung kann mit einer Zwei-Faktor-ANOVA mit verschachtelter Varianzstruktur vorgenommen werden. Für ein Tier ist die Eingabe LateStage=„Yes“ zu definieren, wenn ein Tier mindestens das Entwicklungsstadium 61 erreicht. Ansonsten ist LateStage=„No“ zu definieren. Dann kann eine ANOVA mit zwei Faktoren (Concentration und LateStage) mit Rep(Conc) als Zufallsfaktor und mit dem Faktor Tadpole(Rep) als einem weiteren zufälligen Effekt vorgenommen werden. Auch hier wird das Replikat als Analyseeinheit behandelt. Es ergeben sich im Wesentlichen die gleichen Ergebnisse wie in einer gewichteten Analyse der Mittelwerte rep*latestage, gewichtet nach der Anzahl der Tiere pro Mittelwert. Wenn die Daten die Anforderungen der ANOVA an die Normalverteilung oder die Varianzhomogenität nicht erfüllen, kann eine normalisierte Rangtransformation vorgenommen werden.

Zusätzlich zu den Standard-F-Tests auf die Wirkungen der Parameter Conc und LateStage sowie ihrer Wechselwirkungen im Rahmen der ANOVA kann der F-Test zur Ermittlung von Wechselwirkungen in zwei zusätzliche F-Tests „aufgespalten“ werden: einen Test zur Ermittlung der durchschnittlichen Reaktionen über die verschiedenen Konzentrationen für LateStage=„No“ und einen weiteren für die mittleren Reaktionen über die verschiedenen Konzentrationen für LateStage=„Yes“. Weitere Vergleiche der Mittelwerte von Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen werden jeweils für die verschiedenen Ausprägungen des Parameters LateStage vorgenommen. Mit geeigneten Kontrasten oder mit einfachen paarweisen Vergleichen kann eine Trendanalyse vorgenommen werden, wenn Anzeichen für eine nicht monotone Dosis-Wirkungs-Beziehung innerhalb einer Ebene des Parameters LateStage bestehen. Eine Anpassung der p-Werte nach Bonferroni-Holm erfolgt nur dann, wenn der entsprechende F-Test nicht signifikant ist. Die Anpassung kann mit SAS und wahrscheinlich auch mit sonstiger Statistik-Software vorgenommen werden. Komplikationen können sich ergeben, wenn bei einigen Konzentrationen keine Tiere ein spätes Entwicklungsstadium erreichen; diese Fälle können aber eher pragmatisch gehandhabt werden.

Anlage 4

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Chemikalie: ein Stoff oder Gemisch

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

C.39. Collembolen-Reproduktionstests in Böden

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 232 (2009). Mit der Prüfmethode sollen die Wirkungen von Chemikalien auf die Reproduktionsleistung von bodenbewohnenden Collembolen untersucht werden. Die Methode beruht auf bestehenden Verfahren (1)(2). Zwei der am besten zugänglichen Arten sind die parthenogenetische Art *Folsomia candida* und die sich geschlechtlich vermehrende Art *Folsomia fimetaria*. Wenn spezifische Lebensräume zu bewerten sind, in denen diese beiden Arten nicht vorkommen, ist die Methode auch auf andere Collembola-Arten übertragbar, sofern diese die Validitätskriterien des Tests erfüllen.
2. Erdbewohnende Collembolen sind für Ökotoxizitätsprüfungen ökologisch relevante Arten. Collembolen sind Sechsfüßer mit einem dünnen und stark luft- und wasserdurchlässigen Exoskelett; sie sind den Arthropoden zuzurechnen, bei denen andere Expositionspfade und -raten gegeben sind als bei Regenwürmern und bei Enchytraeen.
3. In vielen terrestrischen Ökosystemen beträgt die Populationsdichte von Collembolen 10^5 m^{-2} in Böden und in Laubschichten (3)(4). Adulte Tiere sind gewöhnlich 0,5-5 mm lang; ihr Anteil an der gesamten tierischen Biomasse im Boden beschränkt sich geschätzt auf 1-5 % (5). Sie tragen vor allem zur Regelung von Prozessen bei, indem sie Mikroorganismen fressen und Mikrofauna abweiden. Springschwänze sind Beutetiere für zahlreiche endogäische und epigäische Invertebraten (z. B. Milben, Hundertfüßer, Spinnen, Laufkäfer und Kurzflügler). Collembolen unterstützen Zersetzungsprozesse in sauren Böden, wo sie neben Enchytraeen die wichtigsten Invertebraten sein können, da Regenwürmer und Diplopoden dort gewöhnlich nicht vorkommen.
4. *Folsomia fimetaria* ist weltweit verbreitet und in verschiedenen Bodentypen von Sandböden bis zu Lehm Böden und von Mull- bis Humusböden anzutreffen. Die augenlose, pigmentlose Collembolenart wurde in landwirtschaftlichen Nutzflächen in ganz Europa nachgewiesen (6). Sie ist ein Allesfresser und ernährt sich u. a. von Pilzhyphen, Bakterien, Protozoen und Detritus. *F. fimetaria* verursacht Infektionen mit für Pflanzen pathogenen Pilzen (7) und kann Mycorrhiza verändern; dies ist beispielsweise bei *F. candida* bekannt. Wie die meisten Collembolen-Arten vermehrt sich auch *F. fimetaria* geschlechtlich. Zur Befruchtung der Eier müssen kontinuierlich männliche Tiere vorhanden sein.
5. *F. candida* kommt ebenfalls weltweit vor. In den meisten natürlichen Böden ist diese Art zwar nicht häufig; an humusreichen Standorten ist sie aber in sehr großer Anzahl zu finden. Die augenlose, pigmentlose Collembolenart besitzt eine gut entwickelte Furca (Springgabel); die Tiere bewegen sich lebhaft und springen bei Berührung. Die ökologische Bedeutung von *F. candida* ist der Bedeutung von *F. fimetaria* vergleichbar; diese Art lebt jedoch in Böden, die reicher an organischen Bestandteilen sind. *F. candida* vermehrt sich parthenogenetisch. Weniger als 1/1000 aller Exemplare sind männliche Tiere.

PRINZIP DER PRÜFUNG

6. Synchrone adulte (*F. fimetaria*) bzw. juvenile (*F. candida*) Collembolen werden in einem modifizierten künstlichen Boden (8) mit 5 % organischen Bestandteilen (oder einem alternativen Boden) verschiedenen Konzentrationen der Prüfchemikalie ausgesetzt. Die Prüfung kann in zwei Schritte unterteilt werden:
 - Wenn keine hinreichenden Informationen zur Toxizität vorliegen, wird ein Vorversuch durchgeführt, bei dem nach 2 Wochen (bei *F. fimetaria*) bzw. nach 3 Wochen (bei *F. candida*) die Mortalität und die Reproduktionsleistung als wichtigste Endpunkte beurteilt werden.
 - Im definitiven Reproduktionstest werden die Gesamtzahl der aus den adulten Tieren hervorgegangenen juvenilen Tiere und die Anzahl der überlebenden adulten Tiere ermittelt. Dieser definitive Test dauert bei *F. fimetaria* 3 Wochen und bei *F. candida* vier Wochen.

Die toxische Wirkung der Prüfchemikalie auf die Mortalität adulter Tiere und auf die Reproduktionsleistung wird mit den Parametern LC_x und EC_x angegeben. Dazu werden die Daten durch nicht lineare Regression an ein geeignetes Modell angepasst, um die Konzentration abzuschätzen, die eine Mortalität von x % oder einen Rückgang der Reproduktionsleistung um x % verursachen würde; alternativ kann die NOEC/LOEC bestimmt werden (9).

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

7. Die physikalischen Eigenschaften, 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 die Persistenz der Chemikalie im Boden (z. B. die Photolyse- und die Hydrolysegeschwindigkeit sowie der biotische und der abiotische Abbau). So weit vorliegend, sind der IUPAC-Name sowie CAS-Nummer, Charge, Los, Strukturformel und Reinheit anzugeben.
8. Diese Prüfmethode kann wahlweise für wasserlösliche und für nicht lösliche Chemikalien verwendet werden. Allerdings ist die Prüfchemikalie je nach Chemikaliertyp 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 1 ist oder für Chemikalien, bei denen der Dampfdruck bei 25 °C mehr als 0,0133 Pa beträgt).

VALIDITÄT DES TESTS

9. Damit ein Testergebnis als gültig gewertet werden kann, müssen die unbehandelten Kontrollen die folgenden Kriterien erfüllen:
 - Die mittlere Mortalität adulter Tiere darf am Ende des Versuchs höchstens 20 % betragen.
 - Die mittlere Anzahl juveniler Tiere pro Gefäß muss am Ende des Tests mindestens bei 100 liegen.
 - Der für die Anzahl an juvenilen Tieren berechnete Variationskoeffizient muss am Ende des definitiven Tests weniger als 30 % betragen.

REFERENZCHEMIKALIE

10. Eine Referenzchemikalie muss bei der EC₅₀-Konzentration der ausgewählten Testerde entweder in regelmäßigen Abständen oder nach Möglichkeit bei jeder einzelnen Prüfung getestet werden, um sicherzustellen, dass die Reaktion der Testorganismen im Testsystem im normalen Bereich liegt. Eine geeignete Referenzchemikalie ist Borsäure; unter der Wirkung von Borsäure muss die Reproduktionsleistung bei beiden Arten und bei etwa 100 mg/kg Boden (bezogen auf die Trockenmasse) um 50 % zurückgehen.

BESCHREIBUNG DES TESTS

Prüfgefäße und Apparatur

11. Die Prüfgefäße sollten hinreichend groß für mindestens 30 g feuchten Boden sein und aus Glas oder inertem (nicht toxischem) Kunststoff bestehen. Die Verwendung von Kunststoffbehältern ist jedoch zu vermeiden, wenn die Exposition gegenüber der Prüfchemikalie durch Sorption verringert wird. Der Querschnitt der Prüfgefäße muss eine Verteilung des Bodens im Gefäß auf eine Tiefe von 2-4 cm ermöglichen. Die Deckel der Gefäße (z. B. aus Glas oder Polyethylen) müssen so beschaffen sein, dass sie die Wasserverdunstung reduzieren und gleichzeitig den Gasaustausch zwischen dem Bodenmaterial und der Atmosphäre ermöglichen. Die Behältnisse müssen mindestens zum Teil transparent sein, damit die erforderliche Lichtdurchlässigkeit gegeben ist.
12. Es wird eine normale Laborausstattung mit folgenden Bestandteilen benötigt:
 - Trockenschrank;
 - Stereomikroskop;
 - 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;
 - Pinzette oder Saugerät mit niedriger Saugleistung.

Herstellung des Testbodens

13. Für den Test wird ein modifizierter künstlicher Boden (8) mit einem Anteil von 5% an organischen Bestandteilen verwendet. Alternativ kann Naturboden eingesetzt werden, da der künstliche Boden natürlichen Böden nicht vergleichbar ist. Der künstliche Boden sollte folgende Zusammensetzung haben (bezogen auf Trockenmassen, nach Trocknung bei 105 °C auf ein konstantes Gewicht):
 - 5 % Torfmoose, 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 CaCO₃-Anteil), hauptsächlich feiner Sand mit mehr als 50 % Partikeln mit einer Größe von 50-200 µm; die genaue Menge des Sands hängt vom CaCO₃-Gehalt ab (s. u.);

insgesamt muss ein Anteil von 75 % erreicht werden.

- 1,0 % Calciumcarbonat (CaCO_3 , Pulver, 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 durch Messung des pH-Werts der feuchten Unterproben des Bodens vor der Inkubation zu ermitteln; die genaue Menge wird durch Messung des pH-Werts der Unterproben des Bodens unmittelbar vor dem Versuch bestimmt.

Hinweis 2: Der pH-Wert und (optional) das C-N-Verhältnis, die Kationenaustauschkapazität und der Anteil des Bodens an organischen Bestandteilen sollten ermittelt werden, um in einem späteren Stadium eine Normalisierung vornehmen und die Ergebnisse besser interpretieren zu können.

Hinweis 3: Wenn erforderlich, z. B. für spezifische Tests, können auch natürliche Böden aus nicht verunreinigten Standorten als Test- und/oder Kultursubstrate dienen. Wenn Naturboden verwendet wird, sollten mindestens die Herkunft (Entnahmestandort), der pH-Wert, die Textur (Partikelgrößenverteilung), die Kationenaustauschkapazität und der Gehalt an organischen Bestandteilen angegeben werden. Außerdem darf der Boden in keiner Weise kontaminiert sein. Bei Naturböden ist es anzuraten, vor ihrer Verwendung in einem definitiven Test nachzuweisen, dass sie für einen Test geeignet sind und die Validitätskriterien erfüllen.

14. Die trockenen Bestandteile des Bodens werden gründlich gemischt (z. B. in einem großen Labormischer). Die maximale Wasserrückhaltefähigkeit des künstlichen Bodens wird mit den in Anlage 5 beschriebenen Verfahren ermittelt. Der Feuchtegehalt des Testbodens ist so zu optimieren, dass sich eine lockere poröse Struktur ergibt, in die sich die Collembolen zurückziehen können. Gewöhnlich ist dies bei einem Feuchtegehalt von 40-60 % der maximalen Wasserrückhaltefähigkeit gegeben.
15. Der trockene künstliche Boden wird vorgetränkt, indem so viel entionisiertes Wasser hinzugegeben wird, dass 2-7 Tage vor Beginn des Tests etwa die Hälfte des endgültigen Wassergehalts erreicht ist; anschließend kann sich der Säuregrad ausgleichen/stabilisieren. Zur Bestimmung des pH-Werts werden eine Bodenmischung und 1 mol Kaliumchlorid (KCl) oder 0,01 mol Calciumchlorid-Lösung (CaCl_2 -Lösung) im Verhältnis 1:5 verwendet (siehe Anlage 6). Wenn der Säuregrad des Bodens außerhalb des spezifizierten Bereichs liegt, kann der pH-Wert durch Zugabe einer geeigneten Menge CaCO_3 korrigiert werden. Ist der Boden zu alkalisch, kann durch Zugabe einer anorganischen und für Collembolen unschädlichen Säure korrigiert werden.
16. Der vorgetränkte Boden wird entsprechend der Anzahl der im Test zu verwendenden Testkonzentrationen (sowie gegebenenfalls der Referenzchemikalie) und Kontrollen aufgeteilt. Die Prüfchemikalien werden hinzugegeben, und der Wassergehalt wird eingestellt, wie in Nummer 24 beschrieben.

Auswahl und Vorbereitung der im Test zu verwendenden Tiere

17. Die parthenogenetische Art *F. candida* wird empfohlen, da diese Art im Ringtest der

Prüfmethode (11) die Validitätskriterien hinsichtlich der Überlebensquote häufiger erfüllt hat als *F. fimetaria*. Wenn eine andere Art verwendet wird, muss diese die in Nummer 9 beschriebenen Validitätskriterien erfüllen. Zu Beginn des Tests müssen die Tiere gut gefüttert sein und ein Alter von 23-26 Tagen (*F. fimetaria*) bzw. von 9-12 Tagen (*F. candida*) haben. Jedes Replikat muss jeweils 10 männliche und weibliche Tiere (*F. fimetaria*) bzw. 10 weibliche Tiere (*F. candida*) enthalten (siehe Anlage 2 und 3). Die synchronisierten Tiere werden zufällig aus den Gefäßen ausgewählt; anschließend werden für jede in ein Replikat eingesetzte Charge der Gesundheitszustand und die physischen Merkmale geprüft. Jede Gruppe von 10/20 Tieren wird in ein zufällig ausgewähltes Testbehältnis gesetzt; bei *F. fimetaria* werden die großen weiblichen Tiere ausgewählt, damit die weiblichen Tiere leicht von den männlichen Tieren zu unterscheiden sind.

Herstellung der Testkonzentrationen

18. Für die Applikation der Prüfchemikalie kommen vier Methoden in Betracht: 1) Verwendung von Wasser als Trägerstoff zum Mischen der Prüfchemikalie in den Boden; 2) Verwendung eines organischen Lösungsmittels als Trägerstoff zum Mischen der Prüfchemikalie in den Boden, 3) Verwendung von Sand als Trägerstoff zum Mischen der Prüfchemikalie in den Boden und 4) Applikation der Prüfchemikalie auf die Oberfläche des Bodens. Welche Methode jeweils zu verwenden ist, hängt von den Merkmalen der jeweiligen Chemikalie und vom Zweck der Untersuchung ab. Im Allgemeinen wird empfohlen, die Prüfchemikalie in den Boden zu mischen. Es können allerdings Applikationsverfahren entsprechend der Verwendung der Prüfchemikalie in der Praxis erforderlich sein (z. B. Aufsprühen einer flüssigen Formulierung oder Verwendung spezieller Pestizidformulierungen wie z. B. Granulate oder Saatgutbeizen). Die Collembolen werden erst eingesetzt, wenn der Boden mit der Prüfchemikalie gemischt wurde. Wird jedoch die Prüfchemikalie auf den Boden aufgebracht, sind die Collembolen vorher einzusetzen, wobei abgewartet werden muss, bis sie in den Boden eingedrungen sind.

In Wasser lösliche Prüfchemikalie

19. Eine Lösung der Prüfchemikalie wird in entionisiertem Wasser in ausreichender Menge für alle Replikate einer Testkonzentration hergestellt. Jede Lösung mit der Prüfchemikalie wird gründlich mit einer Charge des vorgetränkten Bodens gemischt, bevor sie in das Prüfgefäß gegeben wird.

In Wasser nicht lösliche Prüfchemikalie

20. Chemikalien, die zwar nicht in Wasser, dafür aber in organischen Lösungsmitteln löslich sind, können in der geringstmöglichen Menge eines geeigneten Lösungsmittels (z. B. Aceton) gelöst werden. Auch in diesem Fall sind eine angemessene Mischung der Chemikalie im Boden sowie ggf. die Durchmischung mit Quarzsand erforderlich. Es sind jedoch ausschließlich flüchtige Lösungsmittel zu verwenden. Wenn ein organisches Lösungsmittel eingesetzt wird, müssen alle Testkonzentrationen sowie eine zusätzliche negative Lösungsmittelkontrolle denselben Mindestgehalt des Lösungsmittels aufweisen. Die Testbehältnisse bleiben eine Zeit lang geöffnet, damit in Verbindung mit der Prüfchemikalie eingebrachte flüchtige Lösungsmittel verdunsten können; dabei ist allerdings sicherzustellen, dass die toxische Chemikalie in dieser Zeit nicht ebenfalls verdunstet.

In Wasser schlecht lösliche Prüfchemikalie und organische Lösungsmittel

21. Bei Chemikalien, die sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln schlecht löslich sind, wird Quarzsand (als Bestandteil des Gesamtanteils des dem Boden zugesetzten Sandes) mit der Prüfchemikalie gemischt, bis die gewünschte Testkonzentration erreicht ist. Diese Mischung aus Quarzsand und Prüfchemikalie wird zum angefeuchteten Boden hinzugegeben und nach Hinzugabe einer entsprechenden Menge entionisierten Wassers gründlich gemischt, um den erforderlichen Feuchtegehalt zu erhalten. Die endgültige Mischung wird auf die Prüfgefäße verteilt. Dieses Verfahren wird für alle Testkonzentrationen wiederholt. Außerdem wird eine geeignete Kontrolle hergestellt.

Aufbringung der Prüfchemikalie auf die Bodenoberfläche

22. Wenn die Prüfchemikalie ein Pestizid ist, kann es angebracht sein, die Chemikalie auf den Boden aufzusprühen. Der Boden wird nach dem Einsetzen der Collembolen behandelt. Zunächst werden die Testbehältnisse mit dem vorgetränkten Bodensubstrat befüllt; anschließend werden die Tiere eingesetzt. Danach werden die Testbehältnisse gewogen. Um eine direkte Exposition der Tiere durch direkten Kontakt mit der Prüfchemikalie zu vermeiden, wird die Prüfchemikalie frühestens eine halbe Stunde nach Einsetzen der Collembolen eingebracht. Die Prüfchemikalie ist mit einer geeigneten Labor-Sprühflasche möglichst gleichmäßig auf den Boden aufzubringen, um ein Versprühen auf dem Feld zu simulieren. Die Applikation muss bei einer Temperatur innerhalb einer Variationsbreite von ± 2 °C erfolgen; bei wässrigen Lösungen, Emulsionen und Dispersionen erfolgt die Applikation mit dem Wasserdurchfluss entsprechend den auf Risikobewertungen beruhenden Empfehlungen. Die Durchflussmenge ist mit einem geeigneten Kalibrierverfahren zu kontrollieren. Spezielle Formulierungen (z. B. Granulate oder Saatgutbeizen) können entsprechend der landwirtschaftlichen Praxis aufgebracht werden. Nach dem Aufsprühen wird Futter hinzugegeben.

VERFAHREN

Prüfbedingungen

23. Die mittlere Testtemperatur muss bei 20 ± 1 °C liegen (Temperaturbereich 20 ± 2 °C). Der Test wird unter kontrollierten Licht-Dunkel-Zyklen (vorzugsweise 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit) mit einer Beleuchtungsstärke von 400-800 lx um die Testbehältnisse durchgeführt.
24. Um die Feuchte des Bodens zu ermitteln, werden die Gefäße zu Beginn des Tests, nach Ablauf der halben Testdauer und am Ende des Tests gewogen. Gewichtsverluste von > 2 % werden durch Zugabe entionisierten Wassers ausgeglichen. Wasserverluste können durch Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit (> 80 %) im Testinkubator reduziert werden.
25. Der pH-Wert ist jeweils am Beginn und am Ende sowohl des Vorversuchs als auch des definitiven Tests zu messen. Die Messungen sind an einer zusätzlichen Kontrolle und an einer zusätzlichen Probe des mit der Prüfchemikalie (in allen Konzentrationen) behandelten Bodens vorzunehmen. Die zusätzliche Kontrolle und die zusätzliche

Probe werden in der gleichen Weise wie die Testkulturen hergestellt und gehandhabt, enthalten aber keine Collembolen.

Testverfahren und Messungen

26. Für alle Testkonzentrationen wird eine geeignete Menge Testboden (entsprechend 30 g Frischmasse) in die Prüfgefäße gegeben. Außerdem werden Wasserkontrollen ohne die Prüfchemikalie hergestellt. Wenn zur Applikation der Prüfchemikalie ein Trägerstoff verwendet wird, ist zusätzlich zu den Testreihen eine Kontrollreihe mit dem Trägerstoff zu prüfen. Die Konzentration des Lösungsmittels oder des Dispergiermittels sollte mit der Konzentration übereinstimmen, die auch in den Prüfgefäßen mit der Prüfchemikalie verwendet wurde.
27. Die einzelnen Springschwänze werden randomisiert vorsichtig in die verschiedenen Prüfgefäße auf die Bodenoberfläche gesetzt. Um die Tiere möglichst effizient handhaben zu können, wird ein Sauggerät mit niedriger Saugleistung verwendet. Die Anzahl der Replikate der Testkonzentrationen und der Kontrollen hängt vom jeweiligen Prüfprotokoll ab. Die Prüfgefäße werden zufällig in den Testinkubator gestellt, und die Positionen werden wöchentlich neu randomisiert.
28. Bei *F. fimetaria* werden 20 adulte Tiere (10 männliche und 10 weibliche Tiere) im Alter von 23-26 pro Testgefäß verwendet. An Tag 21 werden die Collembolen aus dem Boden extrahiert und gezählt. Bei *F. fimetaria* werden in der für den Test synchronisierten Charge die Geschlechter aufgrund ihrer Größe unterschieden. Die weiblichen Tiere sind deutlich größer als die männlichen (siehe Anlage 3).
29. Bei *F. candida* sind zehn 9-12 Tage alte juvenile Tiere pro Prüfgefäß zu verwenden. An Tag 28 werden die Collembolen aus dem Boden extrahiert und gezählt.
30. Als geeignetes Futter wird am Anfang des Tests und nochmals nach etwa 2 Wochen in jedes Behältnis eine hinreichende Menge (z. B. 2-10 mg) Trockenhefe in Haushaltsqualität gegeben.
31. Am Ende des Tests werden die Mortalität und die Reproduktionsleistung bewertet. Nach 3 Wochen (*F. fimetaria*) bzw. nach 4 Wochen (*F. candida*) werden die Collembolen aus der Testerde extrahiert (siehe Anlage 4) und gezählt (12). In der Extraktion nicht erfasste Collembolen werden als tot gezählt. Das Extraktions- und das Zählverfahren sind zu validieren. Als Validitätskriterium gilt auch eine Extraktionsleistung von mehr als 95 % juvenilen Tieren; dies ist beispielsweise anhand einer Bodenprobe mit einer bekannten Anzahl an Collembolen zu prüfen.
32. Anlage 2 enthält eine praktische Übersicht und den Zeitplan des Prüfverfahrens.

Prüfprotokoll

Vorversuch

33. Wenn erforderlich, wird ein Vorversuch beispielsweise mit fünf Konzentrationen der Prüfchemikalie (0,1, 1,0, 10, 100 und 1000 mg/kg (Boden Trockenmasse)) und zwei Replikate pro Testkonzentration und pro Kontrolle vorgenommen. Zusätzliche Informationen aus Untersuchungen ähnlicher Chemikalien oder aus der Literatur hinsichtlich der Mortalität oder der Reproduktionsleistung von Collembolen können

ebenfalls bei der Auswahl der im Vorversuch zu verwendenden Konzentrationen herangezogen werden.

34. Um sicherzustellen, dass tatsächlich juvenile Tiere entstanden sind, wird der Vorversuch bei *F. fimetaria* zwei Wochen und bei *F. candida* drei Wochen fortgesetzt. Am Ende des Tests werden die Mortalität und die Reproduktionsleistung der Collembolen bewertet. Die Anzahl der adulten und der jungen Tiere wird jeweils protokolliert.

Definitiver Test

35. Zur Ermittlung des EC_x -Werts (z. B. EC_{10} oder EC_{50}) sind zwölf Konzentrationen zu prüfen. Zu empfehlen sind mindestens zwei Replikate pro Testkonzentration und sechs Replikate pro Kontrolle. Der Abstandsfaktor kann je nach Dosis-Wirkungs-Beziehung unterschiedlich sein.
36. Zur Bestimmung der NOEC/LOEC 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.
37. Ein kombinierter Ansatz ermöglicht die Bestimmung sowohl der NOEC/LOEC als auch des EC_x -Werts. Bei diesem kombinierten Ansatz 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.
38. Wenn im Vorversuch bei der höchsten Konzentration (1000 mg/kg) keine Wirkungen festzustellen sind, kann der Reproduktionstest als Limit-Test mit der Testkonzentration 1000 mg/kg durchgeführt werden. Mit einem Limit-Test kann nachgewiesen werden, dass bei der Limit-Konzentration keine statistisch signifikante Wirkung gegeben ist. Sowohl für den behandelten Boden als auch für die Kontrollen sind jeweils acht Replikate durchzuführen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

39. Wesentlicher Endpunkt ist die Reproduktionsleistung (z. B. gemessen an der Anzahl der pro Prüfgefäß entstandenen juvenilen Tiere). In statistischen Analysen (z. B. durch ANOVA-Verfahren) werden die Ergebnisse der verschiedenen Konzentrationen anhand eines Student-t-Tests, eines Dunnett-Tests oder eines Williams-Tests verglichen. Für die Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen werden 95-%-Konfidenzintervalle berechnet.
40. Die Anzahl der überlebenden adulten Tiere in den unbehandelten Kontrollen ist ein wichtiges Validitätskriterium und muss dokumentiert werden. Ebenso wie im Vorversuch sind jedoch im Abschlussbericht auch alle sonstigen Anzeichen für schädliche Wirkungen zu erfassen.

LC_x und EC_x

41. EC_x-Werte einschließlich der entsprechenden oberen und unteren 95-%-Konfidenzintervalle für die einzelnen Parameter werden mit geeigneten statistischen Methoden berechnet (z. B. Logit- oder Weibull-Model oder Trimmed Spearman-Kärber-Methode oder einfache Interpolation). Ein EC_x-Wert wird ermittelt, indem der x % des Mittelwerts der Kontrollen entsprechende Wert in die gefundene Gleichung eingesetzt wird. Um den EC₅₀-Wert oder einen sonstigen EC_x-Wert zu ermitteln, sind sämtliche Daten einer Regressionsanalyse zu unterziehen. Der LC₅₀-Wert wird gewöhnlich mit einer Probit-Analyse oder einem ähnlichen Analyseverfahren bestimmt, bei dem die Binomialverteilung der Mortalitätsdaten berücksichtigt wird.

NOEC/LOEC

42. Wenn eine statistische Analyse beabsichtigt ist, um die NOEC/LOEC zu bestimmen, 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 54 „*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*“ (9). Im Allgemeinen werden schädliche Wirkungen der Prüfchemikalie im Vergleich zur Kontrolle einer einseitigen Hypothesenprüfung mit $p \leq 0,05$ unterzogen.
43. Die Normalverteilung und die Varianzhomogenität können mit einem geeigneten statistischen Test geprüft werden (z. B. mit dem Shapiro-Wilk- bzw. dem Levene-Test ($p \leq 0,05$)). Nach einer einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) können Multi-Comparison-Tests durchgeführt werden. Mit Multi-Comparison-Tests (z. B. mit dem Dunnett-Test) oder Step-down-Trendtests (z. B. dem Williams-Test) kann berechnet werden, ob zwischen den Kontrollen und den verschiedenen Testkonzentrationen der Prüfchemikalie signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) bestehen. Welcher Test vorzunehmen ist, wird im OECD-Dokument 54 (9) beschrieben. Ansonsten müssen nicht-parametrische Methoden (z. B. ein U-Test mit Bonferroni-/Holm-Korrektur oder ein Jonckheere-Terpstra-Trendtest) verwendet werden, um die NOEC und die LOEC zu bestimmen.

Limit-Test

44. Wenn ein Limit-Test (Vergleich der Kontrolle mit einer einzigen Testkonzentration) durchgeführt wurde und die Voraussetzungen für parametrische Testverfahren (Normalität, Homogenität) erfüllt sind, können metrische Antworten mit dem Student-Test (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 Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet werden.
45. 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) zusammengefasst werden. Ansonsten sind alle Behandlungen mit der Lösungsmittelkontrolle zu vergleichen.

Prüfbericht

46. Der Testbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie

- Identität der Prüfchemikalie (Charge, Los, CAS-Nummer und Reinheit);
- physikalisch-chemische Merkmale der Prüfchemikalie (z. B. $\log K_{ow}$, Wasserlöslichkeit, Dampfdruck und Henry-Konstante (H) sowie vorzugsweise Angaben zur Persistenz der Prüfchemikalie im Boden) (so weit verfügbar);
- wenn die Chemikalie nicht in reiner Form verwendet wird, sind die Formulierung der Prüfchemikalie und verwendete Additive anzugeben;

Testorganismen

- Art und Herkunft der Testorganismen, Beschreibung der Zuchtbedingungen und Altersspektrum der Testorganismen;

Prüfbedingungen

- Beschreibung des Prüfprotokolls und des Prüfverfahrens;
- Angaben zur Herstellung des im Versuch verwendeten Bodens; bei Naturboden eine ausführliche Beschreibung (Herkunft, Geschichte, Partikelgrößenverteilung, pH-Wert, organische Bestandteile);
- Wasserrückhaltefähigkeit des Bodens;
- Beschreibung des Verfahrens zur Einbringung der Prüfchemikalie in den Boden;
- 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 während des Versuchs (Kontrolle und jede einzelne Testkonzentration);
- detaillierte Beschreibung des Extraktionsverfahrens und der Wirksamkeit des Verfahrens;

Prüfresultate:

- Anzahl der in den einzelnen Testbehältnissen ermittelten Jungtiere am Ende des Versuchs;
- Anzahl der in den einzelnen Testbehältnissen ermittelten adulten Tiere und der ermittelten adulten toten Tiere (%) am Ende des Versuchs;
- Beschreibung offensichtlicher physiologischer oder pathologischer Symptome oder deutlicher Verhaltensänderungen;
- Ergebnisse mit der Referenzchemikalie;
- die NOEC/LOEC, der LC_x -Wert (Mortalität) und die EC_x -Werte für die Reproduktionsleistung (in erster Linie LC_{50} , LC_{10} , EC_{50} und EC_{10}) sowie die 95%-Konfidenzintervalle; eine grafische Darstellung des angepassten Berechnungsmodells; die Funktionsgleichung und die Parameter der Gleichung (9);
- sämtliche Informationen und Beobachtungen, die für die Interpretation der Ergebnisse hilfreich sein könnten,
- wenn eine Hypothesenprüfung vorgenommen wird, die Aussagekraft des Tests (9);
- Abweichungen von den für diese Prüfmethode beschriebenen Verfahren und außergewöhnliche Vorkommnisse während der Prüfung;
- die Validität des Tests;
- für die NOEC (wenn bestimmt), der mindestens nachweisbare Unterschied.

LITERATUR

- (1) Wiles, JA, und Krogh, PH (1998) Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. Handbook of soil invertebrate toxicity tests (Hrsg. H Løkke und CAM Van Gestel), S. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester
- (2) ISO (1999) Bodenbeschaffenheit – Wirkung von Schadstoffen auf Collembolen (*Folsomia candida*) – Verfahren zur Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung, Nr. 11267, International Organisation for Standardisation, Genf.
- (3) Burges, A, und Raw, F. (Hrsg.) (1967) Soil Biology. Academic Press. London
- (4) Petersen, H., und Luxton, M. (1982) A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388
- (5) Petersen, H. (1994) A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118
- (6) Hopkin, S.P. (1997). *Biology of the Springtails (Insecta : Collembola)*. Oxford University Press. 330 S. (ISBN 0-19-854084-1)
- (7) Ulber, B. (1983) Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In: New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Hrsg.), Unterlagen des VI. internationalen Kolloquiums über Bodenzologie (International Colloquium on Soil Zoology) , Louvain-la-Neuve (Belgien), 30. August bis 2. September 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, S. 261-268
- (8) In diesem Anhang Kapitel C.36 *Reproduktionstest mit Raubmilben (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) in Bodenproben*
- (9) OECD (2006), Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OECD Paris
- (10) Scott-Fordsmand, J.J., und Krogh, P.H. (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nr. 986. Miljøstyrelsen, 61 S., Danish Ministry for the Environment.
- (11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Environmental Protection Agency, Environmental Project No. 1256, S. 66.

- (12) Krogh, P.H., Johansen, K., und Holmstrup, M. (1998) Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. *Appl. Soil Ecol.* 7, 201-205
- (13) Fjellberg, A. (1980) Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.
- (14) Edwards, C.A. (1955) Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In *Soil Zoology* (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, London, S. 412-416
- (15) Goto, H.E. (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. *Entomologists' Monthly Magazine* 96:138-140.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Die folgenden Begriffsbestimmungen beziehen sich auf diese Prüfmethode. (Bei dieser Prüfung werden die Wirkungskonzentrationen als Masse der Prüfchemikalie bezogen auf die Trockenmasse des Testbodens ausgedrückt.)

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch.

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

LOEC (niedrigste geprüfte Konzentration, bei der noch schädliche Wirkungen beobachtet werden): niedrigste Konzentration der Prüfchemikalie innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer mit statistisch signifikanter Wirkung ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle.

ECx (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 während einer bestimmten Expositionsdauer bei 50 % einer exponierten Population eine Wirkung auf einen Endpunkt der Prüfung erwartet wird.

Prüfchemikalie: ein beliebiger Stoff oder ein beliebiges Gemisch, der/das nach dieser Methode geprüft wird.

Anlage 2

WESENTLICHE SCHRITTE UND VERLAUF EINES COLEMBOLLEN-TESTS

Die einzelnen Schritte des Tests lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Zeitpunkt (Tag)	Schritt
-23 bis -26	Herstellen einer synchronen <i>F.-fimetaria</i> -Kultur
-14	Herstellen des künstlichen Bodens (Mischen trockener Bestandteile) Prüfung des pH-Werts des künstlichen Bodens und entsprechende Einstellung Messung der maximalen Wasserrückhaltefähigkeit des Bodens
-9 bis -12	Herstellen einer synchronen <i>F.-candida</i> -Kultur
-2 bis -7	Vortränken des Bodens
-1	Aufteilung der juvenilen Tiere in Chargen Herstellen der Stammlösungen und Applikation der Prüfchemikalie, wenn ein Lösungsmittel benötigt wird
0	Herstellen der Stammlösungen und Applikation der Prüfchemikalie, wenn eine feste Chemikalie oder eine Lösung in Wasser verwendet oder eine oberflächliche Applikation vorgenommen werden muss Messen des pH-Werts des Bodens und Wiegen der Behältnisse Zugabe des Futters; Einsetzen der Collembolen
14	Vorversuch mit <i>F. fimetaria</i> : Beenden des Tests, Extrahieren der Tiere, Messen des pH-Werts des Bodens und des Wasserverlusts (Gewicht) Definitive Tests: Messen des Feuchtegehalts Auffüllen mit Wasser und Zugabe von 2-10 mg Hefe
21	Definitiver Test mit <i>F. fimetaria</i> : Beenden des Tests, Extrahieren der Tiere, Messen des pH-Werts des Bodens und des Wasserverlusts (Gewicht) Vorversuch mit <i>F. candida</i> : Beenden des Tests, Extrahieren der Tiere, Messen des pH-Werts des Bodens und des Wasserverlusts (Gewicht)
28	Definitiver Test mit <i>F. candida</i> : Beenden des Tests, Extrahieren der Tiere, Messen des pH-Werts des Bodens und des Wasserverlusts (Gewicht)

Anlage 3

LEITLINIEN ZUR ZUCHT UND ZUR SYNCHRONISIERUNG VON *F. FIMETARIA* UND *F. CANDIDA*

Die Angaben in diesen Leitlinien zu Zeitpunkten und Dauer der einzelnen Schritte sind für jeden einzelnen Collembolen-Stamm gesondert zu prüfen, um sicherzustellen, dass der Zeitrahmen eine hinreichende Synchronisierung der juvenilen Tiere ermöglicht. Der Tag für die Entnahme der Eier und der synchronen juvenilen Tiere richtet sich nach dem Zeitpunkt der Eiablage nach Einsetzen der adulten Tiere in ein frisches Substrat und nach dem Zeitpunkt des Schlüpfens.

Es wird eine Dauerkultur bestehend aus z. B. 50 Behältnissen/Petrischalen empfohlen. Die Stammkultur ist wöchentlich mit ausreichend Futter und Wasser zu versorgen; Futterreste und tote Tiere werden entfernt. Wenn sich zu wenige Collembolen auf dem Substrat befinden, kann es zu einer Inhibition durch verstärktes Wachstum von Pilzen kommen. Wird die Stammkultur zu häufig zur Gewinnung von Eiern genutzt, kann die Kultur ermüden. Anzeichen einer Erschöpfung sind tote adulte Tiere und Schimmel auf dem Substrat. Die nach der Erzeugung synchroner Tiere verbliebenen Eier können zur Verjüngung der Kultur genutzt werden.

In einer synchronen *F.-fimetaria*-Kultur sind die männlichen Tiere hauptsächlich aufgrund ihrer Größe von weiblichen Tieren zu unterscheiden. Die männlichen Tiere sind deutlich kleiner als die weiblichen Tiere und bewegen sich rascher als die weiblichen Tiere. Trotzdem erfordert die zuverlässige Erkennung der Geschlechter ein wenig Übung; eine Bestätigung kann durch eine mikroskopische Kontrolle des Genitalbereichs erfolgen (13).

1. Aufzucht

1.a. Herstellen des Kultursubstrats

Als Kultursubstrat wird Gips (Calciumsulfat) mit Aktivkohle verwendet. In diesem feuchten Substrat absorbiert die Aktivkohle freigesetzte Gase und Exkremete (14) (15). Um die Beobachtung der Collembolen zu erleichtern, können verschiedene Formen von Holzkohle verwendet werden. Für *F. candida* und *F. fimetaria* beispielsweise wird Holzkohlepulver verwendet. (Entsprechend entsteht ein schwarzgrauer Gips.)

Bestandteile des Substrats:

- 20 ml Aktivkohle
- 200 ml destilliertes Wasser
- 200 ml Gips

oder

- 50 g Aktivkohlepulver
- 260-300 ml destilliertes Wasser
- 400 g Gips.

Die Substratmischung muss sich vor der Verwendung absetzen können.

1. b. Bebrütung

Collembolen werden z. B. in Petrischalen (90 mm x 13 mm) gehalten, deren Boden mit einem 0,5 cm starken Gipssubstrat bzw. Holzkohlesubstrat bedeckt ist. Bei einer Temperatur von 20 ± 1 °C wird eine Photoperiode mit 12 h Licht und 12 h Dunkelheit (bei 400-800 lx) eingerichtet. Die Behältnisse sind ständig feucht zu halten, damit eine relative Luftfeuchte in den Behältnissen von 100 % gewährleistet ist. Dies kann durch freies Wasser im porösen Gips gewährleistet werden; allerdings ist die Entstehung eines Wasserfilms auf der Gipsoberfläche zu vermeiden. Wasserverluste können durch Zufuhr feuchter Umgebungsluft verhindert werden. Tote Tiere sind aus den Behältnissen zu entfernen, da sie die Schimmelbildung fördern könnten. Um die Eiablage anzuregen, müssen die adulten Tiere in Petrischalen mit frisch angesetztem Gips-/Aktivkohle-Substrat gesetzt werden.

1. c. Futter

Als einziges Futter wird sowohl für *F. candida* als auch für *F. fimetaria* Trockenhefe verwendet. Um Schimmelbildung vorzubeugen, wird frisches Futter ein- oder zweimal wöchentlich bereitgestellt. Das Futter wird in einem kleinen Haufen unmittelbar auf den Gips gegeben. Die Menge an bereitgestellter Backhefe ist der Größe der Collembolen-Population anzupassen, im Allgemeinen sind jedoch 2-15 mg ausreichend.

2. Synchronisierung

Der Test wird mit synchronisierten Tieren durchgeführt, um hinsichtlich des Larvenstadiums und der Größe der Tiere eine homogene Struktur zu gewährleisten. Außerdem ermöglicht die Synchronisierung bei *F. fimetaria* die Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Tieren ab einem Alter von 3 Wochen aufgrund des Geschlechtsdimorphismus (d. h. des Größenunterschieds). Im Folgenden wird ein Verfahren zur Gewinnung synchronisierter Tiere vorgeschlagen. (In der Praxis können sich einzelne Schritte unterscheiden.)

2. a. Synchronisierung

- Die vorgesehenen Behältnisse werden mit einer 0,5 cm hohen Schicht Gips-/Aktivkohle-Substrat gefüllt.
- Zur Eiablage werden 150-200 adulte Exemplare von *F. fimetaria* und 50-100 Exemplare von *F. candida* aus den 15-20 besten Stammkultur-Behältnissen mit dem 4-8 Wochen alten Substrat in die Behältnisse gesetzt und mit 15 mg Backhefe gefüttert. Die juvenilen Tiere dürfen nicht mit adulten Tieren zusammengebracht werden, da die Anwesenheit juveniler Tiere die Eiproduktion hemmen könnte.
- Die Kultur wird bei 20 ± 1 °C (durchschnittlich 20 °C) und einem Licht-Dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden (400-800 lx) gehalten. Es ist sicherzustellen, dass frisches Futter verfügbar ist und dass die Luft mit Wasser gesättigt ist. Futtermangel kann dazu führen, dass die Tiere auf die Eier koten und dass sich Pilze auf den Eiern bilden; bei *F. candida* kann es zudem vorkommen, dass die Tiere die eigenen Eier fressen. Nach 10 Tagen werden die Eier mit einer Nadel und einem Spatel vorsichtig entnommen und auf „Eier-Papier“ (kleine Stückchen Filterpapier, das in Gips-/Holzkohle-Schlamm getaucht wurde) gebracht. Dieses wird in ein Behältnis mit frischem Gips-/Holzkohle-Substrat gelegt. Danach werden einige Körner Hefe zum

Substrat hinzugeben, um die juvenilen Tiere anzulocken und sie dazu zu bringen, das „Eier-Papier“ zu verlassen. Wichtig ist, dass das Eier-Papier und das Substrat feucht sind, da sonst die Eier austrocknen. Alternativ können adulte Tiere 2-3 Tage nach Beginn der Eiablage aus den Synchronisierungsbehältnissen entnommen werden.

- Nach drei Tagen sind aus den meisten Eiern auf dem Eier-Papier Tiere geschlüpft; auch unter dem Papier können sich einige juvenile Tiere befinden.
- Damit die juvenilen Tiere eine einheitliche Altersstruktur haben, wird das Eier-Papier (mit den Eiern, aus denen noch keine Tiere geschlüpft sind) mit einer Pinzette aus der Petrischale genommen. Die juvenilen Tiere (inzwischen im Alter von 0-3 Tagen) verbleiben auf der Schale und werden mit Backhefe gefüttert. Eier, aus denen keine Tiere geschlüpft sind, werden verworfen.
- Eier und geschlüpfte juvenile Tiere werden auf die gleiche Weise gehalten wie die adulten Tiere. Bei *F. fimetaria* sind folgende Maßnahmen zu treffen: Es muss hinreichend frisches Futter bereitgestellt werden; altes schimmelndes Futter ist zu entfernen; nach einer Woche werden die juvenilen Tiere auf neue Petrischalen verteilt, wenn eine Populationsdichte von über 200 Tieren erreicht wurde.

2. b. Behandlung der Collembolen zu Beginn des Tests

- 9-12 Tage alte *F. candida* bzw. 23-26 alte *F. fimetaria* werden entnommen (z. B. durch Absaugung) und in ein kleines Behältnis mit einem feuchten Gips-/Holzkohle-Substrat gesetzt; der physische Zustand der Tiere wird unter einem binokularen Mikroskop geprüft. (Verletzte oder beschädigte Tiere werden verworfen.) Bei allen Behandlungsschritten müssen sich die Collembolen in einer feuchten Atmosphäre befinden, damit die Tiere nicht durch Austrocknung belastet werden; dazu können beispielsweise Oberflächen befeuchtet werden.
- Das Behältnis wird umgedreht; durch Klopfen wird bewirkt, dass die Collembolen auf das Bodensubstrat fallen. Elektrostatische Aufladungen sind zu vermeiden; ansonsten könnten die Tiere nach oben oder an die Seitenwände der Prüfgefäße gezogen werden und austrocknen. Die Neutralisierung kann mit einem Ionisierer erfolgen oder indem ein feuchtes Tuch unter die Behältnisse gelegt wird.
- Das Futter ist nicht an einer einzigen Stelle auszulegen, sondern über die gesamte Bodenfläche zu verteilen.
- Beim Einsetzen der Tiere und während des Tests sollte nicht an die Testbehältnisse geklopft oder anderweitig physisch auf die Testbehältnisse eingewirkt werden, damit der Boden nicht verdichtet wird und die Collembolen nicht gestört werden.

3. Alternative Collembolen-Arten

Für eine Untersuchung mit dieser Prüfmethode können auch andere Collembolen-Arten verwendet werden (beispielsweise *Proisotoma minuta*, *Isotoma viridis*, *Isotoma anglicana*, *Orchesella cincta*, *Sinella curviseta*, *Paronychiurus kimi*, *Orthonychiurus folsomi* oder *Mesaphorura macrochaeta*). Damit eine andere Art ausgewählt werden kann, müssen jedoch verschiedene Anforderungen erfüllt sein:

- Die Art muss eindeutig identifiziert worden sein;
- die Auswahl der jeweiligen Art ist zu begründen;
- die Reproduktionsbiologie muss in der Testphase so berücksichtigt werden, dass eine potenzielle Wirkung auch diesbezüglich festgestellt werden könnte;
- der Lebenszyklus der Art muss bekannt sein: Alter bei Erreichen der Geschlechtsreife, Dauer von der Eiablage bis zum Schlüpfen und exponierte Larvenstadien;
- das Testsubstrat und das bereitgestellte Futter müssen optimale Bedingungen für

- Wachstum und Reproduktion der Tiere bieten;
- die Variabilität muss so gering sein, dass die Toxizität präzise und genau abgeschätzt werden kann.

Anlage 4

EXTRAKTION UND ZÄHLEN DER TIERE

1. Zwei Extraktionsmethoden kommen in Betracht:

1.a. Erste Methode: Es kann ein auf den Grundsätzen von MacFadyen (1) beruhendes Extraktionsgerät mit kontrolliertem Temperaturgefälle verwendet werden. Die Wärme strömt (geregelt durch einen Thermistor auf der Oberfläche der Bodenprobe) aus einem Heizelement oben im Extraktionsbehälter. Die Temperatur in der gekühlten Flüssigkeit um das Aufnahmegefäß wird ebenfalls durch einen Thermistor auf der Oberfläche des (unter dem Boden befindlichen) Aufnahmegefäßes geregelt. Die Thermistoren sind an eine programmierbare Steuerung angeschlossen, die die Temperatur nach einem voreingestellten Programm regelt. Die Tiere fallen in das gekühlte Aufnahmegefäß (2 °C), dessen Boden mit Gips/Holzkohle bedeckt ist. Die Extraktion beginnt bei 25 °C; über insgesamt 48 Stunden wird die Temperatur alle 12 h automatisch um 5 °C erhöht. Nach 12 h bei einer Temperatur von 40 °C ist die Extraktion beendet.

1.b. Zweite Methode: Nach der Inkubationsdauer des Versuchs wird die Anzahl der juvenilen Collembolen durch Flotation ermittelt. Zu diesem Zweck wird der Test in Gefäßen mit einem Volumen von etwa 250 ml durchgeführt. Am Ende des Tests werden ca. 200 ml destilliertes Wasser hinzugegeben. Der Boden wird mit einem feinen Pinsel vorsichtig umgerührt, damit die Collembolen auf der Wasseroberfläche aufschwimmen können. Zum Wasser kann ein geringer Anteil (etwa 0,5 ml) schwarze Fotofarbe von Kentmere hinzugegeben werden, um durch Verstärken des Kontrasts zwischen dem Wasser und den weißen Collembolen die Zählung zu erleichtern. Die Farbe ist für Collembolen nicht giftig.

2. Zählen:

Die Anzahl der Tiere kann mit bloßem Auge oder unter einem Lichtmikroskop mit einem Trägernetz über dem Flotationsgefäß oder durch Fotografieren der Oberfläche der einzelnen Gefäße und anschließendes Zählen der Collembolen auf Vergrößerungen oder projizierten Bildern ermittelt werden. Außerdem können Verfahren der digitalen Bildverarbeitung zum Zählen genutzt werden (12). Alle Verfahren müssen validiert werden.

Anlage 5

ERMITTLUNG DER MAXIMALEN WASSERRÜCKHALTEFÄHIGKEIT DES BODENS

Die folgende Methode hat sich zur Bestimmung der maximalen Wasserrückhaltefähigkeit des Bodens bewährt. Sie wird in Anhang C von ISO DIS 11268-2 (Bodenbeschaffenheit - Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*), Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung) erläutert.

Mit einer geeigneten Vorrichtung zur Probenahme (etwa einem Schneckenrohr) wird eine bestimmte Menge (z. B. 5 g) des Testsubstrats entnommen. Der Boden des Rohres wird mit einem Stück feuchtem Filterpapier bedeckt; anschließend wird das Rohr in einem Wasserbad auf ein Gestell gesetzt. Das Rohr wird allmählich eingetaucht, bis das Wasser oberhalb des Bodens steht. Das Rohr wird etwa drei Stunden im Wasser belassen. Da das Wasser nicht vollständig von den Kapillaren des Bodensubstrats aufgenommen werden kann, wird das Rohr zur Entwässerung zwei Stunden in einem geschlossenen Gefäß (um ein Austrocknen zu verhindern) auf ein Bett aus sehr nassem, fein gemahlenem Quarzsand gesetzt. Anschließend wird die Probe gewogen und bei 105 °C auf eine konstante Masse getrocknet. Die Wasserrückhaltefähigkeit (WHC = *Water Holding Capacity*) wird wie folgt berechnet:

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

Dabei sind:

S = mit Wasser gesättigtes Substrat + Masse des Rohrs + Masse des Filterpapiers

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

D = Trockenmasse des Substrats

Anlage 6

PH-BESTIMMUNG DES BODENS

Die folgende Methode zur Ermittlung des pH-Werts eines Bodensubstrats beruht auf der Beschreibung in ISO DIS 10390: Bodenbeschaffenheit – Bestimmung des pH-Wertes.

Eine bestimmte Substratmenge wird mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Eine Bodensuspension (mindestens 5 g Boden) wird mit dem fünffachen Volumen einer 1-M-Lösung Kaliumchlorid (KCl) in Analysequalität oder einer 0,01-M-Calciumchlorid-Lösung (CaCl₂) in Analysequalität hergestellt. Die Suspension wird fünf Minuten sorgfältig geschüttelt und bleibt dann mindestens 2 und höchstens 24 Stunden zum Ausfällen stehen. 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.

C.40. Lebenszyklus-Toxizitätstests bei Chironomiden in Sediment-Wasser-Systemen mit dotiertem Sediment

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 233 (2010). Sie dient der Bewertung der Wirkung einer lebenslangen Chemikalienexposition sedimentbewohnender Larven von *Chironomus sp.*, einem in Süßwasser lebenden Zweiflügler, unter vollständiger Berücksichtigung der 1. Generation (Generation P) und eines frühen Stadiums der 2. Generation (Generation F1). Die Methode ist eine Erweiterung der bestehenden Prüfmethode C.28 (1) bzw. C.27 (15), bei der die Exposition über dotiertes Wasser bzw. über ein dotiertes Sediment erfolgt. Dabei werden bestehende Protokolle für Toxizitätstests mit *Chironomus riparius* und *Chironomus dilutus* (früher auch als *C. tentans* bezeichnet (2)) berücksichtigt, die in Europa und in Nordamerika entwickelt (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9) und anschließend in Ringtests geprüft wurden (1)(7)(10)(11)(12). Auch andere gut dokumentierte Chironomiden-Arten wie *Chironomus yoshimatsui* (13)(14) sind geeignet. Die Exposition erfolgt insgesamt über eine Dauer von etwa 44 Tagen (*C. riparius* und *C. yoshimatsui*) bzw. ca. 100 Tagen (*C. dilutus*).
2. Für diese Prüfmethode wird sowohl die Wasser- als auch Sedimentexposition beschrieben. Die Wahl des Szenarios hängt vom jeweiligen Testziel ab. Die Exposition über Wasser durch Dotieren der Wassersäule soll Sprühverluste beim Aufbringen von Pestiziden simulieren. Dieses Szenario erfasst die Ausgangsspitzen der Konzentration im Oberflächenwasser. Die Dotierung des Wassers ist auch zur Simulation anderer Expositionstypen geeignet (einschließlich Austritt von Chemikalien). Für Anreicherungsprozesse in Sedimenten über Zeiträume, die die Testdauer überschreiten, ist diese Prüfmethode hingegen nicht geeignet. In diesem Fall sowie wenn die Pestizide vorwiegend durch Ablauf in Wasserkörper gelangen, kann ein Prüfprotokoll mit einem dotierten Sediment eher angemessen sein. Sind andere Expositionsszenarien von Interesse, kann das Prüfprotokoll leicht entsprechend angepasst werden. Wenn die Verteilung der Prüfchemikalie zwischen der Wasserphase und der Sedimentschicht nicht von Belang ist und die Adsorption in das Sediment minimiert werden muss, kann die Verwendung eines künstlichen Sedimentsurrogats (z. B. Quarzsand) in Erwägung gezogen werden.
3. An sedimentbewohnenden Organismen zu testende Chemikalien können in Sedimenten eine lange Persistenz haben. Bei sedimentbewohnenden Organismen kommen mehrere Expositionspfade in Betracht. Die relative Bedeutung der einzelnen Expositionspfade und die Geschwindigkeit, mit der diese jeweils zu den gesamten toxischen Wirkungen beitragen, hängen von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der betreffenden Chemikalie ab. Bei stark absorbierenden Chemikalien und bei kovalent an das Sediment gebundenen Chemikalien kann die Aufnahme von Schadstoffen über die Nahrung einen wichtigen Expositionspfad darstellen. Die Toxizität hoch lipophiler Chemikalien sollte nicht unterschätzt werden, weshalb gegebenenfalls vor Applikation der Prüfchemikalie dem Sediment Futter hinzugegeben werden sollte (siehe Nummer 31). Daher können alle Expositionspfade und alle Lebensstadien berücksichtigt werden.

4. Zu messende Endpunkte sind die Gesamtzahl der geschlüpften Imagines (1. und 2. Generation), die Entwicklungsrate (1. und 2. Generation), das Geschlechterverhältnis vollständig entwickelter und lebendiger adulter Tiere (1. und 2. Generation), die Anzahl der Eistränge pro weibliches Tier (nur 1. Generation) und die Fertilität der Eistränge (1. Generation).
5. Es wird nachdrücklich empfohlen, formuliertes Sediment zu verwenden, da es gegenüber natürlichen Sedimenten mehrere Vorteile hat:
 - Die Variabilität zwischen den Versuchen ist weniger groß, da formuliertes Sediment eine reproduzierbare „standardisierte Matrix“ ergibt und es nicht erforderlich ist, Quellen unkontaminierter, sauberer Sedimente ausfindig zu machen;
 - es kann jederzeit mit den Versuchen begonnen werden, ohne durch jahreszeitliche Schwankungen gestört zu werden und ohne dass eine Vorbehandlung zur Defaunierung des Sediments erforderlich wäre;
 - die Verwendung von formulierten Sedimenten reduziert die Kosten, die bei Feldprobenahmen ausreichender Sedimentmengen für Routineprüfungen anfallen;
 - die Verwendung formulierter Sedimente ermöglicht Toxizitätsvergleiche und die entsprechende Einstufung der Chemikalien (3).
6. Definitionen der verwendeten Begriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFUNG

7. Chironomiden-Larven im ersten Larvenstadium (L1-Larven) werden einem bestimmten Konzentrationsbereich der Prüfchemikalie im Sediment-Wasser-System ausgesetzt. Zu Beginn des Tests werden die L1-Larven (1. Generation) in die Prüfgefäße mit dem dotierten Sediment gesetzt; alternativ kann die Prüfchemikalie auch erst nach dem Einsetzen der Larven zum Wasser hinzugegeben werden. Die Schlupfrate, der Zeitraum bis zum Schlüpfen und das Geschlechterverhältnis der vollständig entwickelten und lebenden Mücken werden bestimmt. Die geschlüpften Imagines werden in Zuchtkäfige umgesetzt, um die Schwarmbildung, die Paarung und die Eiablage zu fördern. Die Anzahl der entstandenen Eistränge und die Fertilität der Eistränge werden ermittelt. Aus diesen Eisträngen werden L1-Larven der 2. Generation im ersten Entwicklungsstadium entnommen. Die Larven werden in frisch vorbereitete Prüfgefäße gesetzt (Dotierung wie bei der 1. Generation), um die Lebensfähigkeit der 2. Generation anhand der Schlupfrate, des Zeitraums bis zur Emergenz und des Geschlechterverhältnisses der vollständig entwickelten und lebenden Mücken zu bestimmen. (Anlage 5 enthält Abbildungen zur Veranschaulichung des Lebenszyklustests.) Alle Daten werden entweder mit einem Regressionsmodell analysiert, um die Konzentration zu ermitteln, bei der sich für den relevanten Endpunkt eine Reduzierung um X % ergibt, oder einer Hypothesenprüfung zur Bestimmung der NOEC (höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkung) unterzogen. Hierzu sind die Reaktionen der Prüfchemikalien anhand statistischer Tests mit der Reaktion der Kontrollen zu vergleichen. Bei der Prüfung mit dotiertem Wasser sind im Falle sich rasch abbauender Chemikalien die späteren Entwicklungsstadien der einzelnen Generationen (z. B. das Puppenstadium) unter Umständen erheblich niedrigeren Konzentrationen im Überstandswasser ausgesetzt als die Larven im ersten Entwicklungsstadium. Wenn dies als problematisch betrachtet und ein für alle Stadien vergleichbares Expositionsniveau benötigt wird,

sind die folgenden Änderungen der Prüfmethode in Erwägung zu ziehen:

- parallele Versuche mit Dotierungen in unterschiedlichen Stadien oder
- wiederholtes Dotieren (oder Erneuern des Überstandswassers) im Prüfsystem in beiden Testphasen (1. und 2. Generation); die Dotierungsintervalle (Erneuerungsintervalle) sind entsprechend der Beständigkeit der Prüfchemikalie anzupassen.

Die entsprechenden Änderungen können nur bei dem Verfahren mit dotiertem Wasser, nicht aber bei der Prüfung mit einem dotierten Sediment vorgenommen werden.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

8. Wasserlöslichkeit und Dampfdruck der Prüfchemikalie und der $\log\text{-}K_{ow}$ -Wert, die gemessene oder berechnete Verteilung der Prüfchemikalie im Sediment sowie ihre Stabilität im Wasser und im Sediment sollten bekannt sein. Ein zuverlässiges analytisches Verfahren für die Quantifizierung der Prüfchemikalie im Überstandswasser, Porenwasser und Sediment mit bekannter und dokumentierter Genauigkeit und Nachweisgrenze sollte vorhanden sein. Weitere nützliche Informationen sind z. B. die Strukturformel und der Reinheitsgrad der Prüfchemikalie. Informationen über die Persistenz und das Verhalten der Prüfchemikalie in der Umwelt (zu beurteilen u. a. anhand der Verlustrate sowie des abiotischen und biotischen Abbaus). Hinweise zu Prüfchemikalien mit physikalisch-chemischen Merkmalen, welche die Durchführung des Tests erschweren, sind Quelle (16) zu entnehmen.

REFERENZSTOFFE

9. Durch regelmäßige Tests mit Referenzchemikalien kann sichergestellt werden, dass sich die Empfindlichkeit der Laborpopulation nicht geändert hat. Ebenso wie bei Daphnien ist ein akuter Test über eine Dauer von 48 h ausreichend (nach 17). Solange noch keine validierte Leitlinie für einen Test zur akuten Toxizität verfügbar ist, kann auch ein Test zur Ermittlung der chronischen Toxizität (siehe in diesem Anhang Kapitel C.28) durchgeführt werden. Die folgenden Referenzgiftstoffe beispielsweise wurden erfolgreich in Ringtests und Validierungsstudien verwendet: Lindan, Trifluralin, Pentachlorphenol, Cadmiumchlorid und Kaliumchlorid (1)(3)(6)(7)(18).

VALIDITÄT DES TESTS

10. Der Test ist gültig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:
 - Die mittlere Schlupfrate in der Kontrolle muss am Ende der Expositionsdauer für beide Generationen mindestens 70 % betragen (1)(7);
 - bei *C. riparius* und *C. yoshimatsui* sollten mindestens 85 % aller Imagines der Kontrolle in beiden Generationen 12-23 Tage nach dem Einsetzen der L1-Larven in die Gefäße geschlüpft sein; bei *C. dilutus* sind 20-65 Tage annehmbar;
 - das mittlere Geschlechterverhältnis vollständig entwickelter und lebender Imagines (weiblicher bzw. männlicher Anteil) der Kontrolle muss bei beiden Generationen mindestens 0,4 betragen und sollte nicht über 0,6 liegen;

- in jedem Zuchtkäfig muss die Anzahl der Eistränge in den Kontrollen der 1. Generation mindestens 0,6 für jedes in den Zuchtkäfig eingesetzte weibliche Tier betragen;
- der Anteil der befruchteten Eistränge in jedem Zuchtkäfig der Kontrollen der 1. Generation muss mindestens bei 0,6 liegen;
- am Ende der Expositionsdauer für beide Generationen sind in jedem Gefäß der pH-Wert und die Konzentration an gelöstem Sauerstoff zu messen. Der Sauerstoffgehalt sollte mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes¹ betragen, und der pH-Wert des Überstandswassers sollte in allen Prüfgefäßen zwischen 6 und 9 liegen;
- die Wassertemperatur sollte um nicht mehr als $\pm 1,0$ °C schwanken.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Prüfgefäße und Zuchtkäfige

11. Die Larven werden der Prüfchemikalie in 600-ml-Glasbechergläsern mit einem Durchmesser von 8,5 cm ausgesetzt (siehe Anlage 5). Andere Gefäße sind ebenfalls geeignet, sofern sie Überstandswasser und Sediment in entsprechender Höhe aufnehmen können. Die Sedimentoberfläche muss so bemessen sein, dass auf jede Larve 2-3 cm² kommen. Das Verhältnis zwischen Sedimentschicht und Überstandswasser beträgt 1:4. Die Zuchtkäfige (B x H x T jeweils mindestens 30 cm) werden oben und mindestens auf einer Seite mit einer Gaze (Maschenweite ca. 1 mm) verschlossen (siehe Anlage 5). In jeden Käfig wird eine 2-l-Kristallisierungsschale mit Testwasser und dem Sediment zur Eiablage gestellt. Auch bei der Kristallisierungsschale muss das Verhältnis zwischen Sedimentschicht und Überstandswasser etwa 1:4 betragen. Nachdem die Eistränge von der Kristallisierungsschale entnommen wurden, werden sie in eine Mikrotiterplatte mit 12 Vertiefungen gegeben (jeweils ein Eistrang pro Vertiefung mit jeweils mindestens 2,5 ml Wasser aus der dotierten Kristallisierungsschale); anschließend werden die Platten mit einem Deckel verschlossen, um erhebliche Verdunstungsverluste auszuschließen. Alternativ können auch andere zur Aufnahme der Eistränge geeignete Gefäße verwendet werden. Mit Ausnahme der Mikrotiterplatten müssen alle Prüfgefäße und sonstigen Geräte, die mit dem Prüfsystem in Kontakt kommen, vollständig aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Material (z. B. Teflon) bestehen.

Auswahl der Testspezies

12. Als Testspezies sollte bevorzugt *Chironomus riparius* eingesetzt werden. Alternativ kann auch *C. yoshimatsui* verwendet werden. *C. dilutus* ist ebenfalls geeignet, aber schwieriger zu handhaben und erfordert eine längere Prüfdauer. Einzelheiten zu den Anzuchtverfahren für *C. riparius* sind Anlage 2 zu entnehmen. Informationen zu Kulturbedingungen sind auch für *C. dilutus* (5) und *C. yoshimatsui* (14) verfügbar. Die Identität der Spezies ist vor der Prüfung zu bestätigen, allerdings ist dies nicht vor

¹ Bei 20 °C und normalem Atmosphärendruck beträgt der Luftsauerstoff-Sättigungswert in Süßwasser 9,1 mg/l (60 % = 5,46 mg/l).

jedem Test erforderlich, wenn die Organismen aus laboreigener Zucht stammen.

Sediment

13. Vorzugsweise ist formuliertes Sedimentmaterial (so genanntes rekonstituiertes, künstliches oder synthetisches Sediment) zu verwenden. Wenn jedoch natürliches Sediment verwendet wird, so ist es zu charakterisieren (zumindest pH-Wert und Gehalt an organischem Kohlenstoff; die Bestimmung sonstiger Parameter wie C/N-Verhältnis und Granulometrie wird ebenfalls empfohlen). Das Sediment muss frei von Verunreinigungen sowie von Konkurrenten und Fressfeinden der Chironomidlarven sein. Außerdem sollten die Sedimente vor dem Versuch sieben Tage unter Testbedingungen akklimatisiert werden. Für den Versuch wird das folgende formulierte Sediment (siehe (1)) empfohlen (1)(20)(21):
 - a. 4-5 % (bezogen auf die Trockenmasse) Torf: so nahe wie möglich bei pH 5,5-6,0; wichtig: Torf in Pulverform, feingemahlen (Partikelgröße ≤ 1 mm) und nur luftgetrocknet, verwenden;
 - b. 20 % (bezogen auf die Trockenmasse) Kaolin-Ton (Kaolingehalt vorzugsweise über 30 %);
 - c. 75-76 % (bezogen auf die Trockenmasse) Quarzsand (hauptsächlich Feinsand, der zu mehr als 50 % eine Korngröße von 50-200 μm aufweist);
 - d. der Feuchtegehalt der fertigen Mischung wird durch die Zugabe von entionisiertem Wasser auf einen Wert 30–50 % eingestellt;
 - e. durch Zugabe von chemisch reinem Calciumcarbonat (CaCO_3) wird die fertige Mischung des Sediments auf einen pH-Wert von $7,0 \pm 0,5$ eingestellt;
 - f. der Gehalt der fertigen Mischung an organischem Kohlenstoff muss bei 2 % ($\pm 0,5$ %) liegen und ist durch Zugabe geeigneter Mengen Torf und Sand (siehe Buchstaben a und c) zu gewährleisten.
14. Die Herkunft von Torf, Kaolin-Ton und Sand muss bekannt sein. Die Bestandteile des Sediments sind auf chemische Verunreinigungen (z. B. durch Schwermetalle, chlororganische Verbindungen, phosphororganische Verbindungen) zu prüfen. Ein Beispiel für die Herstellung des formulierten Sediments ist in Anlage 3 beschrieben. Die Bestandteile können auch in trockenem Zustand gemischt werden, sofern nachgewiesen ist, dass es nach Zugabe des Überstandswassers nicht zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile kommt (z. B. mit aufschwimmenden Torfpartikeln) und dass der Torf bzw. das Sediment ausreichend konditioniert ist.

Wasser

15. Alle Wassersorten, die den chemischen Eigenschaften von zugelassenem Verdünnungswasser gemäß den Anlagen 2 und 4 entsprechen, sind als Testwasser geeignet. Natürliches Wasser (Oberflächen- oder Grundwasser), rekonstituiertes Wasser (siehe Anlage 2) oder entchlortes Leitungswasser sind als Hälterungs- und Verdünnungswasser zulässig, wenn die Chironomiden hierin während der Zucht- und Testphase ohne Stressanzeichen überleben. Bei Testbeginn muss der pH-Wert des

Testwassers zwischen 6 und 9 liegen, und die Gesamthärte des Wassers darf nicht mehr als 400 mg/l (in CaCO₃) betragen. Wird jedoch ein Ionenaustausch zwischen den Härteionen und der Prüfchemikalie vermutet, ist Wasser geringerer Härte zu verwenden (und somit in diesem Fall das ElenDt-Medium M4 zu vermeiden). Das Wasser muss über die gesamte Testdauer von gleichbleibender Qualität sein. Die Qualitätsparameter des Wassers gemäß Anlage 4 sind mindestens zweimal jährlich bzw. immer dann zu messen, wenn der Verdacht besteht, dass sie sich erheblich verändert haben.

Stammlösungen – dotiertes Wasser

16. a. Die Testkonzentrationen werden auf der Grundlage der Konzentrationen in der Wassersäule, d. h. im Überstandswasser, berechnet. Die Prüflösungen werden in der Regel durch Verdünnung einer Stammlösung in den gewünschten Konzentrationen zubereitet. Stammlösungen sollten möglichst durch Auflösung der Prüfchemikalie im Testwasser hergestellt werden. In einigen Fällen kann der Einsatz von Lösungs- oder Dispersionsmitteln erforderlich sein, um eine Stammlösung von geeigneter Konzentration zu erzielen. Geeignete Lösungsmittel sind beispielsweise Aceton, Ethylenglykol-Monoethylether, Ethylenglykol-Dimethylether, Dimethylformamid und Triethylenglykol. Geeignete Dispersionsmittel sind etwa Cremophor RH40, Tween 80, Methylzellulose 0,01 % und HCO-40. Die Konzentration des Lösungsvermittlers in dem endgültigen Prüfmedium sollte auf ein Mindestmaß (d. h. $\leq 0,1$ ml/l) beschränkt und bei allen Behandlungen gleich sein. Wird ein Lösungsvermittler verwendet, darf er keine signifikanten Wirkungen auf die Überlebensquote haben, was anhand einer Lösungsmittelkontrolle im Vergleich mit einer negativen (Wasser-)Kontrolle nachzuweisen ist. Es sollten jedoch alle Anstrengungen unternommen werden, um den Einsatz derartiger Stoffe zu vermeiden.

Stammlösungen – dotiertes Sediment

16. b. Die dotierten Sedimente der gewünschten Konzentration werden in der Regel zubereitet, indem eine Lösung der Prüfchemikalie direkt dem Sediment hinzugegeben wird. Eine Stammlösung der in entionisiertem Wasser gelösten Prüfchemikalie wird mithilfe eines Walzwerks oder Futtermischers oder per Hand mit dem formulierten Sediment gemischt. Wenn die Prüfchemikalie im Wasser schwer löslich ist, kann sie in dem kleinstmöglichen Volumen eines geeigneten organischen Lösungsmittels (z. B. Hexan, Aceton oder Chloroform) gelöst werden. Diese Lösung wird anschließend mit 10 g feinem Quarzsand je Prüfgefäß gemischt. Es wird abgewartet, bis das Lösungsmittel vollständig aus dem Sand verdunstet ist; danach wird der Sand mit einer geeigneten Menge des Sediments gemischt. Um die Prüfchemikalie zu lösen, zu dispergieren oder zu emulgieren, dürfen nur sich leicht verflüchtigende Lösungsmittel verwendet werden. Bei der Zubereitung des Sediments ist die in der Mischung von Prüfchemikalie und Sand enthaltene Sandmenge zu berücksichtigen (d. h. das Sediment sollte mit weniger Sand zubereitet werden). Es ist darauf zu achten, dass die Prüfchemikalie mit dem Sediment gut durchmischt wird, damit sie in dem Sediment homogen verteilt ist. Gegebenenfalls können Teilproben analysiert werden, um den Homogenitätsgrad zu bestimmen.

PRÜFPROTOKOLL

17. Unter „Prüfprotokoll“ sind die gewählte Anzahl und der Abstand der Testkonzentrationen, die Anzahl der Prüfgefäße je Konzentration und die Anzahl der Larven je Gefäß sowie die Anzahl der Kristallisierungsschalen und der Zuchtkäfige zu verstehen. Im Folgenden werden die Ermittlung der EC_x und der NOEC sowie ein Limit-Test beschrieben.

Versuchsaufbau für die Regressionsanalyse

18. Die Konzentration mit beobachteter Wirkung (EC_x) und der für die Wirkung der betreffenden Prüfchemikalie relevante Konzentrationsbereich sind durch den Versuch abzudecken, damit der Endpunkt nicht über die erzeugten Daten hinaus extrapoliert werden muss. Extrapolierungen weit unter der niedrigsten oder über der höchsten Konzentration sind zu vermeiden. Ein Vorversuch wie für die Prüfmethoden C.27 oder C.28 beschrieben kann für die Auswahl eines geeigneten Konzentrationsbereichs hilfreich sein.
19. Für die Bestimmung von EC_x werden mindestens fünf Konzentrationen und acht Replikate pro Konzentration benötigt. Für jede Konzentration werden zwei Zuchtkäfige (A und B) verwendet. Die acht Replikate werden in zwei Gruppen von jeweils vier Replikaten für die beiden Zuchtkäfige aufgeteilt. Diese Zusammenführung der Replikate ist aufgrund der Anzahl der Mücken erforderlich, die pro Käfig benötigt werden, um die Reproduktionsleistung zuverlässig bestimmen zu können. Für die 2. Generation werden wieder acht Replikate verwendet, die aus den der Prüfchemikalie ausgesetzten Populationen in den Zuchtkäfigen hervorgegangen sind. Die Konzentrationen dürfen sich höchstens um den Faktor 2 unterscheiden (außer bei einer schwachen Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve). Die Anzahl der Replikate pro Behandlung kann auf sechs (drei pro Zuchtkäfig) reduziert werden, wenn die Anzahl der Prüfkonzentrationen mit unterschiedlicher Wirkung erhöht wird. Eine höhere Anzahl an Replikaten oder eine Verkürzung der Intervalle zwischen den Prüfkonzentrationen führt tendenziell zu engeren Konfidenzintervallen um die EC_x -Werte.

Versuchsaufbau für die Bestimmung einer NOEC

20. Zur Bestimmung einer NOEC sind fünf Testkonzentrationen mit mindestens acht Replikate (jeweils 4 pro Zuchtkäfig (A und B)) zu verwenden; der Abstandsfaktor zwischen den einzelnen Konzentrationen darf nicht größer als 2 sein. Die Anzahl der Replikate muss ausreichen, um eine angemessene statistische Aussagekraft zu gewährleisten, mit der sich eine Differenz von 20 % zur Kontrollkonzentration bei einem Signifikanzniveau von 5 % ($\alpha = 0,05$) nachweisen lässt. Die Entwicklungsrate, Fekundität und Fertilität können gewöhnlich mit einer Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett- oder Williams-Test ermittelt werden (22-25). Zur Bestimmung der Schlupfrate und des Geschlechterverhältnisses können der Cochran-Armitage-Test, der Exakte Test nach Fisher (mit Bonferroni-Korrektur) oder der Mantel-Haenszel-Test durchgeführt werden.

Limit-Test

21. Falls der fakultative Vorversuch bis zu einer bestimmten Höchstkonzentration keine

Wirkungen zeigt, kann ein Limit-Test (mit einer Prüfkonzentration und einer oder mehreren Kontrollen) durchgeführt werden. Mit dem Limit-Test lassen sich etwaige toxische Wirkungen der Prüfchemikalie bei Konzentrationen oberhalb der getesteten Grenzkonzentration feststellen. Für Wasser werden 100 mg/l und für Sedimente 1000 mg/kg (bezogen auf die Trockenmasse) empfohlen. In der Regel sind jeweils mindestens acht Replikate pro Behandlung und Kontrolle erforderlich. Es ist nachzuweisen, dass die statistische Aussagekraft ausreicht, um bei einem Signifikanzniveau von 5 % ($\alpha = 0,05$) eine Differenz von 20 % zur Kontrollkonzentration festzustellen. Für metrische Merkmale (z. B. Entwicklungsrate) ist der t-Test eine geeignete statistische Methode, sofern die Daten die Bedingungen für diesen Test (Normalverteilung, Varianzhomogenität) erfüllen. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so kann ein t-Test für ungleiche Varianzen oder ein nicht-parametrischer Test wie der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet werden. Zur Bestimmung der Schlupfrate eignet sich der Exakte Test nach Fisher.

VERFAHREN

Expositionsbedingungen

Herstellung des Wasser-Sediment-Systems (Dotieren des Wassers)

22. a. Ein formuliertes Sediment (siehe Nummern 13 und 14 und Anlage 3) wird in einer mindestens 1,5 cm und höchstens 3 cm starken Schicht in die einzelnen Prüfgefäße und Kristallisierungsschalen gegeben. (Bei den Kristallisierungsschalen kann die Schicht etwas dünner sein.) Anschließend wird so viel Wasser (siehe Nummer 15) hinzugegeben, dass das Verhältnis der Tiefe der Sedimentschicht zur Wassertiefe maximal 1:4 beträgt. Nach der Vorbereitung der Prüfgefäße wird das Sediment-Wasser-System etwa sieben Tage moderat belüftet, bevor die L1-Larven der 1. und 2. Generation eingesetzt werden (siehe Nummer 14 und Anlage 3). Das Sediment-Wasser-System der Kristallisierungsschalen wird während des Tests nicht belüftet, da die Larven nicht am Leben erhalten zu werden brauchen. (Die Eistränge werden bereits vor dem Schlüpfen entnommen.) Um zu verhindern, dass es während der Zugabe von Prüfwasser in die Wassersäule zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile und einer Resuspension der feinen Partikel kommt, kann das Sediment beim Einfüllen des Wassers mit einer Plastikschaale abgedeckt werden. Die Schale wird anschließend sofort entfernt. Andere Hilfsmittel sind ebenfalls geeignet.

Herstellung des Wasser-Sediment-Systems mit dotiertem Wasser

22. b. Entsprechend der Beschreibung in Nummer 16b dotiertes Sediment wird in die Prüfgefäße und in die Kristallisierungsschalen gegeben und anschließend mit Wasser bis zu einem Sediment-Wasser-Verhältnis von 1:4 überschichtet. Das Sediment muss eine Tiefe von 1,5-3 cm haben. (In der Kristallisierungsschale kann die Schicht etwas dünner sein.) Um zu verhindern, dass es während der Zugabe von Prüfwasser in die Wassersäule zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile und einer Resuspension der feinen Partikel kommt, kann das Sediment beim Einfüllen des Wassers mit einer Plastikschaale abgedeckt werden, die anschließend sofort entfernt wird. Andere Hilfsmittel sind ebenfalls geeignet. Nach Fertigstellung des dotierten Sediments mit dem überschichteten Wasser ist abzuwarten, bis die Prüfchemikalie aus dem Sediment in die wässrige Phase partitioniert ist (4)(5)(7)(18). Dies sollte möglichst

unter denselben Temperatur- und Belüftungsbedingungen wie im Versuch erfolgen. Die erforderliche Zeit für die Einstellung des Gleichgewichts hängt vom Sediment und der Chemikalie ab. Manchmal reichen ein paar Stunden oder Tage, in seltenen Fällen können aber auch mehrere Wochen (bis zu fünf) erforderlich sein. Es sollte nicht abgewartet werden, bis das Gleichgewicht hergestellt ist, da es in dieser Zeit bei vielen Chemikalien zu Abbauprozessen kommen kann. Empfohlen wird eine Wartezeit von 48 Std. Wenn jedoch bekannt ist, dass die im Sediment enthaltene Chemikalie eine lange Abbau-Halbwertszeit hat (siehe Nummer 8), kann mehr Zeit für den Ausgleich vorgesehen werden. Am Ende dieser Gleichgewichtseinstellungszeit wird die Konzentration der Prüfchemikalie im Überstandswasser, im Porenwasser und im Sediment gemessen – zumindest die Höchstkonzentration und eine niedrigere Konzentration (siehe Nummer 38). Diese analytischen Bestimmungen der Prüfchemikalie ermöglichen es, die Massenbilanz zu berechnen und die Ergebnisse auf der Grundlage der gemessenen Konzentrationen darzustellen.

23. Die Prüfgefäße werden abgedeckt (z. B. mit Glasplatten). Um etwaige Verdunstungsverluste auszugleichen, kann während des Versuchs Wasser bis zum Ausgangsvolumen nachgefüllt werden. Dazu ist destilliertes oder entionisiertes Wasser zu verwenden, damit sich keine Salze bilden. Die Kristallisierungsschalen in den Zuchtkäfigen werden nicht abgedeckt; Wasserverluste während des Tests können (müssen aber nicht) ausgeglichen werden; die Eistränge kommen nämlich nur etwa einen Tag mit dem Wasser in Berührung, und die Schalen werden während des Tests nur kurze Zeit verwendet.

Einsetzen der Testorganismen

24. Vier bis fünf Tage vor dem Einsetzen der L1-Larven werden Eigelege aus den Kulturen entnommen und in kleinen Gefäßen in das Kulturmedium eingesetzt. Es kann „altes“ Medium aus den Stammkulturen oder frisch zubereitetes Medium verwendet werden. In jedem Fall ist eine geringe Futtermenge (z. B. einige Tröpfchen Filtrat einer fein gemahlten Suspension aus Fischfutterflocken) zum Kulturmedium hinzuzugeben (siehe Anlage 2). Es sollten nur frische Eigelege verwendet werden. Normalerweise beginnen die Larven einige Tage nach dem Einsetzen der Eier zu schlüpfen (*C. riparius*: 2-3 Tage bei 20 °C, *C. tentans* und *C. yoshimatsui*: 1-4 Tage bei 23 °C bzw. 25 °C) und durchlaufen während ihres Wachstums vier Stadien von jeweils 4-8 Tagen. Für den Versuch sollten Larven des ersten Larvenstadiums (L1) (maximal 48 h nach dem Schlüpfen) verwendet werden. Das Larvenstadium kann unter Umständen anhand der Kopfkapselbreite bestimmt werden (7).
25. Jeweils 20 L1-Larven der 1. Generation werden nach dem Zufallsprinzip mit einer stumpfen Pipette in die einzelnen Prüfgefäße mit dem Sediment-Wasser-System eingesetzt. Während des Einsetzens der Larven in das Prüfgefäß und der folgenden 24 Stunden wird die Belüftung des Wassers abgestellt (siehe Nummer 32). Je nach Prüfprotokoll (siehe Nummern 19 und 20) werden pro Konzentration für die Ermittlung der EC_x-Werte mindestens 120 Larven (6 Replikate pro Konzentration) und zur Bestimmung der NOEC mindestens 160 Larven (8 Replikate pro Konzentration) verwendet. Bei dem Versuchsaufbau mit dem dotierten Sediment beginnt die Exposition mit dem Einsetzen der Larven.

Dotieren des Überstandswassers

26. 24 Stunden nach dem Einsetzen der L1-Larven der 1. Generation wird die Prüfchemikalie in die überstehende Wassersäule dotiert und das System wird erneut schwach belüftet. (Zu möglichen Änderungen des Prüfprotokolls siehe Nummer 7). Kleine Mengen der Stammlösungen mit der Prüfchemikalie werden unterhalb der Oberfläche der Wassersäule pipettiert. Anschließend wird das Überstandswasser vorsichtig gemischt, um das Sediment nicht aufzuwirbeln. Beim Versuch mit dem dotierten Wasser beginnt die Exposition mit dem Dotieren des Wassers (d. h. einen Tag nach Einsetzen der Larven).

Entnahme geschlüpfter Imagines

27. Geschlüpfte Mücken der 1. Generation werden mindestens einmal, vorzugsweise sogar zweimal täglich mit einem Saugergerät, einem Abzug oder einem ähnlichen Gerät aus den Prüfgefäßen abgesaugt (Nummer 36) (siehe Anlage 5). Dabei ist darauf zu achten, dass die Imagines nicht beschädigt werden. Die abgesaugten Mücken aus vier Prüfgefäßen jeweils einer Konzentration werden in den Zuchtkäfig entlassen, dem sie bereits vorher zugeordnet waren. Am Tag, an dem die ersten (männlichen) Imagines schlüpfen, werden die Kristallisierungsgefäße dotiert, indem eine kleine Menge der Stammlösung mit der Prüfchemikalie unter die Wasseroberfläche pipettiert wird (bei dem Versuchsaufbau mit dem dotierten Wasser). Anschließend wird das Überstandswasser vorsichtig gemischt, um das Sediment nicht aufzuwirbeln. Die nominelle Konzentration der Prüfchemikalie im Kristallisierungsgefäß stimmt mit der der Gefäße mit den Testkonzentrationen überein, die dem jeweiligen Zuchtkäfig zugeordnet sind. Bei dem Versuchsaufbau mit dem dotierten Sediment werden die Kristallisierungsschalen um Tag 11 nach Beginn der Exposition (d. h. nach Einsetzen der Larven der 1. Generation) angesetzt, damit sich im Laufe von etwa 48 Stunden ein Ausgleich entwickeln kann, bevor die ersten Eistränge abgelegt werden.
28. Die Eistränge werden mit einer Pinzette oder einer stumpfen Pipette aus der Kristallisierungsschale im Zuchtkäfig entnommen. Jeder Eistrang wird einzeln in ein Gefäß mit dem Kulturmedium aus der Kristallisierungsschale gebracht, aus der es auch entnommen wurde (z. B. eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 12 Vertiefungen mit mindestens 2,5 ml des Mediums). Die Gefäße mit den Eisträngen werden mit einem Deckel verschlossen, um eine wesentliche Verdunstung zu verhindern. Die Eistränge werden mindestens sechs Tage nach der Ablage zur Beobachtung aufbewahrt, um feststellen zu können, ob die Eier befruchtet wurden. Als Ausgangsmaterial für die 2. Generation werden aus jedem Zuchtkäfig mindestens drei und vorzugsweise sechs befruchtete Eistränge entnommen; anschließend wird etwas Futter bereitgestellt und gewartet, bis die Mücken schlüpfen. Die Eistränge sind zum Höhepunkt der Eiablage entstanden; dieser liegt bei den Kontrollen gewöhnlich um Tag 19 des Tests. Im Idealfall wird mit dem Aufbau der 2. Generation sämtlicher Konzentrationen der Prüfchemikalie am selben Tag begonnen; aufgrund chemischer Wirkungen auf die Entwicklung der Larven ist dies unter Umständen jedoch nicht immer möglich. In diesen Fällen kann der Aufbau in den höheren Konzentrationen später begonnen werden als bei den niedrigeren Konzentrationen und bei der (Lösungsmittel-)Kontrolle.
29. a. Beim Versuch mit dem dotierten Wasser wird das Sediment-Wasser-System für die Larven der 2. Generation hergestellt, indem etwa eine Stunde vor dem Einsetzen

der L1-Larven in die Prüfgefäße die Prüfchemikalie in das Überstandswasser dotiert wird. Kleine Mengen der Lösungen mit der Prüfchemikalie werden unterhalb der Oberfläche der Wassersäule pipettiert. Anschließend wird das Überstandswasser vorsichtig gemischt, um das Sediment nicht aufzuwirbeln. Nach dem Dotieren erfolgt eine schwache Belüftung.

29. b. Beim Versuch mit dem dotierten Sediment werden die Expositionsgefäße mit dem Sediment-Wasser-System für Larven der 2. Generation auf die gleiche Weise vorbereitet wie für die Larven der 1. Generation.
30. Jeweils 20 L1-Larven der 2. Generation werden spätestens 48 h nach dem Schlüpfen nach dem Zufallsprinzip mit einer stumpfen Pipette in die einzelnen Prüfgefäße mit dem dotierten Sediment-Wasser-System eingesetzt. Während des Einsetzens der L1-Larven in das Prüfgefäß und der folgenden 24 Std. wird die Belüftung gestoppt. Je nach Prüfprotokoll (siehe Nummern 19 und 20) werden pro Konzentration für die Ermittlung der EC_x-Werte mindestens 120 Larven (6 Replikate pro Konzentration) und zur Bestimmung der NOEC mindestens 160 Larven (8 Replikate pro Konzentration) verwendet.

Futter

31. Die Larven in den Prüfgefäßen müssen täglich, mindestens jedoch dreimal pro Woche gefüttert werden. Pro juvenile Larve und Tag sind in den ersten 10 Tagen ihres Lebenszyklus 0,25-0,5 mg (bzw. 0,35-0,5 mg bei *C. yoshimatsui*) Fischfutter (suspendiert in Wasser oder fein gemahlenen (z. B. Tetra-Min oder Tetra-Phyll; siehe Anlage 2) angemessen. Ältere Larven benötigen etwas mehr Nahrung. Für den Rest des Versuchs dürften 0,5-1,0 mg Futter pro Larve und Tag ausreichen. Bei Pilzbesatz oder Absterben von Kontrollorganismen wird die Futterration für alle behandelten Organismen und Kontrollorganismen reduziert. Lässt sich die Pilzentwicklung nicht stoppen, muss der Versuch wiederholt werden.

Die toxikologische Relevanz der Exposition durch Aufnahme mit dem Futter ist im Allgemeinen höher bei Chemikalien mit hoher Affinität für organischen Kohlenstoff und bei Chemikalien mit kovalenter Bindung an das Sediment. Wenn Chemikalien mit diesen Eigenschaften getestet werden, kann die Menge an Futter, die zur Gewährleistung des Überlebens und einer natürlichen Wachstumsentwicklung der Larven benötigt wird, je nach den geltenden rechtlichen Vorschriften vor der Stabilisierungsphase zum formulierten Sediment hinzugegeben werden. Um eine Beeinträchtigung der Wasserqualität zu verhindern, wird das Fischfutter durch pflanzliches Material ersetzt, z. B. durch Zugabe von 0,5 % (Trockenmasse) feingeriebenen Blättern z. B. von Brennnessel (*Urtica dioeca*), Maulbeere (*Morus alba*), Weißklee (*Trifolium repens*) oder Spinat (*Spinacia oleracea*) oder von sonstigem pflanzlichen Material (*Cerophyl* oder Alphacellulose). Die Zugabe der gesamten Menge eines organischen Futters zum Sediment noch vor dem Dotieren ist für die Wasserqualität und die biologischen Parameter (21) nicht unerheblich und stellt auch keine standardisierte Methode dar. Neuere Studien lassen jedoch darauf schließen, dass diese Methode funktioniert (19)(26). Imagines im Zuchtkäfig brauchen normalerweise kein Futter; die Fekundität und die Fertilität verbessern sich jedoch, wenn ein in gesättigter Saccharoselösung getränktes Wattepad als Futterquelle für die adulten Mücken bereitgestellt wird (34).

Inkubationsbedingungen

32. Das Überstandswasser in den Prüfgefäßen wird 24 Stunden nach dem Einsetzen der L1-Larven beider Generationen über den gesamten Versuchszeitraum moderat belüftet. (Es ist darauf zu achten, dass die Konzentration an gelöstem Sauerstoff nicht unter 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes fällt.) Die Belüftung erfolgt mit einigen Blasen pro Sekunde durch eine gläserne Pasteur-Pipette, deren Öffnung 2-3 cm über der Sedimentschicht angesetzt wird. Wenn flüchtige Chemikalien getestet werden, ist darauf zu achten, dass das Sediment-Wasser-System nicht belüftet wird; trotzdem muss allerdings das Validitätskriterium eines Luftsauerstoff-Sättigungswerts von mindestens 60 % ASV (Nummer 10) erfüllt sein. Weitere Informationen sind Quelle (16) zu entnehmen.
33. Der Test mit *C. riparius* wird bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 ± 2 °C durchgeführt. Für *C. dilutus* und *C. yoshimatsui* wird eine Temperatur von 23 bzw. 25 ± 2 °C) empfohlen. Die Photoperiode beträgt 16 Std. und die Beleuchtungsstärke 500-1000 lux. Für die Zuchtkäfige kann jeweils morgens und abends eine einstündige Dämmerungsphase eingerichtet werden.

Expositionsdauer

34. Versuch mit dotiertem Wasser: Die Expositionsdauer für die 1. Generation beginnt, wenn die Prüfchemikalie in das Überstandswasser der Prüfgefäße dotiert wird (d. h. einen Tag nach Einsetzen der Larven; zu möglichen Änderungen des Expositionsprotokolls siehe Nummer 7). Die Exposition der 2. Generation beginnt sofort, da diese Larven in ein bereits dotiertes Sediment-Wasser-System eingesetzt werden. Bei *C. riparius* und *C. yoshimatsui* beträgt die maximale Expositionsdauer für die 1. Generation 27 Tage und für die 2. Generation 28 Tage. (Die Larven der 1. Generation verbringen einen Tag ohne Exposition in den Gefäßen). Aufgrund der Überschneidung ergibt sich eine Testdauer von insgesamt etwa 44 Tagen. Bei *C. dilutus* dauert die Exposition höchstens 64 bzw. 65 Tage (1. bzw. 2. Generation). Die Gesamtdauer beträgt etwa 100 Tage.

Versuch mit dotiertem Sediment: Die Exposition beginnt mit dem Einsetzen der Larven und dauert bei *C. riparius* und *C. yoshimatsui* bei beiden Generationen höchstens 28 Tage und bei *C. dilutus*, ebenfalls beide Generationen, höchstens 65 Tage.

Beobachtungen

Schlupfrate

35. Es werden die Entwicklungsdauer und die Anzahl der vollständig geschlüpften lebenden männlichen und weiblichen Mücken in beiden Generationen bestimmt. Männchen sind leicht an den gefiederten Antennen und an ihrem schlanken Körper zu erkennen.
36. Die Prüfgefäße sind bei beiden Generationen dreimal wöchentlich visuell auf Verhaltensänderungen der Larven (z. B. Verlassen des Sediments, ungewöhnliches Schwimmverhalten) gegenüber den Kontrollgefäßen zu prüfen. Während der Emergenzphase, die bei *C. riparius* und *C. yoshimatui* etwa 12 Tage und bei *C. dilutus* etwa 20 Tage nach dem Einsetzen der Larven beginnt, werden die Imagines gezählt

und mindestens einmal, vorzugsweise aber zweimal täglich (am frühen Morgen und am späten Nachmittag) nach Geschlechtern unterschieden. Nach der Unterscheidung werden die Mücken der 1. Generation sorgfältig aus den Gefäßen entnommen und in einen Zuchtkäfig gebracht. Mücken der 2. Generation werden entnommen und nach der Identifizierung getötet. In den Prüfgefäßen gelegte Eistränge der 1. Generation werden einzeln abgelesen und mit mindestens 2,5 ml. nativem Wasser in Mikrotiterplatten mit 12 Vertiefungen (oder sonstige geeignete Gefäße) gelegt; diese werden anschließend mit einem Deckel verschlossen, um wesentliche Verdunstungsverluste zu vermeiden. Die Anzahl der toten Larven und der sichtbaren Puppen, die nicht geschlüpft sind, wird ebenfalls protokolliert. Beispiele für Zuchtkäfige, Prüfgefäße und Absaugvorrichtungen werden in Anlage 5 beschrieben.

Reproduktionsleistung

37. Die Wirkung auf die Reproduktionsleistung wird anhand der Anzahl der von Mücken der 1. Generation gelegten Eistränge und der Fertilität dieser Eistränge beurteilt. Einmal täglich werden die Eistränge von der in den Zuchtbehältnissen befindlichen Kristallisierungsschale abgelesen. Die Eistränge werden entnommen und mit mindestens 2,5 ml nativem Wasser in eine Mikrotiterplatte mit 12 Vertiefungen (jeweils ein Eistrang pro Vertiefung) oder in sonstige geeignete Gefäße gesetzt; diese werden mit einem Deckel verschlossen, um wesentliche Verdunstungsverluste zu vermeiden. Für jeden Eistrang werden folgende Merkmale dokumentiert: Tag der Entstehung, Größe (normal, d. h. $1,0 \pm 0,3$ cm oder kurz; in der Regel $\leq 0,5$ cm) und Struktur (normal = bananenförmig mit spiraligem Eistrang oder anomal z. B. nicht mit spiraligem Eistrang) sowie Fertilität (befruchtet oder unbefruchtet). Im Laufe von sechs Tagen nach der Ablage wird geprüft, ob die Eistränge befruchtet sind. Ein Eistrang wird dann als befruchtet betrachtet, wenn aus mindestens einem Drittel aller Eier Mücken schlüpfen. Aufgrund der Gesamtzahl der in den Zuchtkäfig eingesetzten Weibchen werden die Anzahl der Eistränge pro Weibchen und die Anzahl der befruchteten Eistränge pro Weibchen berechnet. Erforderlichenfalls kann die Anzahl der Eier eines Eistrangs mit der Ringzählmethode zerstörungsfrei geschätzt werden (siehe Beschreibung in den Nummern 32 und 33).

Analysemessungen

Konzentration der Prüfchemikalie

38. Es wird unbedingt empfohlen, zu Beginn der Exposition (bei dotiertem Wasser vorzugsweise eine Stunde nach Applikation der Prüfchemikalie) und am Ende des Versuchs Proben des Überstandswassers, des Porenwassers und des Sediments zumindest in der Höchstkonzentration und einer niedrigeren Konzentration zu analysieren. Dies gilt für Gefäße mit beiden Generationen. Aus den Kristallisierungsschalen im Zuchtkäfig wird nur das Überstandswasser analysiert, da die Eistränge nur mit diesem Wasser in Berührung kommen. (Bei dem Versuch mit dotiertem Sediment kann eine analytische Bestätigung der Sedimentkonzentration vorgenommen werden.) Wenn erforderlich, können während des Versuchs weitere Messungen des Sediments, des Porenwassers oder des Überstandswassers vorgenommen werden. Diese Bestimmung der Konzentration der Prüfchemikalie gibt Aufschluss über das Verhalten/die Verteilung der Prüfchemikalie im Wasser-Sediment-System. Wenn zu Beginn und während des Versuchs (siehe Nummer 39) Proben aus dem Sediment und aus dem Porenwasser entnommen und analysiert

werden sollen, müssen zusätzliche Prüfgefäße verfügbar sein. Messungen des Sediments bei dem Versuchsaufbau mit dem dotierten Wasser sind möglicherweise nicht erforderlich, wenn die Verteilung der Prüfchemikalie auf das Wasser und das Sediment in einer Wasser-/Sediment-Untersuchung unter vergleichbaren Bedingungen eindeutig bestimmt wurde (z. B. Verhältnis Sediment/Wasser, Applikationsform, Gehalt des Sediments an organischem Kohlenstoff) oder wenn die gemessenen Konzentrationen im Überstandswasser ständig im Bereich von 80-120 % der nominellen Konzentration oder der gemessenen Ausgangskonzentration liegen.

39. Falls Zwischenmessungen (z. B. am 7. und/oder am 14. Tag) vorgenommen werden und für die Analyse größere Proben erforderlich sind, die nicht aus den Prüfgefäßen entnommen werden können, ohne das Testsystem zu beeinflussen, sollten die Analysemessungen an Proben aus zusätzlichen Prüfgefäßen vorgenommen werden, die derselben Behandlung (einschließlich Präsenz von Testorganismen) unterzogen, aber nicht für biologische Beobachtungen verwendet wurden.
40. Eine 30-minütige Zentrifugation bei z. B. 10 000 g und 4 °C wird empfohlen, um das Interstitialwasser (= Porenwasser) abzutrennen. Prüfchemikalien, die sich nachweislich nicht an Filtern anlagern, können aber auch filtriert werden. Bei zu kleinen Proben kann es passieren, dass sich die Konzentrationen im Porenwasser nicht analysieren lassen.

Physikalisch-chemische Parameter

41. pH-Wert, gelöster Sauerstoff im Testwasser und Temperatur des Wassers in den Prüfgefäßen und in den Kristallisierungsschalen sind auf geeignete Weise zu messen (siehe Nummer 10). Zu Beginn und am Ende des Versuchs sind Härte und Ammonium-Gehalt bei der höchsten Konzentration in den Kontrollgefäßen sowie in einem Prüfgefäß und einer Kristallisierungsschale zu bestimmen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

42. Mit diesem Lebenszyklustest sollen die Wirkung der Prüfchemikalie auf die Reproduktionsleistung sowie – für zwei Generationen – die Entwicklungsrate und die Gesamtzahl der vollständig geschlüpften lebenden männlichen und weiblichen Mücken ermittelt werden. Zur Ermittlung der Schlupfrate werden die Daten männlicher und weiblicher Imagines zusammengefasst. Wenn keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeiten der Entwicklungsraten der beiden Geschlechter bestehen, können die Ergebnisse für männliche und weibliche Mücken in der statistischen Analyse zusammengefasst werden.
43. Die Konzentrationen mit beobachteter Wirkung werden ausgedrückt als Konzentrationen im Überstandswasser (bei dotiertem Wasser) bzw. im Sediment (bei dotiertem Sediment) und gewöhnlich ausgehend von den zu Beginn der Exposition gemessenen Konzentrationen (siehe Nummer 38) berechnet. Daher werden die für dotiertes Wasser gewöhnlich zu Beginn der Exposition bei beiden Generationen im Überstandswasser der Gefäße gemessenen Konzentrationen und die Konzentrationen der Kristallisierungsschalen für jede Konzentrationsstufe gemittelt. Die

Konzentrationen für dotierte Sedimente werden gewöhnlich zu Beginn der Exposition bei beiden Generationen in den Gefäßen (sowie optional in den Kristallisierungsschalen) gemessen und für jede Behandlung gemittelt.

44. Für eine Punktschätzung (d. h. zur Ermittlung einer EC_x -Konzentration) können die für die einzelnen Gefäße und Zuchtkäfige erstellten Statistiken als echte Replikate dienen. Bei der Berechnung eines Konfidenzintervalls für einen beliebigen EC_x -Wert ist die Variabilität zwischen den Gefäßen zu berücksichtigen oder nachzuweisen, dass diese Variabilität so klein ist, dass sie übergangen werden kann. Wird das Modell nach der Methode der geringsten Abweichungsquadrate angepasst, sollten die pro Gefäß erstellten Statistiken transformiert werden, um die Varianzhomogenität zu verbessern. Allerdings werden die EC_x -Werte berechnet, nachdem die Ergebnisse auf den ursprünglichen Wert rücktransformiert wurden (11).
45. Wenn die statistische Analyse darauf abzielt, die NOEC anhand von Hypothesenprüfungen zu bestimmen, ist die Variabilität zwischen den Prüfgefäßen zu berücksichtigen, z. B. mit ANOVA-Methoden (etwa dem Williams- oder dem Dunnett-Test). Der Williams-Test ist dann geeignet, wenn theoretisch eine monotone Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erwarten wäre; der Dunnett-Test wird durchgeführt, wenn sich die Hypothese der Monotonie nicht bestätigt. Alternativ können in den Fällen, in denen von den herkömmlichen ANOVA-Annahmen abgewichen wird, robustere Tests (27) angewendet werden (31).

Schlupfrate

46. Schlupfraten sind quantale Daten und können anhand des Cochran-Armitage-Tests im Step-Down-Verfahren analysiert werden, wenn eine monotone Dosis-Antwort erwartet wird und die Schlupfdaten dieser Erwartung entsprechen. Andernfalls können ein Exakter Test nach Fisher oder ein Mantel-Haenszel-Test mit Bonferroni-Holm-angepassten p-Werten durchgeführt werden. Ist die Varianz zwischen den Replikaten mit derselben Konzentration nachweislich größer als bei einer Binomialverteilung zu erwarten (häufig als „extra-binomiale“ Variation bezeichnet), sollte ein robusterer Test (Cochran-Armitage-Test oder Exakter Test nach Fisher), wie in (27) vorgeschlagen, vorgenommen werden.

Die Summe geschlüpfter lebender männlicher und weiblicher Mücken (n_e) je Prüfgefäß wird bestimmt und durch die Anzahl der eingesetzten Larven (n_a) dividiert:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

Dabei sind:

- ER = Schlupfrate
 n_e = Anzahl der geschlüpften lebenden Mücken je Prüfgefäß
 n_a = Anzahl der eingesetzten Larven je Prüfgefäß (normalerweise 20)

Wenn n_e größer als n_a ist (d. h., wenn versehentlich mehr als die vorgesehene Anzahl an Larven eingesetzt wurde), muss n_a an n_e angepasst werden.

47. Ein alternativer Ansatz, der sich insbesondere für große Proben mit erweiterter

Binomialvarianz empfiehlt, ist die Behandlung der Schlupfrate als kontinuierliche Reaktion und die Verwendung entsprechender Verfahren. Als große Probe gilt hier eine Probe, bei der die Anzahl der geschlüpften Mücken und die Anzahl der nicht geschlüpften Mücken jeweils mehr als fünf pro Replikat(Gefäß) beträgt.

48. Für die Anwendung von ANOVA-Methoden sollten die ER -Werte zunächst einer Arcus-Sinus-Transformation oder einer Freeman-Tukey-Transformation unterzogen werden, um annähernd eine Normalverteilung und Varianzhomogenität zu erreichen. Bei der Verwendung von absoluten Frequenzen können auch der Cochran-Armitage-, der Exakte Test nach Fisher (mit Bonferroni-Korrektur) oder der Mantel-Haenszel-Test angewendet werden. Bei der Arcus-Sinus-Transformation wird die Umkehrfunktion des Sinus (\sin^{-1}) der Wurzel von ER berechnet.
49. Für die Schlupfraten werden die EC_x -Werte durch Regressionsanalysen bestimmt (z. B. Probit-, Logit- oder Weibull-Modell (28)). Versagt die Regressionsanalyse (z. B. bei weniger als zwei Teilantworten), können andere nicht-parametrische Methoden wie die Berechnung des gleitenden Durchschnitts oder eine einfache Interpolation angewendet werden.

Entwicklungsrate

50. Die mittlere Entwicklungszeit ist die mittlere Zeitspanne zwischen dem Einsetzen der Larven (Tag 0 des Tests) und dem Schlüpfen der Mückenkohorte. (Zur Berechnung der tatsächlichen Entwicklungszeit ist das Alter der Larven zum Zeitpunkt des Einsetzens zu berücksichtigen.) Die Entwicklungsrate ist der Reziprokwert der Entwicklungszeit (Einheit: 1/Tag) und bezeichnet den Anteil der täglich entstehenden Larven. Für die Bewertung der Sedimenttoxizität ist die Entwicklungsrate zu bevorzugen, da sie gegenüber der Entwicklungszeit eine geringere Varianz aufweist und ihre Werte homogener sind und näher an der Normalverteilung liegen. Aus diesem Grund eignen sich leistungsfähigere parametrische Verfahren mit großer Teststärke eher für die Entwicklungsrate als für die Entwicklungszeit. Wird die Entwicklungsrate als kontinuierliche Antwort behandelt, können die EC_x -Werte mittels Regressionsanalyse geschätzt werden (z. B. (29)(30)). Eine NOEC für die mittlere Entwicklungsrate kann mit einer ANOVA (z. B. mit einem Williams- oder einem Dunnett-Test) ermittelt werden. Da männliche Imagines früher schlüpfen als weibliche und da sich entsprechend für Männchen eine höhere Entwicklungsrate ergibt, ist es sinnvoll, die Entwicklungsraten nicht nur für die Imagines insgesamt, sondern auch getrennt nach Geschlechtern zu ermitteln.
51. Für statistische Tests gilt die Anzahl der am Kontrolltag x beobachteten Mücken als die Anzahl der Mücken, die in der Mitte des Zeitintervalls zwischen dem Tag x und dem Tag $x - 1$ geschlüpft sind (l = Länge des Kontrollintervalls, gewöhnlich 1 Tag). Die mittlere Entwicklungsrate je Prüfgefäß (\bar{x}) wird wie folgt berechnet:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

Dabei sind:

\bar{x} : mittlere Entwicklungsrate je Prüfgefäß

i : Index des Kontrollintervalls

- m: maximale Anzahl der Kontrollintervalle
 f_i : Anzahl der Mücken, die im Kontrollintervall i geschlüpft sind
 n_e : Gesamtzahl der geschlüpften Mücken bei Versuchsende ($= \sum f_i$)
 x_i : Entwicklungsrate der geschlüpften Mücken im Intervall i

$$x_i = \frac{1}{\text{Tag}_i - \frac{l_i}{2}}$$

Dabei sind:

- Tag_i: Tag der Inspektion (Tage seit Einsetzen der Larven)
 l_i: Länge des Kontrollintervalls i (Tage, in der Regel 1 Tag)

Geschlechterverhältnis

52. Die Geschlechterverhältnisse sind quantale Daten und daher durch einen Exakten Test nach Fisher oder durch sonstige geeignete Methoden zu bestimmen. Das natürliche Geschlechterverhältnis ist bei *C. riparius* gleich 1, d. h. männliche und weibliche Mücken sind gleich häufig. Bei beiden Generationen sind die Daten zum Geschlechterverhältnis gleich zu behandeln. Da die maximale Anzahl der Mücken pro Gefäß (d. h. 20) für eine aussagekräftige statistische Analyse zu gering ist, wird die Gesamtzahl der vollständig geschlüpften und lebenden Mücken für beide Geschlechter in allen Gefäßen mit jeweils einer Testkonzentration summiert. Diese nicht transformierten Daten werden dann in einer Häufigkeitstabelle (2 x 2) bezogen auf die (Lösungsmittel-)Kontrolle oder auf die gepoolten Daten der Kontrollen erneut geprüft.

Reproduktionsleistung

53. Die Reproduktionsleistung (gemessen an der Fekundität) wird an der Anzahl der Eistränge pro Weibchen gemessen. Die Gesamtzahl der in einem Zuchtkäfig gelegten Eistränge wird durch die Gesamtzahl der lebenden und unbeschädigten Weibchen geteilt, die in diesen Käfig eingesetzt wurden. Eine NOEC für die Fekundität kann mit einer ANOVA (z. B. mit einem Williams- oder einem Dunnett-Test) ermittelt werden.
54. Die Fertilität der Eistränge dient als Maßstab zur Ermittlung der Anzahl der befruchteten Eistränge pro Weibchen. Die Gesamtzahl der in einem Zuchtkäfig gelegten befruchteten Eistränge wird durch die Gesamtzahl der lebenden und unbeschädigten Weibchen geteilt, die in diesen Käfig eingesetzt wurden. Eine NOEC für die Fertilität kann mit einer ANOVA (z. B. mit einem Williams- oder einem Dunnett-Test) ermittelt werden.

Prüfbericht

55. Der Prüfbericht enthält die folgenden Informationen:

Prüfchemikalie:

- physikalischer Zustand und physikalisch-chemische Eigenschaften (Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Verteilungskoeffizient im Boden (oder – falls verfügbar – im Sediment), Stabilität im Wasser und im Sediment usw.);
- chemische Kenndaten (gebräuchliche Bezeichnung, chemische Bezeichnung, Strukturformel, CAS-Nummer usw.) einschließlich Reinheitsgrad und

Analyseverfahren zur Quantifizierung der Chemikalie.

Testspezies:

- Verwendete Testorganismen: Art, wissenschaftlicher Name, Bezugsquelle der Testorganismen und Zuchtbedingungen;
- Angaben zur Handhabung der Gelege und der Larven;
- Informationen zur Extraktion der Imagines der 1. Generation z. B. mit einer Absaugvorrichtung sind Anlage 5 zu entnehmen.
- Alter der Testorganismen beim Einsetzen in die Prüfgefäße (1. und 2. Generation).

Prüfbedingungen:

- verwendetes Sediment, d. h. natürliches oder formuliertes (künstliches) Sediment;
- natürliches Sediment: Standort und Beschreibung der Entnahmestelle möglichst einschließlich Informationen über frühere Verunreinigungen, Merkmale des Sediments: pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff, C/N-Verhältnis und gegebenenfalls Granulometrie;
- formuliertes Sediment: Herstellung, Bestandteile und Merkmale (Gehalt an organischem Kohlenstoff, pH-Wert, Feuchte usw. (Messwerte bei Beginn des Versuchs));
- Herstellung des Prüfwassers (falls rekonstituiertes Wasser verwendet wird) und Merkmale des Wassers (Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Härte usw. (bei Beginn des Tests gemessen));
- Tiefe des Sediments und des Überstandswassers in den Prüfgefäßen und in den Kristallisierungsschalen;
- Volumen des Überstandswassers und des Porenwassers; Gewicht des feuchten Sediments in den Prüfgefäßen und in den Kristallisierungsschalen mit und ohne Porenwasser;
- Prüfgefäße (Material und Größe);
- Kristallisierungsschalen (Material und Größe);
- Zuchtkäfige (Material und Größe);
- Methode für die Herstellung der Stammlösungen und Prüfkonzentrationen (Prüfgefäße und Kristallisierungsschalen);
- Applikation der Prüfchemikalie in die Prüfgefäße und in die Kristallisierungsschalen: Testkonzentrationen, Anzahl der Replikate und Lösungsmittel (wenn benötigt);
- Inkubationsbedingungen der Prüfgefäße; Temperatur, Photoperiode und Lichtintensität, Belüftung (Blasen pro Sekunde);
- Inkubationsbedingungen für die Zuchtkäfige und die Kristallisierungsschalen: Temperatur, Photoperiode und Lichtintensität;
- Inkubationsbedingungen für die Eistränge in den Mikrotiterplatten (oder in sonstigen Gefäßen); Temperatur, Photoperiode und Lichtintensität;
- genaue Angaben zur Fütterung, einschließlich Art des Futters, Präparation des Futters, Futtermenge und Fütterungssystem.

Ergebnisse:

- nominelle Prüfkonzentrationen, gemessene Prüfkonzentrationen und Ergebnisse sämtlicher Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfchemikalie in den Prüfgefäßen und in den Kristallisierungsschalen;
- Qualität des Wassers in den Prüfgefäßen und in den Kristallisierungsschalen, d. h. pH-Wert, Temperatur, Gehalt an gelöstem Kohlenstoff, Härte und Ammoniakgehalt;
- gegebenenfalls Ausgleich von Verdunstungsverlusten in den Prüfgefäßen;

- Anzahl der geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken pro Gefäß und pro Tag (1. und 2. Generation);
- Geschlechterverhältnis der vollständig geschlüpften und lebenden Mücken pro Testkonzentration (1. und 2. Generation);
- Anzahl der Larven pro Gefäß, die sich nicht zu Mücken entwickelt haben (1. und 2. Generation);
- Prozentanteil/Schlupfrate pro Replikat und Testkonzentration (männliche und weibliche Mücken gepoolt; 1. und 2. Generation);
- mittlere Entwicklungsrate von voll entwickelten und lebenden Mücken pro Replikat und Testkonzentration (männliche und weibliche Mücken getrennt und gepoolt; 1. und 2. Generation);
- Anzahl der in den Kristallisierungsschalen gelegten Eistränge pro Zuchtkäfig und Tag;
- Merkmale der einzelnen Eistränge (Größe, Form und Fertilität);
- Fekundität – Gesamtzahl der Eistränge pro Gesamtzahl der in den Zuchtkäfig eingesetzten Weibchen;
- Fertilität – Gesamtzahl der befruchteten Eistränge pro Gesamtzahl der in den Zuchtkäfig eingesetzten Weibchen;
- Schätzung der toxischen Endpunkte, z. B. EC_x (und dazugehörige Konfidenzintervalle) und NOEC unter Angabe der zu ihrer Bestimmung verwendeten statistischen Methoden;
- Diskussion der Ergebnisse einschließlich aller Auswirkungen auf das Testergebnis, die auf Abweichungen von dieser Prüfmethode zurückzuführen sind.

LITERATUR

- (1) Kapitel C.28 dieses Anhangs, „Chironomiden-Toxizitätstest in Sediment-Wasser-Systemen mit gespiktem Wasser“.
- (2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I., und M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). *Entomologica Scandinavica*, 30: 311–322.
- (3) Fleming, R., *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, WOSTA-Workshop in den Niederlanden.
- (5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, In: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, Dezember 1997.
- (7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, Second edition, EPA 600/R-99/064, März 2000, Änderung der ersten Fassung, Juni 1994.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.
- (10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J., und R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyaella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Kanada.
- (11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R., und C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyaella azteca* and *Chironomus tentans*

short-term and long-term sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25: 2662-2674.

- (12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V., und L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, *Ecotoxicology*, 16: 221-230.
- (13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*, *Jp. J. Sanit. Zool.*, 48: 345-350.
- (14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), *Jp. J. Sanit. Zool.*, 37: 47-57.
- (15) Kapitel C.27 dieses Anhangs, „Chironomiden-Toxizitätstest in Sediment-Wasser-Systemen mit gespiktem Sediment“.
- (16) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OECD, Paris.
- (17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M., und M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, *Integr. Environ. Assess. Management*.
- (18) Environment Canada. (1995), *Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant*, Report EPS 1/RM/30, September 1995.
- (19) Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T., und J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 353-361.
- (20) Suedel, B.C., und J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 1163-1175.
- (21) Naylor, C., und C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere*, 31: 3291-3303.
- (22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statis. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- (23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, 20: 482-491.

- (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: 510-531.
- (26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L., und H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. *J Soils Sediments*, 9: 94-102.
- (27) Rao, J.N.K., und A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics*, 48: 577-585.
- (28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, *Water Res.*, 18: 213-221.
- (29) Bruce, R.D., und D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1485-1494.
- (30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.*, 66: 298-312.
- (31) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment No. 54, 146 S., ENV/JM/MONO(2006)18, OECD, Paris.
- (32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L., und G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1165-1176.
- (33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M., und J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) – baseline experiments for future multi-generation studies, *J. Environ. Sci. Health Part A*, 42: 1-9.
- (34) OECD (2010), *Validation report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OECD, Paris.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Für diese Prüfmethode gelten folgende Definitionen:

Chemikalie: ein Stoff oder Gemisch.

Formuliertes Sediment oder rekonstituiertes, künstliches oder synthetisches Sediment: ein Gemisch aus Stoffen, mit denen die physikalischen Bestandteile eines natürlichen Sediments nachgeahmt werden sollen.

Überstandswasser: das im Prüfgefäß auf dem Sediment stehende Wasser.

Interstitialwasser oder Porenwasser: das Wasser in den Zwischenräumen zwischen Sedimentpartikeln bzw. zwischen Bodenpartikeln.

Dotiertes Wasser: Wasser, dem eine Prüfchemikalie hinzugefügt wurde.

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

Anlage 2

EMPFEHLUNGEN FÜR DIE ANZUCHT VON *CHIRONOMUS RIPARIUS*

1. Für die Anzucht von *Chironomus*-Larven können Kristallisierungsschalen oder größere Behälter verwendet werden. Auf dem Boden des Behälters wird eine 5-10 mm dicke Schicht feiner Quarzsand aufgetragen. Kieselgur (z. B. Merck, Art 8117) hat sich ebenfalls als Substrat bewährt (eine dünnere Schicht von nur wenigen Millimetern ist ausreichend). Anschließend wird mit geeignetem Wasser auf eine Höhe von mehreren Zentimetern aufgefüllt. Soweit erforderlich ist bei Verdunstungsverlusten Wasser nachzufüllen, um ein Austrocknen zu verhindern. Nötigenfalls kann das Wasser ausgetauscht werden. Das Wasser wird leicht belüftet. Die Larvenzuchtgefäße sind in geeignete Käfige zu setzen, um zu verhindern, dass die schlüpfenden Imagines entweichen. Der Käfig muss groß genug sein (Mindestgröße ca. 30 x 30 x 30 cm), damit die geschlüpften Imagines schwärmen können. Ansonsten kommt es nicht zur Paarung.

2. Die Käfige sind bei Raumtemperatur oder in einer Klimakammer bei 20 ± 2 °C und einer Licht-/Dunkelphase von 16:8 Std. (Lichtintensität ca. 1000 lx) zu halten. Es wurde berichtet, dass eine relative Luftfeuchte von weniger als 60 % eine Vermehrung unterbinden kann.

Verdünnungswasser

3. Es kann jedes natürliche oder synthetische Wasser verwendet werden. Im Allgemeinen werden Brunnenwasser, entchlortes Leitungswasser und künstliches Medium (z. B. Elendt-Medium „M4“ oder „M7“, siehe unten) verwendet. Das Wasser muss vor Verwendung belüftet werden. Soweit erforderlich kann das Anzuchtwasser durch vorsichtiges Abgießen oder Absaugen des gebrauchten Wassers aus den Prüfgefäßen erneuert werden; dabei ist darauf zu achten, dass die Wohnröhren der Larven nicht zerstört werden.

Fütterung der Larven

4. *Chironomus*-Larven sind mit etwa 250 mg frischem Fischfutter (Flocken, Tetra Min[®], Tetra Phyll[®] oder Fischfutter einer vergleichbaren Marke) pro Gefäß und Tag zu füttern. Das Futter kann als trocken gemahlene Pulver oder suspendiert in Wasser angeboten werden (1,0 g Futterflocken mit 20 ml Verdünnungswasser zu einer homogenen Masse gemischt). Diese Zubereitung kann in 5-ml-Portionen pro Gefäß und Tag verfüttert werden (vor Gebrauch schütteln). Ältere Larven können etwas mehr Futter erhalten.

5. Das Futter ist an die Wasserqualität anzupassen. Bei Trübung des Kulturmediums ist die Futterration zu reduzieren. Die Futterzugaben sind sorgfältig zu notieren. Zu wenig Futter kann dazu führen, dass die Larven in die Wassersäule abwandern, während zu viel Futter die mikrobielle Aktivität verstärkt und die Sauerstoffkonzentrationen verringert. In beiden Fällen kann sich das Wachstum der Organismen verlangsamen.

6. Wenn neue Kulturgefäße angesetzt werden, können auch einige Grünalgenzellen

(z. B. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) hinzugefügt werden.

Fütterung der geschlüpften Imagines

7. Einige Experimentatoren empfehlen, als Futter für die geschlüpften Imagines ein mit gesättigter Zuckerlösung getränktes Wattepad zu verwenden.

Emergenz

8. Nach ca. 13 bis 15 Tagen bei einer Temperatur von 20 ± 2 °C beginnen die Imagines in den Larvenzuchtgefäßen zu schlüpfen. Männchen sind leicht an den gefiederten Antennen und dem schlanken Körper zu erkennen.

Eiergelege

9. Sobald sich Imagines in den Zuchtkäfigen befinden, sind alle Larvenzuchtgefäße dreimal wöchentlich auf gallertartige Eiergelege zu kontrollieren. Vorhandene Gelege sind vorsichtig zu entnehmen und in eine kleine Schale mit einer Probe des Zuchtwassers zu geben. Mit den Eiergelegen werden neue Kulturen angesetzt (z. B. 2-4 Eiergelege pro Gefäß) oder Toxizitätstests durchgeführt.

10. Nach 2-3 Tagen sollten L1-Larven schlüpfen.

Ansetzen neuer Kulturen

11. Sobald die Zucht etabliert ist, müssten je nach Prüfungsanforderungen wöchentlich oder weniger häufig frische Kulturen angesetzt und die älteren Prüfgefäße nach dem Schlüpfen der Imagines entfernt werden können. So sind bei geringem Aufwand ständig neue Imagines verfügbar.

Zubereitung der Prüflösungen M4 und M7

12. Das Medium M4 wurde von Elendt (1990) beschrieben. Das Medium M7 wird wie das Medium M4 zubereitet, mit Ausnahme der in Tabelle 1 angegebenen Stoffe, deren Konzentration bei M7 viermal niedriger ist als bei M4. Die Prüflösungen werden nicht nach den Anweisungen von Elendt und Bias (1990) zubereitet, da die für die Zubereitung der Stammlösungen angegebenen Konzentrationen von NaSiO_3 , $5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 und K_2HPO_4 für diesen Test nicht geeignet sind.

Herstellung des M7-Mediums

13. Zunächst wird jede Stammlösung (I) einzeln zubereitet; diese Stammlösungen (I) werden anschließend zu einer kombinierten Stammlösung (II) zusammengewaschen (siehe Tabelle 1). 50 ml der kombinierten Stammlösung (II) und die in Tabelle 2 angegebenen jeweiligen Mengen der Makronährstoff-Stammlösung werden zur Herstellung des M7-Mediums mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Durch Zugabe von drei Vitaminen gemäß Tabelle 3 zu entionisiertem Wasser wird eine kombinierte Vitamin-Stammlösung hergestellt, von der 0,1 ml vor der Verwendung dem fertigen M7-Medium zugesetzt werden. Die Vitaminstammlösung wird in kleinen Portionen tiefgefroren aufbewahrt. Das Medium wird belüftet und stabilisiert.

Tabelle 1: Stammlösungen der Spurenelemente für das M4- und das M7-Medium

Stammlösungen (I)	Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird	Herstellung der kombinierten Stammlösung (II): Folgende Mengen (ml) der Stammlösungen (I) werden gemischt und mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.		Endkonzentrationen der Prüflösungen (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H ₃ BO ₃ ⁽¹⁾	57190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl ₂ · 4H ₂ O ⁽¹⁾	7210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl ⁽¹⁾	6120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl ⁽¹⁾	1420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl ₂ · 6H ₂ O ⁽¹⁾	3040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O ⁽¹⁾	1260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl ₂ · 2H ₂ O ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O ⁽¹⁾⁽²⁾	5000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7H ₂ O ⁽¹⁾⁽²⁾	1991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Diese Stoffe sind in M4 und M7 unterschiedlich dosiert (siehe oben).

(2) Diese Lösungen werden einzeln hergestellt, zusammengewaschen und sofort autoklaviert.

Tabelle 2: Makronährstoff-Stammlösung für das M4- und das M7-Medium

	Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird (mg)	Zur Herstellung des M4- und des M7-Mediums zugesetzte Menge an Makronährstoff-Stammlösungen (ml/l)	Endkonzentrationen der Prüflösungen M4 und M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1430	0,1	0,143

K_2HPO_4	1840	0,1	0,184
------------	------	-----	-------

Tabelle 3: Vitamin-Stammlösung für das M4- und das M7-Medium

Aus den drei Vitaminlösungen wird eine einzige Vitamin-Stammlösung hergestellt.

	Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird (mg)	Zur Herstellung des M4- und des M7-Mediums zugesezte Menge an Vitamin-Stammlösung (ml/l)	Endkonzentrationen der Prüflösungen M4 und M7 (mg/l)
Thiaminhydrochlorid	750	0,1	0,075
Cyanocobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

LITERATUR

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, Hrsg. M. Streloke und H. Köpp. Berlin.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, *Protoplasma*, 154: 25-33.

Elendt, B.P., und W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna*, *Water Research*, 24: 1157-1167.

Anlage 3

ZUBEREITUNG DES FORMULIERTEN SEDIMENTS

Zusammensetzung des Sediments

Das formulierte Sediment setzt sich wie folgt zusammen:

Bestandteil	Beschreibung	% der Trockenmasse des Sediments
Torf	Sphagnum-Torf, pH-Wert möglichst 5,5-6,0, ohne sichtbare Pflanzenreste, fein gemahlen (Partikelgröße ≤ 1 mm) und luftgetrocknet	4-5
Quarzsand	Partikelgröße: > 50 % der Partikel 50-200 μm	75-76
Kaolin-Ton	Kaolinitgehalt ≥ 30 %	20
Organischer Kohlenstoff	Eingestellt durch Zugabe von Torf und Sand	2 ($\pm 0,5$)
Calciumcarbonat	CaCO_3 , pulverisiert, chemisch rein	0,05-0,1
Wasser	Leitfähigkeit ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	30-50

Zubereitung

Der Torf wird luftgetrocknet und zu feinem Pulver zermahlen. Mit entionisiertem Wasser wird in einer leistungsstarken Homogenisierereinrichtung eine Suspension der erforderlichen Menge an Torfpulver hergestellt. Der pH-Wert dieser Suspension wird mit CaCO_3 auf $5,5 \pm 0,5$ eingestellt. Diese Suspension wird bei 20 ± 2 °C für mindestens zwei Tage unter sanftem Rühren konditioniert, um den pH-Wert zu stabilisieren und eine Etablierung der mikrobiellen Fauna zu ermöglichen. Der pH-Wert wird erneut bestimmt und muss bei $6,0 \pm 0,5$ liegen. Nun werden die übrigen Komponenten (Sand und Kaolin-Ton) sowie entionisiertes Wasser zur Torf-Wasser-Suspension hinzugegeben und zu einem homogenen Sediment vermischt, dessen Wassergehalt 30-50 % der Trockenmasse des Sediments betragen sollte. Der pH-Wert der fertigen Mischung wird erneut gemessen und erforderlichenfalls mit CaCO_3 auf 6,5-7,5 eingestellt. Anhand von Sedimentproben werden die Trockenmasse und der Gehalt an organischem Kohlenstoff bestimmt. Es wird empfohlen, das formulierte Sediment vor der Verwendung in einem Chironomiden-Toxizitätstest sieben Tage unter denselben Bedingungen wie sie im anschließenden Test vorherrschen, zu konditionieren.

Lagerung

Die trockenen Bestandteile für die Zubereitung des künstlichen Sediments können an einem trockenen und kühlen Ort bei Raumtemperatur gelagert werden. Das formulierte (feuchte) Sediment darf vor seiner Verwendung im Prüfversuch nicht gelagert werden. Es ist unmittelbar nach Ablauf der siebentägigen Konditionierung, mit der die Zubereitung abschließt, zu verwenden.

Literatur

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline No. 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R., und B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (*Oligochaeta*) in artificial media, *Ecotox. Environ. Safety*, 39: 10-20.

Anlage 4

CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS

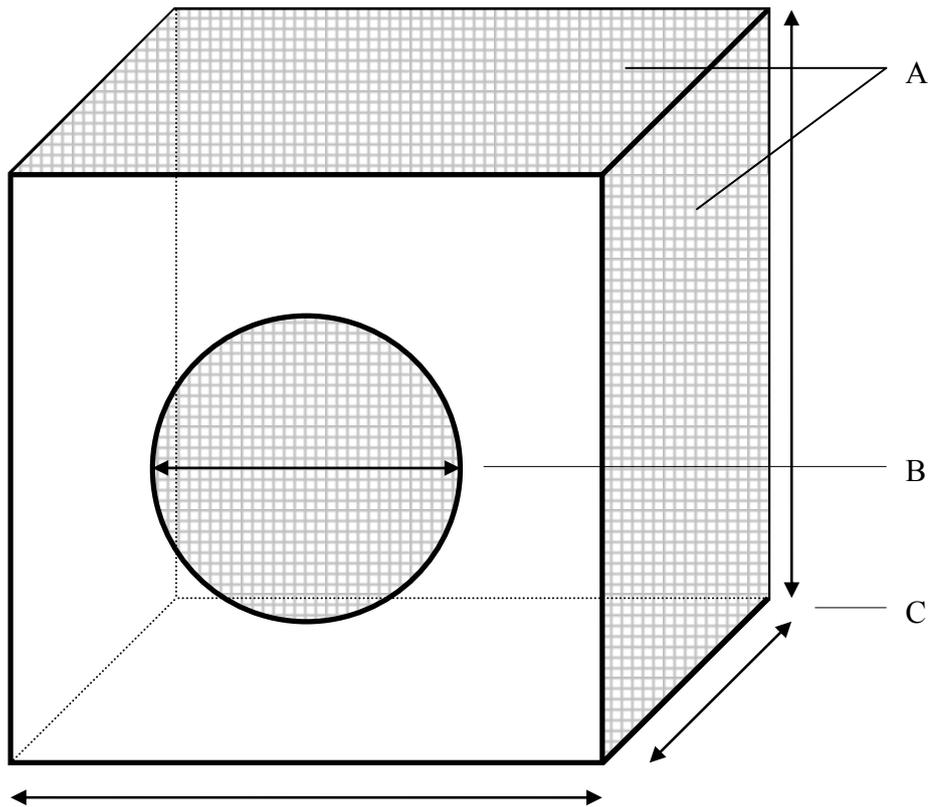
BESTANDTEILE	KONZENTRATIONEN
Partikel	< 20 mg/l
Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffen	< 2 mg/l
Nicht ionisiertes Ammonium	< 1 µg/l
Härte in CaCO ₃	< 400 mg/l*
Restchlor	< 10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	<50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden und polychlorierten Biphenylen	<50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	< 25 ng/l

* Wird jedoch ein Ionenaustausch zwischen den Härteionen und der Prüfchemikalie vermutet, ist Wasser geringerer Härte zu verwenden. (In diesem Fall ist das Elendt-Medium M4 zu vermeiden.)

Anlage 5

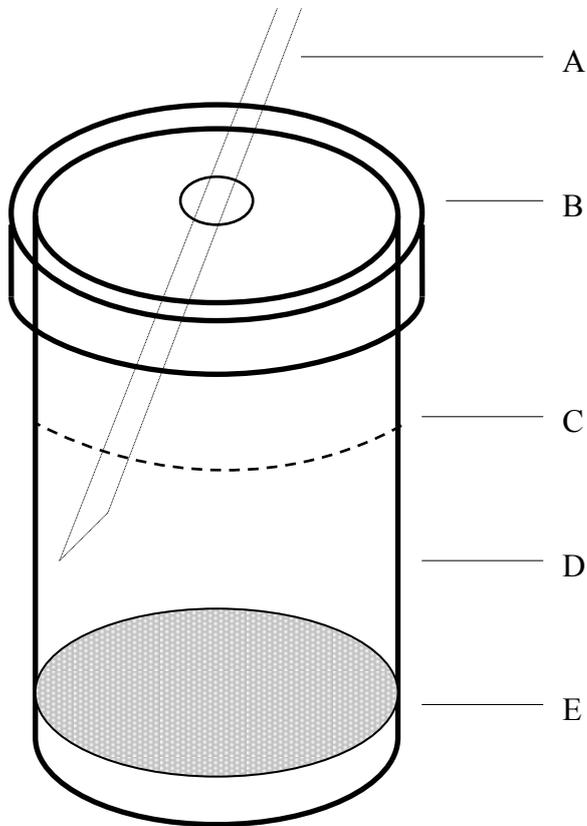
LEITLINIEN ZUR DURCHFÜHRUNG DES TESTS

Zuchtkäfig (Beispiel):



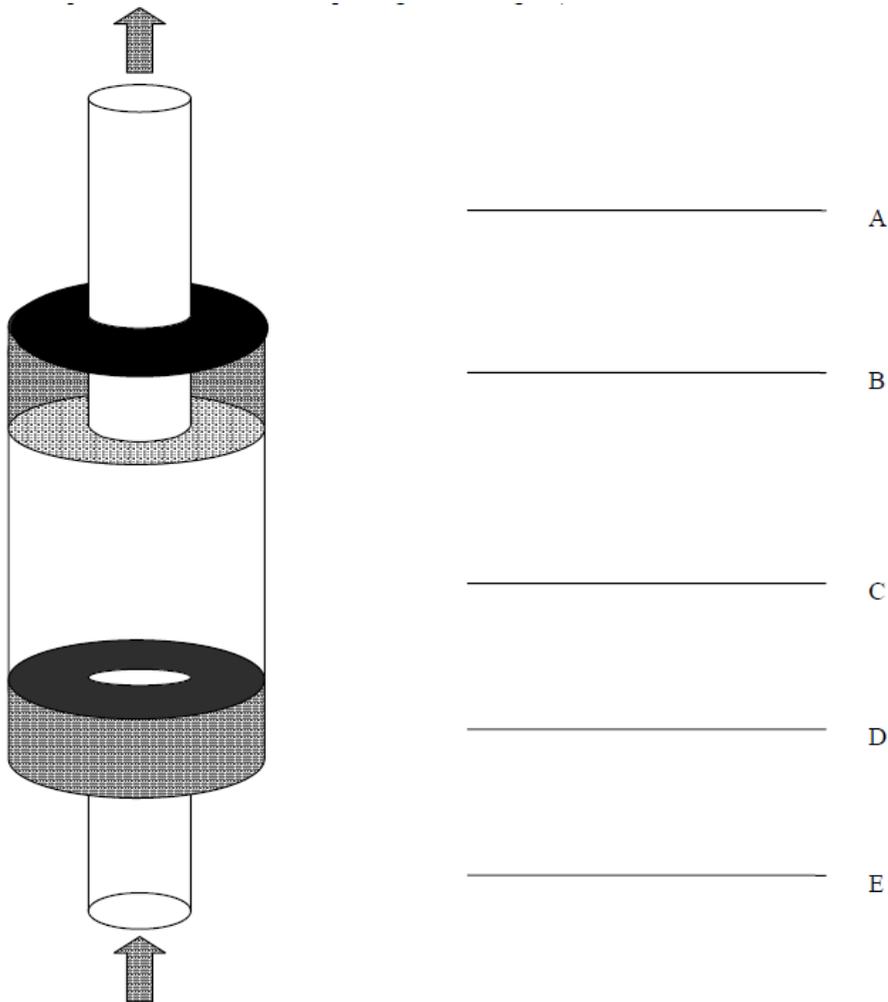
- A: Gaze-Abdeckung oben und mindestens auf einer Seite (Maschenweite ca. 1 mm)
- B: Öffnung zum Einsetzen der Imagines in den Zuchtkäfig und zur Entnahme der gelegten Eistränge aus den Kristallisierungsschalen (in dieser Abbildung nicht dargestellt)
- C: Mindestabmessungen der Zuchtkäfige (L x H x B): 30 cm x 30 cm x 30 cm

Prüfgefäß (Beispiel):



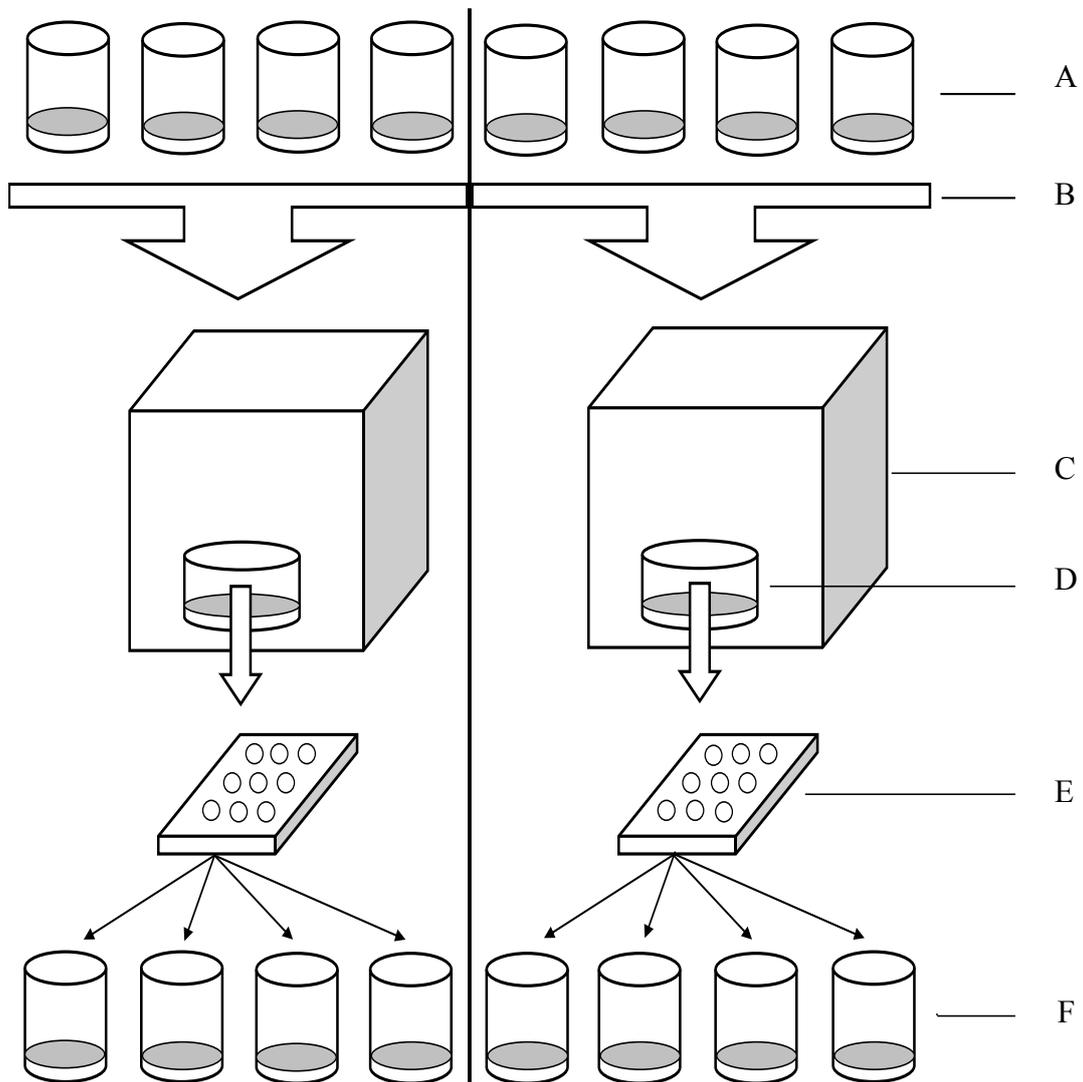
- A: Pasteur-Pipette zur Belüftung des Überstandswassers
- B: Glasdeckel, damit die Imagines das Gefäß nicht verlassen
- C: Überstandswasser
- D: Prüfgefäß (Becherglas mit einem Fassungsvermögen von mindestens 600 ml)
- E: Sedimentschicht

Absaugvorrichtung zur Extraktion von Imagines (Luftdurchfluss in Pfeilrichtung):



- A: Glasrohr (Innendurchmesser ca. 5 mm), mit einer selbstansaugenden Pumpe verbunden
- B: Korke aus vulkanisiertem Kautschuk, durch den das Glasrohr (A) geführt wird; innen ist die Öffnung des Glasrohrs (A) mit etwas Watte und einer Gaze (Maschenweite ca. 1 mm²) verschlossen, damit die in die Vorrichtung eingesaugten Mücken nicht beschädigt werden.
- C: transparentes Behältnis (Kunststoff oder Glas, Länge ca. 15 cm) für die extrahierten Mücken
- D: Korke aus vulkanisiertem Kautschuk, durch den ein Rohr (E) geführt wird; um die Mücken in den Zuchtkäfig zu entlassen, wird der Korke (D) aus dem Behältnis (C) gezogen.
- E: Rohr (Kunststoff oder Glas, Innendurchmesser ca. 8 mm) zur Aufnahme der Imagines aus dem Gefäß

Schematische Darstellung eines Lebenszyklustests:



- A: 1. Generation – Prüfgefäße mit einem Sediment-Wasser-System, acht Replikate, 20 L1-Larven pro Gefäß
- B: vier Prüfgefäße pro Zuchtkäfig, A und B
- C: Zuchtkäfige (A und B) zur Förderung der Schwarmbildung, der Paarung und der Eiablage
- D: Kristallisierungsschalen zur Ablage der Eistränge
- E: Mikrotiterplatten, für jeden Eistrang jeweils eine Vertiefung
- F: 2. Generation – Prüfgefäße mit einem Sediment-Wasser-System, acht Replikate, 20 L1-Larven pro Gefäß

C.41. Fish Sexual Development Test

(Test zur Geschlechtsentwicklung bei Fischen)

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 234 (2011). Sie beruht auf dem 1998 gefassten Beschluss, neue Prüfmethode zur Untersuchung und zum Testen von Stoffen mit potenziell endokriner Wirkung zu entwickeln bzw. bestehende Methoden zu aktualisieren. Der Test zur Geschlechtsentwicklung bei Fischen – *Fish Sexual Development Test* (FSDT) – wurde als viel versprechende Methode zur Berücksichtigung eines empfindlichen Stadiums im Lebenszyklus von Fischen bewertet, die gleichermaßen auf östrogen und auf androgen wirkende Chemikalien anspricht. Die Prüfmethode wurde in den Jahren 2006 bis 2010 einem Ringtest unterzogen, in dem Japanische Reiskarpfinge (*Oryzias latipes*), Zebraabärblinge (*Danio rerio*) und Dreistachlige Stichlinge (*Gasterosteus aculeatus*) vollständig und Dickkopflritzen (*Pimephales promelas*) teilweise validiert wurden (41)(42)(43). Das hier beschriebene Protokoll umfasst Japanische Reiskarpfinge (Medakas), Dreistachlige Stichlinge und Zebraabärblinge. Das Protokoll ist im Prinzip eine Verbesserung der OECD-Prüfrichtlinie 210, Fish, Early Life Stage Toxicity Test (FELS-Test) (1); die Exposition wird fortgesetzt, bis die sexuelle Differenzierung erfolgt ist, d. h. bei Japanischen Reiskarpfingen, bei Dreistachligen Stichlingen und bei Zebraabärblingen etwa 60 Tage nach dem Schlüpfen (wobei die Expositionsdauer bei anderen künftig zu validierenden Arten noch länger oder kürzer sein kann); außerdem werden endokrinsensitive Endpunkte einbezogen. Im FSDT werden Wirkungen in frühen Lebensstadien und potenzielle nachteilige Folgen mutmaßlich endokrin wirkender Chemikalien (z. B. Östrogene, Androgene und Steroidogenese-Inhibitoren) auf die Geschlechtsentwicklung beurteilt. Aufgrund der Kombination der beiden wesentlichen endokrin relevanten Endpunkte (der VTG-Konzentration und des phänotypischen Geschlechterverhältnisses) kann die Wirkungsweise der Prüfchemikalie ermittelt werden. Wegen der populationsrelevanten Änderung des phänotypischen Geschlechterverhältnisses kann der FSDT zur Gefahren- und Risikobewertung verwendet werden. Wenn der Test allerdings zur Gefahren- oder Risikobewertung durchgeführt wird, dürfen keine Stichlinge verwendet werden, weil die bislang verfügbaren Validierungsdaten gezeigt haben, dass bei dieser Art ohnehin nur selten durch die Prüfchemikalien induzierte Änderungen des phänotypischen Geschlechterverhältnisses auftreten.
2. Gemäß dem Prüfprotokoll werden die Fische in der für die Geschlechtsentwicklung labilen Phase, in der die Fische wahrscheinlich am empfindlichsten auf Chemikalien mit endokriner Wirkung reagieren, über das Wasser Chemikalien ausgesetzt, die Einfluss auf ihre Geschlechtsentwicklung haben. Zwei wichtige Endpunkte werden als Indikatoren für mit endokrinen Wirkungen verbundene Entwicklungsstörungen bewertet: die VTG-Konzentrationen und die Geschlechterverhältnisse; die betreffenden Daten werden durch histologische Gonadenuntersuchungen ermittelt. Histopathologische Gonadenuntersuchungen (Bewertung und Bestimmung des Entwicklungsstadiums von Oozyten und von Spermatogenezellen) können durchgeführt werden. Außerdem wird möglichst eine Bestimmung des genetischen Geschlechts vorgenommen (z. B. bei Japanischen Reiskarpfingen und bei

Dreistachligen Stichlingen). Die Tatsache, dass ein Marker für die Bestimmung des genetischen Geschlechts verfügbar ist, stellt insoweit einen erheblichen Vorteil dar, als sie die Aussagekraft der Statistiken zum Geschlechterverhältnis erhöht und die Erkennung einer phänotypischen Geschlechtsumkehr bei einzelnen Exemplaren ermöglicht. Weitere ebenfalls zu messende apikale Endpunkte sind die Schlupfrate, die Überlebensrate, die Länge und das Körpergewicht. Die Prüfmethode könnte an andere Arten als die oben genannten angepasst werden, wenn diese Arten einer Validierung entsprechend der Validierung für den Japanischen Reiskärpfling, den Dreistachligen Stichling und den Zebraärblichling unterzogen werden, wenn die Kontrollfische am Ende des Tests sexuell differenziert sind, wenn die VTG-Werte hinreichend hoch sind, um signifikante auf die betreffende Chemikalie zurückzuführende Variationen zu erkennen und wenn die Empfindlichkeit des Prüfsystems mit Referenzchemikalien mit endokriner Wirkung ((Anti-)Östrogene, (Anti-)Androgene, Aromatasehemmer usw.) nachgewiesen wurde. Außerdem müssen sämtliche Validierungsberichte, die auf FSDT-Daten anderer Arten Bezug nehmen, von der OECD geprüft worden sein. Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, ist das Ergebnis der Validierung als zufriedenstellend zu betrachten.

Ausgangserwägungen und Einschränkungen

3. Vitellogenin (VTG) wird gewöhnlich in der Leber weiblicher oviparer Vertebraten infolge des im Blutkreislauf zirkulierenden endogenen Östrogens produziert (2). VTG ist eine Vorstufe verschiedener Eidotter-Proteine und bewegt sich, einmal in der Leber produziert, durch die Blutbahn bis zum Eierstock, wo es aufgenommen und unter Entwicklung von Eiern modifiziert wird. Die VTG-Synthese erfolgt bei unreifen Fischen und bei adulten Männchen, in deren Blutkreislauf sich nicht genügend Östrogen befindet, zwar in sehr beschränktem Umfang, ist aber nachweisbar. Die Leber kann VTG aber auch aufgrund einer exogenen Östrogenstimulation synthetisieren und sekretieren (3)(4)(5).
4. Die Messung der VTG-Konzentration ermöglicht den Nachweis von Chemikalien mit östrogenen, anti-östrogenen und androgenen Wirkung und die Erkennung von Chemikalien, die die Steroidogenese beeinträchtigen (beispielsweise Aromatasehemmer). Der Nachweis östrogenen Chemikalien kann über die VTG-Induktion bei männlichen Fischen erfolgen und wurde in wissenschaftlichen Veröffentlichungen mit Peer Reviews umfassend dokumentiert. Außerdem wurde eine VTG-Induktion infolge der Exposition gegenüber aromatisierbaren Androgenen nachgewiesen (6)(7). Eine Reduktion des im Blutkreislauf weiblicher Tiere zirkulierenden Östrogens beispielsweise durch Hemmung der Aromatase, die endogene Androgene in natürliches öströgenes 17 β -Östradiol umwandelt, bewirkt eine Verringerung der VTG-Konzentration. Anhand dieser Reduzierung der VTG-Konzentration können Chemikalien mit Aromatase hemmender Wirkung oder Steroidogenese-Inhibitoren allgemeiner nachgewiesen werden (33). Die biologische Relevanz der VTG-Reaktion aufgrund einer Östrogen-/Aromatasehemmung wurde nachgewiesen und umfassend dokumentiert (8)(9). Allerdings kann die VTG-Produktion bei weiblichen Tieren auch durch eine allgemeine Toxizität und durch toxische Wirkungsweisen unabhängig vom endokrinen System beeinträchtigt werden.
5. Mehrere Messverfahren wurden entwickelt und für die regelmäßige Verwendung standardisiert, um die VTG-Konzentration im Blut, in der Leber, im gesamten Körper oder in Homogenatproben aus dem Kopf-/Schwanzgewebe einzelner Exemplare zu

quantifizieren. Dies gilt für Zebrabärblinge, Dreistachlige Stichlinge und Japanische Reiskärpflinge, aber auch für die nur teilweise validierte Dickkopfelritze. Zur Bestimmung der VTG-Konzentration können auch artspezifische, auf Immunchemie gestützte ELISA-Verfahren (ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) verwendet werden (5)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16). Bei Japanischen Reiskärpflingen und bei Zebrabärblingen besteht eine ausgeprägte Korrelation zwischen der im Blutplasma, in der Leber und in Homogenatproben gemessenen VTG-Konzentration, wenngleich Homogenate allerdings eher leicht niedrigere Werte als Plasmabestimmungen (17)(18)(19) ergeben. In Anlage 5 werden empfohlene Verfahren zur Probenahme für VTG-Analysen beschrieben.

6. Die Änderung des phänotypischen Geschlechterverhältnisses ist ein Endpunkt für eine Geschlechtsumkehr. Grundsätzlich können Östrogene, Antiöstrogene, Androgene, Antiandrogene und die Steroidogenese hemmende Chemikalien das Geschlechterverhältnis bei in der Entwicklung befindlichen Fischen beeinträchtigen (20). Es wurde nachgewiesen, dass diese Geschlechtsumkehr nach der Exposition gegenüber einer östrogenen Chemikalie bei Zebrabärblingen teilweise reversibel ist (21); eine Geschlechtsumkehr infolge der Exposition gegenüber einer androgenen Chemikalie ist hingegen irreversibel (30). Die Geschlechter werden erfasst als weiblich, männlich, intersexuell (in einer Gonade sowohl Oozyten als auch Spermatogenesenzellen) oder nicht differenziert jeweils bezogen auf ein einzelnes Exemplar und ermittelt durch histologische Untersuchung der Gonaden. Nähere Informationen sind Anlage 7 sowie dem *OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads* (22) zu entnehmen.
7. Das genetische Geschlecht wird mit genetischen Markern untersucht – soweit diese bei der jeweiligen Fischart vorkommen. Bei Japanischen Reiskärpflingen sind die beiden X-Chromosome (bei weiblichen Tieren) bzw. das X- und das Y-Chromosom (bei männlichen Tieren) durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachweisbar, oder das männliche Determinationsgen DMY kann wie in den Quellen (23) und (24) beschrieben analysiert werden (DMY negativ oder positiv). Beim Dreistachligen Stichling kann das genetische Geschlecht durch ein entsprechendes PCR-Verfahren bestimmt werden (siehe Anlage 10). Wenn das genetische Geschlecht individuell dem phänotypischen Geschlecht zugeordnet werden kann, hat der Test eine höhere Aussagekraft; entsprechend sollte bei Arten mit dokumentierten Markern für das genetische Geschlecht auch eine Bestimmung des genetischen Geschlechts vorgenommen werden.
8. Die endokrine Wirkungsweise einer Chemikalie lässt sich durch eine Kombination der beiden wesentlichen endokrin relevanten Endpunkte (die VTG-Konzentration und das Geschlechterverhältnis) nachweisen (Tabelle 1). Das Geschlechterverhältnis ist ein populationsbezogener Biomarker (25)(26), und bei einigen gut definierten Wirkungsweisen können die Ergebnisse eines *Fish Sexual Development Test* (FSDT) für die Gefahren- und Risikobewertung verwendet werden, wenn die zuständige Behörde diesen Ansatz als geeignet betrachtet. Diese Wirkungsweisen sind bei Östrogenen, Androgenen und bei Steroidogenesehemmern gegeben.

Tabelle 1: Reaktion der endokrin relevanten Endpunkte auf unterschiedliche Wirkungsweisen von Chemikalien: ↑ = **zunehmend**, ↓ = **abnehmend**, - = **nicht untersucht**

Wirkungsmechanismus	VTG ♂	VTG ♀	Geschlechterverhältnis	Quellen
Schwacher Östrogenagonist	↑	↑	↑ ♀ oder ↑ nicht diff.	(27) (40)
Starker Östrogenagonist	↑	↑	↑ ♀ oder ↑ nicht diff., kein ♂	(28) (40)
Östrogenantagonist	-	-	↓ ♀, ↑ nicht diff.	(29)
Androgenagonist	↓ oder -	↓ oder -	↑ ♂, kein ♀	(28) (30)
Androgenantagonist	-	-	↑ ♀ ↑ intersex.	(31)
Aromatasehemmer	↓	↓	↓ ♀	(33)

9. Im FSĐT wird die Reproduktionsphase im Lebenszyklus der Fische nicht berücksichtigt; daher sind Chemikalien, bei denen der Verdacht besteht, dass sie bereits in geringeren Konzentrationen als bei der Geschlechtsentwicklung die Reproduktionsfähigkeit beeinträchtigen, einem Reproduktionstest zu unterziehen.
10. Begriffsbestimmungen im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode sind Anlage 1 zu entnehmen.
11. Mit dem In-vivo-FSĐT sollen Chemikalien mit androgenen und östrogenen Eigenschaften sowie Antiandrogene, Antiöstrogene und die Steroidogenese hemmende Chemikalien nachgewiesen werden. Beim FSĐT wurden in den Validierungsphasen (1 und 2) östrogene, androgene und die Steroidogenese hemmende Chemikalien berücksichtigt. Die Wirkung von Östrogen- und Androgenantagonisten im FSĐT wird in Tabelle 1 dargestellt; die entsprechenden Wirkungsmechanismen sind aber gegenwärtig noch nicht umfassend dokumentiert.

PRINZIP DER PRÜFUNG

12. Im Test werden Fische aus frisch befruchteten Eiern bis zum Abschluss der Geschlechtsdifferenzierung mindestens drei Konzentrationen der in Wasser gelösten Prüfchemikalie ausgesetzt. Wenn die Verfügbarkeit bzw. die Beschaffenheit (z. B. eine begrenzte Löslichkeit) der Prüfchemikalie dies zulassen, wird der Test in einem Durchflusssystem vorgenommen. Der Test beginnt mit dem Einsetzen frisch befruchteter Eier (vor der Blastulascheiben-Spaltung) in die Versuchsbecken. Wie das Einsetzen in die Versuchsbecken erfolgt, wird in Nummer 27 für die verschiedenen Arten beschrieben. Bei den validierten Fischarten (Japanischer Reiskarpfing, Dreistachliger Stichling und Zebraabärbling) wird der Test 60 Tage nach dem Schlüpfen beendet. Am Ende des Tests werden alle Fische getötet. Für die VTG-Analyse wird von jedem Fisch eine Probe von biologischem Material (Blutplasma oder Leber oder

Kopf-/Schwanz-Homogenat) entnommen; der verbleibende Teil der Fische wird zur histologischen Gonadenuntersuchung zur Bestimmung des phänotypischen Geschlechts fixiert. Optional kann eine histopathologische Untersuchung vorgenommen werden (z. B. Entwicklungsstadium der Gonaden oder Grad der Intersexualität). Bei Arten mit geeigneten Markern (siehe Anlagen 9 und 10) wird zur Bestimmung des genetischen Geschlechts eine Probe von biologischem Material (Schwanz- oder Rückenflosse) genommen.

13. Anlage 2 bietet einen Überblick über die Prüfbedingungen der validierten Arten (Japanischer Reiskarpfling, Dreistachliger Stichling und Zebraäbrbling).

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

14. Ergebnisse einer Prüfung der akuten Toxizität oder eines sonstigen kurzzeitigen Toxizitätstests (z. B. Prüfmethode C.14 (34) und OECD-Prüfrichtlinie 210 (1)), vorzugsweise für die in diesem Test verwendete Art, sollten vorliegen. Dafür müssen die Wasserlöslichkeit und der Dampfdruck der Prüfchemikalie bekannt und eine zuverlässige Analysemethode zur quantitativen Erfassung der Chemikalie in den Versuchsbecken mit bekannter und dokumentierter Genauigkeit und Nachweisgrenze verfügbar sein.
15. Weitere hilfreiche Informationen sind die Strukturformel, die Reinheit der Chemikalie, die Stabilität in Wasser und die Lichtbeständigkeit, pKa, P_{ow} und die Ergebnisse einer Prüfung auf leichte biologische Abbaubarkeit (Prüfmethode C.4) (35).

Validitätskriterien

16. Die Testergebnisse sind dann annehmbar, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:
 - Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff liegt während der gesamten Prüfung mindestens bei 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts.
 - Die Wassertemperaturen der Versuchsbecken dürfen sich während der Expositionsdauer zu keinem Zeitpunkt um mehr als $\pm 1,5$ °C unterscheiden und müssen in dem Temperaturbereich liegen, der für die jeweils im Test zu verwendenden Arten vorgesehen ist (Anlage 2);
 - eine validierte Methode zur Analyse der Prüfchemikalie mit einer Nachweisgrenze deutlich unter der niedrigsten nominellen Konzentration muss verfügbar sein, und es müssen hinreichende Belege dafür vorliegen, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung im Bereich von ± 20 % der mittleren Messwerte aufrechterhalten wurden;
 - insgesamt muss die Anzahl der überlebenden befruchteten Eier in den Kontrollen sowie ggf. in den Lösungsmittelkontrollen mindestens mit den in Anlage 2 genannten Grenzwerten übereinstimmen;
 - die Validitätskriterien im Zusammenhang mit dem Wachstum und dem Geschlechterverhältnis am Ende des Tests beruhen auf Daten der Kontrollgruppen (gepoolte Lösungsmittel- und Wasserkontrollen bzw. – wenn beide sich erheblich unterscheiden – ausschließlich der Lösungsmittelkontrolle):

		Japanischer Reiskärpfling	Zebrabärbling	Dreistachliger Stichling
Wachstum	Feuchtmasse der Fische, trockengetupft	> 150 mg	> 75 mg	> 120 mg
	Länge (Standardlänge)	> 20 mm	> 14 mm	> 20 mm
	Geschlechterverhältnis (% männliche oder weibliche Tiere)	30-70 %	30-70 %	30-70%

- Ein verwendetes Lösungsmittel darf keine statistisch signifikante Wirkung auf das Überleben und keine endokrine oder in sonstiger Weise beeinträchtigende Wirkung auf die frühen Lebensstadien haben; dass diese Wirkungen nicht zu erwarten sind, ist anhand einer Lösungsmittelkontrolle nachzuweisen.

Wenn eine Abweichung von den Annahmekriterien des Tests festgestellt wird, sind die Konsequenzen im Hinblick auf die Zuverlässigkeit der Testdaten zu prüfen; die Ergebnisse dieser Prüfung sind in den Bericht aufzunehmen.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Versuchsbecken

17. Für den Test können beliebige Becken aus Glas, Edelstahl oder sonstigem chemisch inertem Material verwendet werden. Die Kammern müssen so groß bemessen sein, dass die im Folgenden genannten Besatzkriterien erfüllt werden. Vorzugsweise werden die Versuchsbecken im Testbereich randomisiert aufgestellt. Eine randomisierte Aufstellung, bei der jeweils sämtliche Konzentrationen in jedem Block enthalten sind, ist gegenüber einer vollständig randomisierten Aufstellung zu bevorzugen. Die Versuchsbecken sind gegen unerwünschte Störungen abzuschirmen.

Auswahl der im Test zu verwendenden Art

18. In Anlage 2 werden empfohlene Fischarten genannt. Die Verfahren zur Einbeziehung neuer Arten werden in Nummer 2 erläutert.

Haltung der Elternfische

19. Nähere Informationen zur Haltung der Elternfische sind der OECD-Prüfrichtlinie 210(1) zu entnehmen. Die Elternfische sind ein- oder zweimal täglich mit geeignetem Futter zu versorgen.

Handhabung von Embryos und Larven

20. Zunächst können Embryos und Larven in einer Hauptkammer mit kleineren Glas- oder Edelstahlkammern ausgesetzt werden, die seitlich oder auf den Stirnseiten mit einem Sieb versehen sind, damit die Prüfchemikalie hindurchströmen kann. Um einen nicht verwirbelnden Strom durch diese kleinen Versuchsbecken zu erzeugen, können die

Becken an einem Arm aufgehängt werden, mit dem sie angehoben und abgesenkt werden; die Organismen befinden sich dabei ständig unter Wasser.

21. Wenn Eierbehälter, Gitter oder Siebe verwendet wurden, um die Eier im Haupt-Versuchsbecken zu halten, sind die Behälter, Gitter oder Siebe nach dem Schlüpfen der Larven zu entfernen, soweit die Siebe nicht benötigt werden, damit die Fische das betreffende Behältnis nicht verlassen. Wenn die Larven umgesetzt werden müssen, dürfen sie nicht mit der Umgebungsluft in Berührung kommen, und die Fische dürfen nicht mit einem Netz aus den Eierbehältern entnommen werden. Wann und ob überhaupt eine Umsetzung erfolgt, hängt von der jeweiligen Art ab.

Wasser

22. Als Testwasser ist jedes Wasser geeignet, in dem die im Test verwendete Art unter kontrollierten Bedingungen nachweislich mindestens ebenso gut wie in dem in Anlage 3 beschriebenen Wasser überlebt. Während der gesamten Testdauer muss eine konstante Wasserqualität aufrechterhalten werden. Um sicherzustellen, dass das Verdünnungswasser die Testergebnisse nicht unangemessen beeinträchtigt (indem es beispielsweise mit der Prüfchemikalie reagiert) oder dass das Verdünnungswasser sich nicht auf das Verhalten des Zuchtbestands auswirkt, sind regelmäßig Proben zu nehmen. Zu messen sind der gesamte organisch gebundene Kohlenstoff (TOC), die Leitfähigkeit, der pH-Wert und die suspendierten Feststoffe, beispielsweise alle drei Monate, wenn das Verdünnungswasser bekanntermaßen von verhältnismäßig konstanter Qualität ist. Bei zweifelhafter Wasserqualität müssen die Anteile an Schwermetallen (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd und Ni) sowie an wichtigen Anionen und Kationen (z. B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- und SO_4^{2-}) und Pestiziden gemessen werden. Nähere Informationen zu chemischen Analysen und zur Entnahme des Wassers sind Nummer 34 zu entnehmen.

Testlösungen

23. Nach Möglichkeit sollten Durchflusssysteme verwendet werden. Für Durchflusstests wird für die Versorgung der Versuchsbecken mit unterschiedlichen Konzentrationen ein System benötigt, das kontinuierlich eine Stammlösung der Prüfchemikalie abgibt und verdünnt (z. B. eine Dosierpumpe, ein Proportionalverdünner oder eine Sättigungsvorrichtung). Die Durchflussraten von Stammlösungen und Verdünnungswasser sind während des Tests regelmäßig zu prüfen und dürfen während des Tests höchstens um 10 % schwanken. Ein Durchfluss entsprechend mindestens fünf Becken-Volumina in 24 Stunden hat sich als angemessen erwiesen (1). Leitungen aus Kunststoff oder aus sonstigen Materialien, die zum Teil biologisch aktive Chemikalien enthalten oder die Prüfchemikalie adsorbieren können, sind zu vermeiden.
24. Die Stammlösung wird vorzugsweise ohne Lösungsmittel hergestellt, indem die Prüfchemikalie einfach mechanisch (z. B. durch Rühren oder mit Ultraschall) in das Verdünnungswasser gemischt wird. Wenn die Prüfchemikalie in Wasser schwer löslich ist, wird verfahren, wie im *OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* beschrieben (36). Der Einsatz von Lösungsmitteln sollte vermieden werden, ist in Einzelfällen aber vielleicht erforderlich, um eine Stammlösung von geeigneter Konzentration zu erzielen. In (36) werden einige geeignete Lösungsmittel genannt.

25. Semistatische Testbedingungen sollten vermieden werden, wenn keine zwingenden Gründe im Zusammenhang mit der jeweiligen Prüfchemikalie (Stabilität, eingeschränkte Verfügbarkeit, hohe Kosten oder Risiken usw.) gegeben sind. Bei semistatischen Tests können zwei unterschiedliche Verfahren zur Erneuerung des Wassers verwendet werden. Entweder werden neue Testlösungen in sauberen Kammern hergestellt, und die überlebenden Eier und Larven werden vorsichtig in die neuen Kammern umgesetzt, oder die Testorganismen werden in den Versuchsbecken belassen, und ein Teil des Testwassers (mindestens zwei Drittel) wird täglich erneuert.

VERFAHREN

Expositionsbedingungen

Entnahme der Eier und Dauer des Tests

26. Um einen Bias durch genetische Effekte zu vermeiden, werden für den Beginn des Tests Eier von mindestens drei Brutpaaren oder Gruppen entnommen, gemischt und zufällig ausgewählt. Bei Dreistachligen Stichlingen ist die Beschreibung der künstlichen Befruchtung in Anlage 11 zu beachten. Der Test sollte möglichst bald nach der Befruchtung der Eier beginnen; die Embryos werden vorzugsweise vor der Blastulascheiben-Spaltung oder zumindest möglichst bald nach diesem Stadium und spätestens 12 h nach der Befruchtung in die Testlösungen eingesetzt. Der Test wird fortgesetzt, bis die Geschlechtsdifferenzierung in der Kontrollgruppe abgeschlossen ist (bei Japanischen Reiskärpflingen, Dreistachligen Stichlingen und Zebraabrärlingen 60 Tage nach dem Schlüpfen).

Besatz

27. Zu Beginn des Tests müssen mindestens 120 befruchtete Eier pro Konzentration auf mindestens 4 Replikate verteilt werden. (Eine Aufteilung auf die Kontrolle nach dem Quadratwurzel-Verfahren ist annehmbar.) Die Eier werden randomisiert (mithilfe statistischer Tabellen) auf die verschiedenen Konzentrationen verteilt. Die Besatzrate (Begriffsbestimmung siehe Anlage 1) muss so gering sein, dass ein Gehalt an gelöstem Sauerstoff von mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts ohne direkte Belüftung der Kammern aufrechterhalten werden kann. Bei Durchflusstests ist eine Besatzrate von 0,5 g/l in 24 Stunden und ständig höchstens 5 g/l Lösung zu empfehlen. Spätestens 28 Tage nach der Befruchtung sind die Fische so auf die einzelnen Replikate umzuverteilen, dass die Replikate jeweils möglichst genau die gleiche Anzahl an Fischen enthalten. Wenn es zu expositionsbedingter Mortalität kommt, ist die Anzahl der Replikate entsprechend zu reduzieren, damit die Besatzdichte immer möglichst einheitlich ist.

Licht und Temperatur

28. Die Photoperiode und die Wassertemperatur müssen auf die jeweilige Testspezies abgestimmt sein. (Zu den Versuchsbedingungen des FSDT siehe Anlage 2.)

Fütterung

29. Die Futterqualität und die Bereitstellung des Futters sind von entscheidender Bedeutung; für jedes Entwicklungsstadium muss das richtige Futter in den richtigen

Intervallen und in hinreichender Menge angeboten werden, damit die Tiere sich normal entwickeln können. Die Fütterung erfolgt ad libitum; ein Überangebot sollte aber möglichst vermieden werden. Um ein hinreichendes Wachstum zu ermöglichen, müssen die Fische mindestens zweimal (bzw. an Wochenenden auch nur einmal) täglich gefüttert werden; zwischen den Fütterungszeiten sollten jeweils mindestens drei Stunden liegen. Nicht verzehrtes Futter und Kot sind gegebenenfalls zu entfernen, damit sich keine Verunreinigungen ansammeln. Mit zunehmender praktischer Erfahrung werden Futterqualität und Fütterungszeiten kontinuierlich optimiert, um bestmögliche Überlebens- und Wachstumsbedingungen zu erzielen. Daher müssen anerkannte Fachleute das vorgeschlagene Fütterungsprotokoll bestätigen. 24 Stunden vor Ende des Tests ist die Fütterung einzustellen. In Anlage 2 werden einige Beispiele für geeignetes Futter genannt (siehe auch OECD-Rahmenleitlinien für Fischtests) (39).

Prüfkonzentrationen

30. Die Prüfchemikalien sind in den in Anlage 4 genannten Konzentrationen zu verwenden. Bei mindestens vier Replikaten sind mindestens drei Testkonzentrationen zu verwenden. Die Kurve der LC₅₀-Werte im Verhältnis zur Expositionsdauer in den verfügbaren akuten Toxizitätstests ist bei der Auswahl des Spektrums der Testkonzentrationen zu berücksichtigen. Wenn die Daten zur Risikobewertung verwendet werden sollen, werden fünf Testkonzentrationen empfohlen.
31. Konzentrationen von mehr als 10% des LC₅₀-Werts für akute Toxizität bei adulten Tieren bzw. von mehr als 10 mg/l brauchen nicht geprüft zu werden. (Maßgeblich ist der jeweils niedrigere Wert.) Die maximale Testkonzentration sollte bei 10 % des LC₅₀-Wertes für die Larven/juvenilen Tiere liegen.

Kontrollgefäße

32. Zusätzlich zu den Testkonzentrationen werden eine Kontrolle mit Verdünnungswasser (≥ 4 Replikate) sowie gegebenenfalls eine Lösungsmittelkontrolle (≥ 4 Replikate) benötigt. Im Test sind ausschließlich Lösungsmittel zu verwenden, die nachweislich keine statistisch signifikante Wirkung auf die Endpunkte des Tests haben.
33. Wenn ein Lösungsmittel verwendet wird, darf die Endkonzentration nicht mehr als 0,1 ml/l (36) betragen; außerdem muss die Konzentration in allen Versuchsbecken mit Ausnahme der Kontrolle mit dem Verdünnungswasser gleich sein. Allerdings sollte die Verwendung der Lösungsmittel möglichst unbedingt vermieden werden, und die Konzentrationen der Lösungsmittel sollten auf ein Minimum begrenzt werden.

Häufigkeit der analytischen Bestimmungen und Messungen

34. Vor Beginn des Tests ist durch chemische Analysen der Konzentrationen der Prüfchemikalie zu prüfen, ob die Validitätskriterien erfüllt sind. Alle Replikate sind zu Beginn und am Ende des Tests einzeln zu analysieren. Pro Testkonzentration wird während der Testdauer mindestens einmal wöchentlich ein Replikat analysiert; dabei sind die Replikate regelmäßig abzuwechseln (1,2,3,4,1,2,...). Wenn Proben für eine Analyse zu einem späteren Zeitpunkt aufbewahrt werden, muss die Methode zur Lagerung der Proben zuvor validiert worden sein. Um sicherzustellen, dass die zu analysierende Chemikalie tatsächlich vollständig gelöst ist, sind die Proben zu filtern (z. B. mit einer Porengröße von 0,45 μm) oder zu zentrifugieren.

35. Während des Tests werden der gelöste Sauerstoff, der pH-Wert, die Gesamthärte, die Leitfähigkeit, der Salzgehalt (soweit von Bedeutung) und die Temperatur in allen Becken gemessen. Der Anteil an gelöstem Sauerstoff, der Salzgehalt (soweit von Bedeutung) und die Temperatur sind mindestens wöchentlich und der pH-Wert, die Leitfähigkeit und die Härte jeweils zu Beginn und am Ende des Tests zu messen. Die Temperatur sollte vorzugsweise in mindestens einem Prüfgefäß kontinuierlich überwacht werden.
36. Die Ergebnisse sollten auf gemessene Konzentrationen bezogen werden. Wenn die Konzentration der gelösten Prüfchemikalie während der gesamten Testdauer zufriedenstellend aufrechterhalten wurde ($\pm 20\%$ der nominellen Konzentration), können auch die Nennwerte oder die gemessenen Werte zugrunde gelegt werden.

Beobachtungen und Messungen

Embryonale Entwicklungsstadien

37. Die Exposition beginnt möglichst bald nach der Befruchtung, vor der Blastulascheibenspaltung und spätestens 12 h nach der Befruchtung, damit eine Exposition auch bereits im frühen Embryonalstadium gegeben ist.

Schlupfrate und Überlebensrate

38. Mindestens einmal täglich wird geprüft, ob Jungtiere geschlüpft sind und wie viele noch leben; die entsprechenden Zahlen werden protokolliert. Tote Embryos, Larven und juvenile Fische sind möglichst zu entfernen, nachdem sie bemerkt wurden; sonst könnten sie sich rasch zersetzen und unter Einwirkung der übrigen Fische zerstört werden. Beim Entfernen toter Tiere ist mit höchster Sorgfalt vorzugehen, damit andere Eier bzw. Larven (die äußerst empfindlich sind) nicht durch Stöße oder auf sonstige Weise mechanisch beschädigt werden. Je nach Lebensstadium sind unterschiedliche Mortalitätskriterien anzunehmen:
- Eier: insbesondere in den frühen Stadien eine ausgeprägte Verringerung der Lichtdurchlässigkeit sowie Farbänderungen durch Koagulation und/oder ausgefällte Proteine und entsprechend weißliches und opakes Aussehen der Eier;
 - Larven und juvenile Fische: Unbeweglichkeit und/oder Fehlen von Atembewegungen und/oder Herzschlägen und/oder opake weiße Verfärbung des zentralen Nervensystems und/oder fehlende Reaktion auf mechanische Reize.

Anomales Aussehen

39. Die Anzahl der Larven oder Fische mit anomaler Körperform ist zu protokollieren; außerdem ist die Art der Anomalität zu beschreiben. Anomale Embryos und Larven kommen auch natürlich vor und können in den Kontrollen bei einigen Arten im Bereich von mehreren Prozent liegen. Anomale Tiere sind erst nach dem Tod aus den Becken zu entfernen. Nach Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere sind die Tiere jedoch wie in Nummer 44 beschrieben zu betäuben und zu töten, wenn die Anomalien, Schmerzen, Leiden oder Stressbelastung oder anhaltende Schäden zur Folge haben und der Tod der Tiere zuverlässig absehbar ist; in der Datenanalyse sind die Tiere dann als gestorben zu behandeln.

Anomales Verhalten

40. Festgestellte Anomalien (z. B. Hyperventilation, unkoordiniertes Schwimmverhalten, untypisch ruhiges Verhalten und untypisches Fressverhalten) sind zu protokollieren.

Gewicht

41. Am Ende des Tests werden alle überlebenden Fische getötet (betäubt, wenn Blutproben genommen werden müssen); anschließend wird jeweils die Feuchtmasse (trockengetupft) gemessen.

Länge

42. Am Ende des Tests ist die Länge (Standardlänge) der einzelnen Fische zu messen.
43. Aufgrund dieser Beobachtungen können die folgenden Daten teilweise oder vollständig in den Berichten erfasst werden:
- kumulative Mortalität;
 - Anzahl gesunder Fische am Ende des Tests;
 - Dauer des Schlüpfprozesses (Beginn und Ende);
 - Länge und Gewicht der überlebenden Tiere;
 - Anzahl der Larven mit Fehlbildungen;
 - Anzahl der Fische mit Verhaltensauffälligkeiten.

Entnahme von Fischen

44. Am Ende des Tests werden Stichproben der Fische genommen. Die entnommenen Fische werden z. B. mit MS-222 (100-500 mg/l gepuffert mit 200 mg NaHCO₃/l) oder mit FA-100 (4-Allyl-2-methoxyphenol: Eugenol) getötet und einzeln gemessen und gewogen (Feuchtmasse, trockengetupft) bzw. betäubt, wenn eine Blutprobe genommen werden soll (siehe Nummer 49).

Probenahme für die VTG-Analyse und für die Geschlechtsbestimmung durch histologische Untersuchung

45. Für die Probe sind alle Fische zu entnehmen und für die VTG-Analyse und die Geschlechtsbestimmung vorzubereiten. Zur Geschlechtsbestimmung werden alle Fische histologisch untersucht. Für die VTG-Messungen ist eine Teilprobe von mindestens 16 Fischen aus den einzelnen Replikaten annehmbar. Wenn die Ergebnisse der Teilproben sich als nicht eindeutig herausstellen, ist eine größere Anzahl an Fischen einer VTG-Analyse zu unterziehen.
46. Die Verfahren zur Probenahme für VTG-Analysen und Geschlechtsbestimmungen hängen von der jeweils eingesetzten Methode zur VTG-Analyse ab:

VTG-Analyse mit der Kopf-/Schwarz-Homogenat-Methode

47. Die Fische werden getötet. Kopf und Schwanz werden jeweils durch Schnitte unmittelbar hinter den Brustflossen und unmittelbar hinter der Rückenflosse mit einem scharfen Skalpell vom Körper getrennt (siehe Abbildung 1). Köpfe und Schwänze der Fische werden gepoolt, gewogen, einzeln nummeriert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei mindestens -70 ° zur VTG-Analyse aufbewahrt. Der Körper der Fische wird

ebenfalls nummeriert und in einer geeigneten Fixierlösung zur histologischen Untersuchung fixiert (22). Bei dieser Methode wird jedes einzelne Exemplar einer VTG-Analyse und einer histopathologischen Untersuchung unterzogen; eine mögliche Änderung des VTG-Wertes kann dann in Beziehung zum phänotypischen oder zum genotypischen Geschlecht (Japanischer Reiskarpfing und Dreistachliger Stichling) gesetzt werden. Weitere Informationen sind den Leitlinien zur Homogenisierung (Anlage 5) sowie den Leitlinien für eine quantitative Bestimmung des VTG-Wertes (Anlage 6) zu entnehmen.

VTG-Analyse mit der Leber-Homogenat-Methode

48. Die Fische werden getötet. Die Leber wird herauspräpariert und bei mindestens -70 °C gelagert. Empfohlene Verfahren zum Herauspräparieren und zur Vorbehandlung der Leber sind OECD-Prüfrichtlinie 229 (37) oder in diesem Anhang Kapitel C.37 zu entnehmen (38). Anschließend werden die Lebern einzeln homogenisiert, wie in der OECD-Prüfrichtlinie 229 oder in diesem Anhang in Kapitel C.37 beschrieben. Der Überstand wird zur VTG-Messung mit einem homologen ELISA-Verfahren entnommen. (Ein Beispiel für die quantitative Bestimmung bei Zebraabärblingen wird in Anlage 6 beschrieben; die quantitative Bestimmung beim Japanischen Reiskarpfing wird in der OECD-Prüfrichtlinie 229 (37) erläutert.) Bei diesem Verfahren können auch Daten zu einzelnen Fischen sowohl aus der VTG-Analyse als auch aus der histologischen Gonadenuntersuchung ermittelt werden.

VTG-Analyse mit der Blutplasma-Methode

49. Den betäubten Fischen wird mit einer Herzpunktion oder durch einen Schnitt in die Schwanzvene oder in den Schwanz Blut entnommen; das Blut wird zur Plasmagewinnung bei 4 °C zentrifugiert. Bis zur Verwendung wird das Plasma bei mindestens -70 °C gelagert. Die Fische werden getötet und zur histologischen Untersuchung fixiert. Die Plasmaproben und die Fische werden einzeln nummeriert, um VTG-Konzentrationen dem Geschlecht der Fische zuordnen zu können.

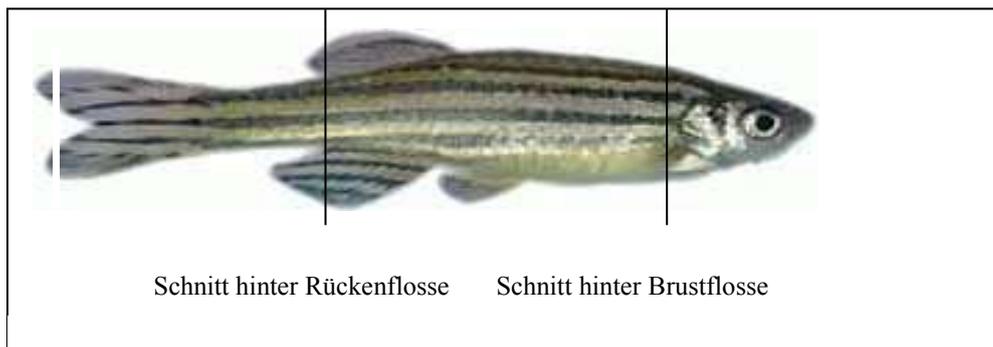


Abbildung 1: Sezieren der Fische zur VTG-Messung an einem Kopf-/Schwanz-Homogenat und zur histologischen Analyse des mittleren Abschnitts

Bestimmung des genetischen Geschlechts

50. Von einzelnen Fischen von Arten mit geeigneten Markern wird eine biologische Probe zur Bestimmung des genetischen Geschlechts entnommen. Bei Japanischen Reiskarpfingen werden die Afterflosse und die Rückenflosse verwendet. Eine detaillierte Beschreibung einschließlich Erläuterungen zur Entnahme von

Gewebeproben und zur Geschlechtsbestimmung mit einem PCR-Verfahren (PCR = Polymerase-Kettenreaktion) ist Anlage 9 zu entnehmen. Die Entnahme von Gewebeproben und die Geschlechtsbestimmung durch PCR bei Dreistachligen Stichlingen werden in Anlage 10 beschrieben.

VTG-Messung

51. Die Messung der VTG-Konzentration muss auf einer quantitativen und einer analytisch validierten Methode bestehen. Informationen zur Intra- und Inter-Assay-Variabilität der Methode sollten verfügbar sein. Ursache der Intra- und Inter-Assay-Variabilität sind (sehr wahrscheinlich) die verschiedenen Entwicklungsstadien der Fischpopulation. Angesichts der Variabilität bei den VTG-Messungen sind allein mit diesem Endpunkt ermittelte NOECs mit erheblicher Vorsicht zu bewerten. Die Bewertung der VTG-Produktion bei der in diesem Test berücksichtigten Fischart kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Ein sowohl verhältnismäßig empfindliches als auch hinreichend spezifisches Messverfahren besteht in der Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit einem ELISA-Verfahren (ELISA = *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*). Im Test sind homologe Antikörper (gebildet gegen VTG der jeweiligen Art) sowie die wichtigsten homologen Standards zu verwenden.

Geschlechtsbestimmung

52. Je nach Probenahmeverfahren bei VTG-Bestimmungen wird der gesamte Fisch oder der verbleibende mittlere Abschnitt der einzelnen Fische in eine bereits gekennzeichnete Bearbeitungskassette gelegt und in einer geeigneten Lösung zur histologischen Geschlechtsbestimmung (sowie optional auch zur Bewertung des Entwicklungszustands der Gonaden) fixiert. Nähere Informationen zum Fixieren und zum Einbetten sind Anlage 7 sowie dem *OECD Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads* (22) zu entnehmen. Nach der Vorbereitung wird der Fisch in Paraffinblöcke eingebettet. Die einzelnen Tiere sind der Länge nach in einen Paraffinblock zu legen. Von jedem Fisch werden mindestens sechs Längsschnitte (mit einer Stärke von 3-5 μm) in der Frontalebene einschließlich des Gewebes aus beiden Gonaden hergestellt. Diese Schnitte sollten im Abstand von etwa 50 μm bei männlichen Tieren und von 250 μm bei weiblichen Tieren erfolgen. Da jeder Block häufig sowohl männliche als auch weibliche Tiere enthält (wenn in einen Block mehrere Fische eingebettet wurden), sollte der Abstand zwischen den einzelnen Schnitten etwa 50 μm betragen, bis von jedem männlichen Exemplar mindestens sechs Schnitte aus dem Gonadengewebe hergestellt wurden. Anschließend kann der Abstand zwischen den Schnitten bis auf etwa 250 μm bei weiblichen Fischen erhöht werden. Die Schnitte werden mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt und unter einem Lichtmikroskop unter schwerpunktmäßiger Berücksichtigung des Geschlechts (männlich, weiblich, intersexuell oder nicht differenziert) untersucht. Eine Intersexualität ist dann festzustellen, wenn bei sechs analysierten Schnitten in den Hoden mehr als ein Oozyt erkannt wird, oder wenn in Eierstöcken Spermatogenesenzellen nachgewiesen werden (ja/nein). Die histopathologische Untersuchung und die Bewertung des Entwicklungsstadiums von Eierstöcken und Hoden ist fakultativ; wenn eine Untersuchung vorgenommen wird, müssen die Ergebnisse statistisch analysiert und im Bericht erfasst werden. Bei einigen Fischarten sind die Gonadenpaare von Natur aus nicht vollständig entwickelt; diese Fische verfügen vielleicht nur über eine einzelne Gonade (z. B. Japanische Reiskärpflinge und gelegentlich Zebrabärblinge). Die entsprechenden Beobachtungen sind zu

protokollieren.

53. Zur Bestimmung des genetischen Geschlechts bei einzelnen Japanischen Reiskärpflingen wird geprüft, ob das männliche Determinationsgen DMY auf dem Y-Chromosom vorhanden ist. Das genotypische Geschlecht der Reiskärpflinge kann durch Sequenzieren des DMY-Gens aus DNA bestimmt werden, die beispielsweise aus einem Stück der After- oder der Rückflosse gewonnen wurde. Unabhängig vom Phänotyp kennzeichnet das DMY-Gen die männlichen Tiere (XY); entsprechend ist das Fehlen des DMY-Gens unabhängig vom Phänotyp als Beleg für das Vorliegen eines weiblichen Tieres (XX) anzunehmen (23). Leitlinien zur Präparation der Gewebe und zur PCR-Methode sind Anlage 9 zu entnehmen. Die Bestimmung des genetischen Geschlechts bei einzelnen Dreistachligen Stichlingen erfolgt mit einer PCR-Methode (siehe Anlage 10).
54. Eine festgestellte Intersexualität (Begriffsbestimmung siehe Anlage 1) ist im Bericht zu vermerken.

Sekundäre Geschlechtsmerkmale

55. Sekundäre Geschlechtsmerkmale werden bei Arten wie dem Japanischen Reiskärpfling hormonell gesteuert. Daher ist am Ende der Expositionsdauer möglichst auch das physische Aussehen der Fische zu prüfen. Bei Japanischen Reiskärpflingen reagiert die Papillenbildung im hinteren Teil der Afterflosse bei Weibchen androgensensitiv. In diesem Anhang enthält Kapitel C.37 (38) Fotos sekundärer männlicher Geschlechtsmerkmale und maskulinisierter Weibchen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

56. Wichtig ist, dass der Endpunkt mit dem gültigen statistischen Test mit der höchsten Aussagekraft bestimmt wird. Die Replikate werden jeweils als Versuchseinheit behandelt; Variabilität innerhalb eines Replikats ist in den statistischen Tests zu berücksichtigen. Anlage 8 enthält ein Flussdiagramm, das die Auswahl des angesichts der Merkmale der zu ermittelnden Daten jeweils am besten geeigneten statistischen Tests erleichtern soll. Das Signifikanzniveau beträgt für alle Endpunkte 0,05.

Geschlechterverhältnisse und genetisches Geschlecht

57. Bei einer monotonen Dosis-Wirkungs-Beziehung sind die Geschlechterverhältnisse mit dem Jonckheere-Terpstra-Test (Trend-Test) im Hinblick auf signifikante Expositionswirkungen zu analysieren (NOEC-/LOEC-Ansatz). Wenn keine Monotonie festgestellt wird, kann ein paarweiser Test durchgeführt werden. Der Dunnett-Test ist bei Normalverteilung und Varianzhomogenität vorzunehmen. Bei heterogener Varianz wird der Tamhane-Dunnett-Test durchgeführt. Ansonsten ist der Exakte Mann-Whitney-Test mit Anpassung nach Bonferroni-Holm vorzunehmen. Anlage 8 enthält ein Flussdiagramm mit statistischen Angaben zu den Geschlechterverhältnissen. Die Geschlechterverhältnisse sind tabellarisch als Konzentrationsverhältnisse \pm Standardabweichung der männlichen, weiblichen, intersexuellen und nicht differenzierten Tiere darzustellen. Die statistische Signifikanz ist besonders

hervorzuheben. Beispiele sind dem Validierungsbericht über den FSDT Phase 2 zu entnehmen (42). Das genetische Geschlecht ist als Prozentanteil der Umkehr des phänotypischen Geschlechts bei männlichen, weiblichen, intersexuellen und nicht differenzierten Tieren zu protokollieren.

VTG-Konzentrationen

58. VTG-Konzentrationen sind auf signifikante Expositionswirkungen zu untersuchen (NOEC-/LOEC-Ansatz). Der Dunnett-Test ist dem t-Test mit Bonferroni-Korrektur vorzuziehen. Wenn eine Bonferroni-Korrektur vorgenommen wird, ist eine Anpassung nach Bonferroni-Holm vorzuziehen. Zur Erzielung einer Normalverteilung und der nötigen Varianzhomogenität wird eine Log-Transformation der VTG-Werte vorgesehen. Wenn die konzentrationsabhängige Reaktion im Einklang mit einer festgestellten Monotonie steht, sollte anstelle aller oben genannten Tests der Jonckheere-Terpstra-Test vorgenommen werden. Wenn t-Tests oder der Dunnett-Test durchgeführt werden, können die folgenden Schritte ausgeführt werden, ohne im Rahmen einer ANOVA zunächst einen F-Test zur Prüfung auf Signifikanz durchzuführen. Nähere Informationen sind Anlage 8 zu entnehmen. Die Ergebnisse werden in einer Tabelle als mittlere Konzentrationen \pm Standardabweichung für männliche, weibliche, intersexuelle und nicht differenzierte Fische getrennt dargestellt. Die statistische Signifikanz phänotypischer Weibchen und phänotypischer Männchen ist besonders hervorzuheben. Beispiele sind dem Validierungsbericht über den FSDT Phase 2 zu entnehmen (42).

Tatsächliche Konzentrationen der Prüfchemikalie

59. Die tatsächlichen Konzentrationen der Prüfchemikalie in den Kammern sind in den in Nummer 34 genannten Intervallen zu bestimmen. Die Ergebnisse werden in Tabellen als mittlere Konzentration \pm Standardabweichung bezogen auf die Replikate sowie bezogen auf Konzentrationen unter Angabe der Anzahl der Proben erfasst; Ausreißer gegenüber der mittleren Testkonzentration \pm 20 % sind besonders hervorzuheben. Beispiele sind dem Validierungsbericht über den FSDT Phase 2 zu entnehmen (42).

Interpretation der Ergebnisse

60. Die Testergebnisse sind mit Vorsicht zu bewerten, wenn sich die gemessenen Konzentrationen der Prüfchemikalie in Testlösungen in der Nähe der Nachweisgrenze der jeweiligen Analyseverfahren bewegen.

Prüfbericht

61. Das Prüfprotokoll enthält die folgenden Informationen:

Prüfchemikalie

- relevante physikalisch-chemische Merkmale; chemischer Name; Daten u. a. zur Reinheit und zur Analyseverfahren zur Quantifizierung der Prüfchemikalie.

Prüfbedingungen

- verwendetes Testverfahren (z. B. Durchfluss, semistatisch oder Erneuerung); Prüfprotokoll einschließlich Testkonzentrationen, Methode zur Herstellung der Stammlösungen (in einem Anhang), Häufigkeit der Erneuerung (wenn verwendet, sind das Lösungsmittel und die Konzentration des Lösungsmittels anzugeben);

- die nominellen Testkonzentrationen, die Mittelwerte der gemessenen Werte und die jeweiligen Standardabweichungen in den Becken sowie die Methode zur Ermittlung dieser Werte (die verwendete Analyseverfahren ist in einem Anhang zu beschreiben); Nachweise dafür, dass sich die Messungen der Konzentrationen auf die vollständig gelöste Prüfchemikalie beziehen;
- Wasserqualität in den Becken; pH-Wert, Härte, Temperatur und Anteil des gelösten Sauerstoffs;
- detaillierte Angaben zur Fütterung (z. B. Art des Futters, Herkunft, Menge und Häufigkeit der Fütterung sowie gegebenenfalls Analysen auf Verunreinigungen (z. B. PCB, PAH und chlororganische Pestizide)).

Ergebnisse

- Belege dafür, dass die Kontrollen die Validitätskriterien erfüllt haben: Daten zur Schlupfrate sind in Tabellen als Prozentanteile pro Replik und pro Konzentration anzugeben. Ausreißer bezogen auf die Validitätskriterien (in den Kontrollen) sind besonders hervorzuheben. Die Überlebensrate ist als Prozentanteil pro Replik und pro Konzentration anzugeben. Ausreißer bezogen auf die Validitätskriterien (in den Kontrollen) sind besonders hervorzuheben.
- klare Angaben der ermittelten Ergebnisse zu den verschiedenen Endpunkten: Überlebensrate der Embryos und Schlupfrate; äußerliche Anomalien; Länge und Gewicht; VTG-Messungen (ng/g Homogenat, ng/ml Plasma oder ng/mg Leber); histologische Gonadenuntersuchung, Geschlechterverhältnis; Daten zum genetischen Geschlecht; ungewöhnliche Reaktionen der Fische sowie jegliche sichtbare Wirkungen der Prüfchemikalie.

62. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler anzugeben. Die Statistiken müssen mindestens die NOEC und die LOEC sowie die Konfidenzintervalle enthalten. Das statistische Flussdiagramm (Anlage 8) ist zu berücksichtigen.

LITERATUR

- (1) OECD (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test*, Test Guideline No. 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen und J.P. Sumpter, 1996, „Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, pp. 194-202.
- (3) Sumpter, J.P., und S. Jobling, 1995, „Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment“, *Environmental Health Perspectives* 103, S. 173-178.
- (4) Tyler, C.R., R. van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix und H. Trip (1999), „An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, S. 337-347.
- (5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen und P. Bjerregaard (2001a), „Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*)“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 130, S. 119-131.
- (6) Andersen, L., P. Bjerregaard und B. Korsgaard (2003), „Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters“, *Fish Physiology and Biochemistry* 28, S. 319-321.
- (7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren und G.I. Petersen (2003), „Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone“, *Aquatic Toxicology* 65, S. 397-411.
- (8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla und C.R. Tyler (2002), „Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, S. 319-326.
- (9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear und Z.J. Wang (2007), „Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, S. 533-541.
- (10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc und C.V. Sullivan (1999), „Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 123, S. 113-125.

- (11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr und J.M. Porcher (2002), „Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*)“, *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, S. 1699-1708.
- (12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara und E. Tamiya (2002), „Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 132, S. 161-169.
- (13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James und B.E. Bengtsson (2004), „The juvenile three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a model organism for endocrine disruption - II - kidney hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction“, *Aquatic Toxicology* 70, S. 311-326.
- (14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita und T. Iguchi (2004), „Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka“, *Journal of Health Science* 50, S. 301-308.
- (15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson und A. Goksoyr (2006), „Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin. *Aquatic Toxicology*“, 78, S. 202-206.
- (16) Jensen, K.M., und G.T. Ankley (2006), „Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)“, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, S. 101-105.
- (17) Holbeck, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L., und Bjerregaard, P (2001b), „Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)“, *Nordic Council of Ministers, TemaNord 2001:597*, S. 48-51.
- (18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher und A. Goksoyr (2004), „Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening“, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, S. 621-633.
- (19) Orn, S., S. Yamani und L. Norrgren (2006), „Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone“, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, S. 237-243.

- (20) Scholz, S., und N. Klüber (2009), „ Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development 3, S. 136-151.
- (21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers und H. Segner (2005), „An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*“, Environmental Toxicology and Chemistry 24, S. 1088-1098.
- (22) OECD (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment No. 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OECD, Paris.
- (23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, und Y. Nagahama (2004), „Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*“, Developmental Dynamics 231, S. 518-526.
- (24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi und M. Sakaizumi (2004), „Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations“, Zoological Science 21, S. 613-619.
- (25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak und R.W. Flick (2007), „Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen“, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, S. 8897-8901.
- (26) Palace, V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron und K.A. Kidd (2009), „Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake“, Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, S. 1920-1935.
- (27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno und C.R. Tyler (2006), „Development of chronic tests for endocrine active chemicals - Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)“, Aquatic Toxicology 77, S. 279-290.
- (28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren und P. Bjerregaard (2006), „Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)“, Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, S. 57-66.
- (29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard und P. Bjerregaard (2004), „Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase

- inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)“, *Fish Physiology and Biochemistry* 30, S. 257-266.
- (30) Morthorst, J.E., H. Holbech und P. Bjerregaard (2010), „Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations“, *Aquatic Toxicology* 98, S. 336-343.
- (31) Kiparissis, Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch, and C.D. Metcalf (2003), „Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)“, *Aquatic Toxicology* 63, S. 391-403.
- (32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley und C.R. Tyler (2004), „Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development“, *Aquatic Toxicology* 70, S. 11-21.
- (33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen und P. Bjerregaard (2007), „Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*)“, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 145, S. 165-170.
- (34) Kapitel C.14 dieses Anhangs, Wachstumstest an Jungfischen.
- (35) Kapitel C.4 in diesem Anhang, Leichte biologische Abbaubarkeit.
- (36) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.
- (37) OECD (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay*, Test Guideline No. 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (38) Kapitel C.37 in diesem Anhang, 21-Tage-Fischttest: eine Kurzzeitprüfung auf Östrogen- und Androgenaktivität und auf Aromatasehemmung.
- (39) OECD (2012), *Fish Toxicity Testing Framework*, Series on Testing and Assessment No. 171, OECD, Paris
- (40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), „Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, *Danio rerio*“ *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 70, 9-10, S 768-779.
- (41) OECD (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OECD, Paris.

- (42) OECD (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OECD, Paris.
- (43) OECD (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment No 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OECD, Paris.
- (44) Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. ABl. L 276 vom 20.10.2010, S. 33.

Anlage 1

ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Apikaler Endpunkt: Punkt, an dem eine Wirkung auf Populationsebene verursacht wird.

ASV: *Air Saturation Value* (Luftsauerstoff-Sättigungswert)

Biomarker: Punkt, an dem eine Wirkung auf individueller Ebene verursacht wird.

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch

Dph: *Days post hatch* (Tage nach dem Schlüpfen)

DMY: Y-spezifisches Determinationsgen; wichtig für die Entwicklung männlicher Japanischer Reiskarpflinge

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Fischmasse: Feuchtmasse der Fische, trockengetupft

FSDT: *Fish Sexual Development Test*

HPG-Achse: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse

Intersexueller Fisch: Fisch mit mehr als einem Oozyten in den Hoden bei 6 analysierten Schnitten bzw. mit Spermatogenezellen in den Eierstöcken (ja/nein)

Besatzrate: Feuchtmasse eines Fisches pro Wasservolumen

MOA: *Mode Of Action* (Wirkungsmechanismus)

RT-PCR: *Reverse Transcriptase Polymerase Chain-Reaction* (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

Nicht differenzierter Fisch: Fisch mit Gonaden ohne erkennbare Keimzellen.

VTG: Vitellogenin

Anlage 2

VERSUCHTSBEDINGUNGEN DES FSDT (SÜSSWASSER-ARTEN)

1. Empfohlene Arten	Japanischer Reiskarpfling (<i>Oryzias latipes</i>)	Zebrabärbling (<i>Danio rerio</i>)	Dreistachliger Stichling (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. Testtyp	Durchfluss semistatisch: oder	Durchfluss semistatisch: oder	Durchfluss semistatisch: oder
3. Wassertemperatur	25 ± 2 °C	27 ± 2 °C	20 ± 2 °C
4. Beleuchtung	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)
5. Lichtintensität	10-20 µE/m ² /s, 540-1080 lx, oder 50-100 ft-c (Werte für Laborumgebung)	10-20 µE/m ² /s, 540-1080 lx, oder 50-100 ft-c (Werte für Laborumgebung)	10-20 µE/m ² /s, 540-1080 lx, oder 50-100 ft-c (Werte für Laborumgebung)
6. Photoperiode	12-16 h Licht, 8-12 h Dunkelheit	12-16 h Licht, 8-12 h Dunkelheit	16 h Licht, 8 h Dunkelheit
7. Mindestgröße der Kammern	Die einzelnen Kammern müssen ein Fassungsvermögen von mindestens 7 l haben.	Die einzelnen Kammern müssen ein Fassungsvermögen von mindestens 7 l haben.	Die einzelnen Kammern müssen ein Fassungsvermögen von mindestens 7 l haben.
8. Erneuerung der Testlösungen	Mindestens 5-mal täglich	Mindestens 5-mal täglich	Mindestens 5-mal täglich
9. Alter der Testorganismen bei Beginn der Exposition	Frisch befruchtete Eier (frühes Blastula-Stadium)	Frisch befruchtete Eier (frühes Blastula-Stadium)	Frisch befruchtete Eier

10. Anzahl der Eier pro Behandlung	Mind. 120	Mind. 120	Mind. 120
11. Anzahl der Behandlungen	Mind. 3 (sowie entsprechende Kontrollen)	Mind. 3 (sowie entsprechende Kontrollen)	Mind. 3 (sowie entsprechende Kontrollen)
12. Anz. der Replikate pro Behandlung	Mind. 4 (wenn keine Aufteilung auf die Kontrollen nach dem Quadratwurzelverfahren vorgenommen wird)	Mind. 4 (wenn keine Aufteilung auf die Kontrollen nach dem Quadratwurzelverfahren vorgenommen wird)	Mind. 4 (wenn keine Aufteilung auf die Kontrollen nach dem Quadratwurzelverfahren vorgenommen wird)
13. Fütterungsprotokoll	Lebende <i>Artemia</i> , tiefgefrorene adulte Salinenkrebse, Flockenfutter usw., möglichst zweimal täglich	Spezielle Jungfische, lebende <i>Artemia</i> , tiefgefrorene adulte Salinenkrebse, Flockenfutter usw., möglichst zweimal täglich	Lebende <i>Artemia</i> , tiefgefrorene adulte Salinenkrebse, Flockenfutter usw., möglichst zweimal täglich
14. Belüftung	Keine, wenn der Gehalt an gelöstem Sauerstoff nicht unter eine Sättigung von 60 % fällt	Keine, wenn der Gehalt an gelöstem Sauerstoff nicht unter eine Sättigung von 60 % fällt	Keine, wenn der Gehalt an gelöstem Sauerstoff nicht unter eine Sättigung von 70 % fällt
15. Verdünnungswasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser
16. Dauer der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie	60 Tage nach dem Schlüpfen	60 Tage nach dem Schlüpfen	60 Tage nach dem Schlüpfen
17. Biologische Endpunkte	Schlupfrate, Überlebensrate, Gesamtmorphologie,	Schlupfrate, Überlebensrate, Gesamtmorphologie,	Schlupfrate, Überlebensrate, Gesamtmorphologie,

	VTG histologische Gonaden- untersuchungen, genetisches Geschlecht, Geschlechterverhältnis	VTG histologische Gonaden- untersuchungen, Geschlechterverhältnis	VTG histologische Gonadenuntersuchungen, Geschlechterverhältnis
18. Validitätskriterien des Tests bei gepoolten Replikaten der Kontrollen	<p>Schlupfrate > 80 %</p> <p>Überlebensrate nach dem Schlüpfen ≥ 70 %</p> <p>Wachstum (Feuchtmasse der Fische, trockengetupft) > 150 mg</p> <p>Länge (Standardlänge) >20 mm</p> <p>Geschlechterverhältnis (% männliche oder weibliche Fische) 30-70 %</p>	<p>Schlupfrate > 80 %</p> <p>Überlebensrate nach dem Schlüpfen ≥ 70 %</p> <p>Wachstum (Feuchtmasse der Fische, trockengetupft) > 75 mg</p> <p>Länge (Standardlänge) >14 mm</p> <p>Geschlechterverhältnis (% männliche oder weibliche Fische) 30-70 %</p>	<p>Schlupfrate > 80 %</p> <p>Überlebensrate nach dem Schlüpfen ≥ 70 %</p> <p>Wachstum (Feuchtmasse der Fische, trockengetupft) > 120 mg</p> <p>Länge (Standardlänge) >20 mm</p> <p>Geschlechterverhältnis (% männliche oder weibliche Fische) 30-70 %</p>

Anlage 3

CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS

BESTANDTEILE	KONZENTRATION
Partikelmaterial	< 20 mg/l
Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffen	< 2 mg/l
Nichtionisiertes Ammonium	< 1 µg
Restchlor	< 10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden und polychloriertem Biphenylen	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	< 25 ng/l

Anlage 4

AUS PRÜFMETHODE C.14 / LEITLINIEN ZU TESTKONZENTRATIONEN

Spalte (Anzahl der Konzentrationen zwischen 100 und 10 oder zwischen 10 und 1)*						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

* Aus einer Spalte kann eine Reihe von drei (oder mehr) aufeinanderfolgenden Konzentrationen ausgewählt werden. Die Mittelpunkte zwischen den Konzentrationen in Spalte (x) sind Spalte (2x + 1) zu entnehmen. Die aufgeführten Konzentrationen können Volumen- oder Masseprozent (mg/l oder µg/l) darstellen. Die Werte können gegebenenfalls mit jeder beliebigen Zehnerpotenz multipliziert bzw. durch sie dividiert werden. Spalte 1 kann verwendet werden, wenn erhebliche Unsicherheit hinsichtlich des Toxizitätsgrads besteht.

Anlage 5

LEITLINIEN ZUR HERSTELLUNG VON KOPF- UND SCHWANZ-HOMOGENATEN VON JUVENILEN ZEBRABÄRBLINGEN, DICKKOPFELRITZEN, DREISTACHLIGEN STICHLINGEN UND JAPANISCHEN REISKÄRPFLINGEN

In diesem Abschnitt werden die Verfahren vor der Quantifizierung der VTG-Konzentration beschrieben. Es können jedoch auch andere Verfahren eingesetzt werden, mit denen die VTG-Konzentration in vergleichbarer Weise quantifiziert werden kann. Mit diesem Verfahren kann die VTG-Konzentration auch in Blutplasma oder in Leberpräparaten (statt in Kopf- oder Schwanz-Homogenaten) bestimmt werden.

Verfahren

1. Die Fische werden betäubt und getötet, wie für den Test beschrieben.
2. Kopf und Schwanz der Fische werden abgeschnitten, wie im Test erläutert. **Wichtig:** Jeweils nach der Präparation eines Fisches sind die Sezierinstrumente und das Sezierbrett abzuwaschen und ordnungsgemäß zu reinigen (z. B. mit 96%igem Ethanol), um VTG-„Kontaminationen“ bei weiblichen Fischen oder Kontaminationen von induzierten Männchen auf nicht induzierte Männchen zu vermeiden.
3. Das Gewicht der gepoolten Kopf- und Schwanz-Präparate der einzelnen Fische wird auf 1 mg genau gemessen.
4. Nach dem Wiegen werden die Präparate in geeignete Röhrchen (z. B. 1,5 ml Eppendorf) gegeben und bei -80 °C bis zur Homogenisierung gefroren oder unmittelbar mit zwei Kunststoff-Pistillen auf Eis homogenisiert. (Alternativ können auch andere Methoden verwendet werden, sofern sie auf Eis durchgeführt werden und eine homogene Masse entsteht.) **Wichtig:** *Die Röhrchen sind ordnungsgemäß zu nummerieren, damit die Kopf- und Schwanz-Präparate der Fische für die histologische Gonadenuntersuchung dem jeweiligen Rumpf zugeordnet werden können.*
5. Wenn die Masse homogen ist, wird die eisgekühlte **Homogenisierungs-Pufferlösung*** (das 4- bis 10-Fache des Gewebegewichts) hinzugegeben. (Der Verdünnungsfaktor ist zu protokollieren.) Das Präparat wird weiter mit den Pistillen bearbeitet, bis eine homogene Mischung entstanden ist. **Wichtiger Hinweis:** *Für jeden Fisch ist ein frisches Pistill zu verwenden.*
6. Die Proben werden bis zur Zentrifugierung (4 °C , 50 000 g, 30 Minuten) auf Eis gelegt.
7. Mit einer Pipette werden Anteile von 20-50 μl (Volumen protokollieren) des Überstands in **mindestens zwei** Röhrchen gefüllt, indem die Spitze der Pipette unter die Fettschicht des Überstands getaucht und der Überstand vorsichtig eingesaugt wird, ohne jedoch Fett- oder Pelletfraktionen aufzunehmen.
8. Die Röhrchen werden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

**Homogenisierungs-Pufferlösung:*

50 mM Tris-HCl pH 7,4; Proteasehemmer-Cocktail (1 %) (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl Proteasehemmer-Cocktail (oder entsprechende Proteasehemmer-Cocktails).

TRIS: TRIS, ULTRA PURE (ICN)

Proteasehemmer-Cocktail: Sigma (Säugetiergewebe) Produktnummer **P 8340**.

HINWEIS: Die Homogenisierungs-Pufferlösung ist am Tag der Herstellung zu verbrauchen. Während der Verwendung muss die Pufferlösung auf Eis gelegt werden.

ANLAGE 6

LEITLINIEN ZUR BESTIMMUNG DER VITELLOGENIN-KONZENTRATION IN KOPF- UND SCHWANZ-HOMOGENATEN VON ZEBRABÄRBLINGEN (*DANIO RERIO*) (MODIFIZIERT NACH HOLBECH ET AL., 2001); ALTERNATIV KÖNNEN AUCH ANDERE VERFAHREN UNTER VERWENDUNG HOMOLOGER ANTIKÖRPER UND ANDERE STANDARDS ANGEWENDET WERDEN.

1. Mit 5 µg/ml Anti-Zebrabärbling-Lipovitellin-IgG beschichtete Mikrotiterplatten (zertifiziert Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Dänemark) werden aufgetaut und dreimal mit Waschlösung gewaschen.*
2. Gereinigter Zebrabärblings-Vitellogenin-Standard¹ wird in einem Verdünnungspuffer** seriell auf 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 und 20 ng/ml verdünnt; anschließend werden die Proben nochmals mindestens 200-mal in einem Verdünnungspuffer verdünnt (um Matrixeffekte zu verhindern) und in die Platten gegeben. Außerdem werden duplizierte Assay-Kontrollen hergestellt. In die Vertiefungen werden jeweils 150 µl gefüllt. Die Standards werden dupliziert und die Proben tripliciert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4 °C in einer Schüttelvorrichtung.
3. Die Platten werden 5-mal mit Waschlösung gewaschen.*
4. HRP gekoppelt an eine Dextrankette (z. B. AMDEX A/S, Dänemark) und konjugierte Antikörper werden im Waschlösung verdünnt. Die Verdünnung ist je nach Charge und Alter unterschiedlich. In jede Vertiefung werden 150 µl gegeben; anschließend werden die Platten 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Schüttelvorrichtung inkubiert.
5. Die Platten werden fünfmal mit Waschlösung* gewaschen; die Unterseite der Platten wird sorgfältig mit Ethanol gereinigt.
6. In die Vertiefungen werden jeweils 150 µl TMB plus*** gegeben. Die Platte ist mit Alufolie gegen Lichteinfall zu schützen; in einer Schüttelvorrichtung wird die Farbentwicklung beobachtet.
7. Wenn sich die Standardkurve vollständig entwickelt hat, wird die Enzymaktivität gestoppt, indem in die Vertiefungen jeweils 150 µl 0,2 M H₂SO₄ gegeben werden.
8. Die Absorption wird bei 450 nm gemessen (z. B. auf einem Photometer für Mikrotiterplatten (Molecular Devices Thermomax Microplate Reader). Die Daten werden mit der dazugehörigen Software (z. B. Softmax) analysiert.

¹ Battelle AP4.6.04 (1,18 mg/ml (AAA)), gereinigt nach Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* 8: 385-398.

***Waschpuffer:**

PBS-Stammlösung**** 500,0 ml
BSA 5,0 g
Tween 20 5,0 ml

*Der pH-Wert wird auf 7,3 eingestellt; anschließend wird mit Millipore-H₂O auf 5 l aufgefüllt.
Die Proben werden bei 4 °C gelagert.*

****Verdünnungspuffer:**

PBS-Stammlösung**** 100,0 ml
BSA 3,0 g
Tween 20 1,0 ml

*Der pH-Wert wird auf 7,3 eingestellt; anschließend wird mit Millipore-H₂O auf 1 l aufgefüllt.
Die Proben werden bei 4 °C gelagert.*

*** TMB plus ist ein „gebrauchsfertiges“ Substrat von KemEnTec (Dänemark).
Das lichtempfindliche Substrat wird bei 4 °C gelagert.

******PBS-Stammlösung**

NaCl 160,0 g
KH₂PO₄ 4,0g
Na₂HPO₄, 2H₂O 26,6 g
KCl 4,0g

*Der pH-Wert wird auf 6,8 eingestellt; anschließend wird mit Millipore-H₂O auf 2 l aufgefüllt.
Die Proben werden bei Raumtemperatur gelagert.*

ANLAGE 7

LEITLINIEN ZUR PRÄPARATION VON GEWEBESCHNITTEN ZUR GESCHLECHTSBESTIMMUNG UND ZUR BEURTEILUNG DES STADIUMS DER GONADENENTWICKLUNG

In diesem Abschnitt werden die Verfahren vor der Untersuchung der histologischen Schnitte beschrieben. Alternativ können auch andere Verfahren verwendet werden, mit denen eine Geschlechtsbestimmung vorgenommen und das Stadium der Gonadenentwicklung festgestellt werden kann.

Mit einigen wenigen Ausnahmen sind diese Verfahren bei Japanischen Reiskärpflingen (JMD = Japanische Medaka) und Zebraäbrlingen (ZF = *Zebrafish*) ähnlich.

Tötung, Sektion und Gewebefixierung

Ziele:

1. Gewährleistung einer schmerzlosen Tötung der Fische;
2. Ermittlung der benötigten Körpergewichte und Durchführung der erforderlichen Messungen;
3. Beurteilung sekundärer Geschlechtsmerkmale;
4. Herstellung von Gewebesektionen für VTG-Analysen;
5. Fixierung der Gonaden;

Verfahren:

1. Die Fische sind unmittelbar vor der Sektion zu töten. Wenn nicht mehrere Prosektoren verfügbar sind, dürfen daher nicht mehrere Fische gleichzeitig getötet werden.
2. Mit dem kleinen Kescher wird ein Fisch aus der Versuchskammer entnommen und in einem Transportbehältnis in den Sektionsbereich gebracht.
3. Der Fisch wird in die Tötungslösung gesetzt. Wenn die Atmung zum Stillstand gekommen ist und der Fisch auf äußere Reize nicht mehr reagiert, wird der Fisch aus der Lösung genommen.
4. Danach wird die Feuchtmasse des Fisches ermittelt.
5. Für die Präparation der Gewebe zur VTG-Analyse kann der Fisch auf eine Korkplatte auf dem Tisch eines Präpariermikroskops gelegt werden.
 - a. Bei Zebraäbrlingen wird der Kopf unmittelbar hinter der Brustflosse und der Schwanz unmittelbar hinter der Rückenflosse abgeschnitten.
 - b. Bei Japanischen Reiskärpflingen wird der Bauch mit einem sorgfältigen Schnitt entlang der Bauchmittellinie vom Schultergürtel bis zu einem Punkt

unmittelbar kranial zum After aufgetrennt. Mit der kleinen Pinzette und mit einer kleinen Schere wird vorsichtig die Leber entnommen.

6. Proben für die VTG-Analyse werden in Eppendorf-Röhrchen gegeben und umgehend in flüssigem Stickstoff gefroren.
7. Der Fischkörper wird einschließlich der Gonaden in eine gekennzeichnete Gewebekassette gelegt, die anschließend in eine Fixierlösung (Davidson oder Bouin) gestellt wird. Von der Fixierlösung wird mindestens das zehnfache Volumen des ungefähren Gewebevolumentens benötigt. Das Behältnis mit der Fixierlösung wird fünf Sekunden lang vorsichtig geschüttelt, um Luftblasen vollständig aus der Kassette zu entfernen.
8. a. Alle Gewebe verbleiben über Nacht in der Davidson-Fixierlösung; am folgenden Tag werden sie in einzelne Behältnisse mit 10%igem neutral gepuffertem Formalin gegeben. Die Behältnisse mit den Kassetten werden fünf Sekunden lang vorsichtig geschüttelt, um eine angemessene Durchdringung der Kassette mit dem Formalin sicherzustellen.
 - b. Die Gewebe werden 24 h in der Bouin-Fixierlösung belassen; anschließend werden sie in 70%iges Ethanol gelegt.

Präparation der Gewebe

Ziele:

1. Dehydrieren der Gewebe, damit eine angemessene Durchdringung mit Paraffin ermöglicht wird;
2. Imprägnieren der Gewebe mit Paraffin, um die Gewebe unversehrt zu konservieren und eine feste Oberfläche für die Mikrotomie zu schaffen;

Verfahren:

3. Die gekennzeichneten Kassetten werden aus der Formalin-/Ethanol-Lösung genommen und in die Einbettungskörbe gesetzt. Diese werden in den Gewebeeinbettter gestellt.
4. Danach wird das Einbettungsprogramm ausgewählt.
5. Nach Abschluss des Einbettungsvorgangs können die Körbe im Aufbewahrungsbereich abgelegt werden.

Einbettung

Ziel:

Ordnungsgemäße Ausrichtung der Proben in verfestigtem Paraffin zur anschließenden Mikrotomie.

Verfahren:

1. Die Körbe mit den Kassetten werden aus dem Gewebeeinbettter genommen

und in die mit Paraffin gefüllte Frontkammer der Heizkonsole der Einbettungsstation oder separat in einen Paraffin-Erwärmer gestellt.

2. Die erste einzubettende Kassette wird aus der Frontkammer der Heizkonsole des Paraffin-Erwärmers genommen. Der Deckel der Kassette wird geöffnet und entsorgt; die Kennzeichnung der Kassette wird mit den Daten des jeweiligen Tiers verglichen, um mögliche Diskrepanzen noch vor dem Einbetten festzustellen.
3. Danach wird eine Einbettungsform mit geeigneter Größe ausgewählt.
4. Die Form wird unter den Auslass der Gießkonsole gestellt und mit geschmolzenem Paraffin gefüllt.
5. Danach wird die Probe aus der Kassette genommen und in die Form in das geschmolzene Paraffin gelegt. Dieser Vorgang wird für jede Paraffinform mit 4-8 Proben wiederholt. Die Fische werden so eingelegt, dass Fisch Nr. 1 im Winkel von 180° zu den Fischen 2-4/8 liegt.
6. Anschließend wird weiteres Paraffin eingefüllt, bis die gesamte Probe abgedeckt ist.
7. Die Form mit der Kassette wird auf die Abkühlplatte der Kryokonsole gestellt.
8. Nach dem Aushärten des Paraffins wird der Block (d. h. das feste Paraffin mit den Geweben und mit der Kassette) aus der Form herausgenommen.

Mikrotomie

Ziel:

Herstellen und Aufziehen der Gewebeschnitte zur Beurteilung der Entwicklungsphasen.

Verfahren:

1. Die Anfangsphase der Mikrotomie („Facing“) gestaltet sich wie folgt:
 - a. Der Paraffinblock wird in das Spannfutter des Mikrotoms gesetzt.
 - b. Das Spannfutter wird durch Drehen des Mikrotomrads vorgeschoben, und aus der Paraffinfläche des Blocks werden dicke Schnitte abgetragen, bis das Messer zu den eingebetteten Geweben gelangt.
 - c. Das Mikrotom wird auf eine Schnittstärke von 3-5 µm eingestellt. Anschließend wird das Futter vorgeschoben, und aus dem Block werden mehrere Schnitte hergestellt, um bei den Grobschnitten eventuell entstandene Verunreinigungen an der Schnittfläche des Gewebes zu entfernen.
 - d. Danach kann der Block aus dem Spannfutter genommen und mit der Oberseite nach unten auf Eis gelegt werden, damit das Gewebe Feuchtigkeit aufnehmen kann.

2. In der nächsten Phase der Mikrotomie werden die endgültigen Schnitte hergestellt und die Gewebeschnitte auf Objektträger aufgezogen. Diese Schritte werden wie folgt durchgeführt:
 - a. Wenn der Block auf Eis gesetzt wurde, wird er heruntergenommen und wieder in das Futter des Mikrotoms gespannt.
 - b. Nachdem das Mikrotom auf eine Schnittstärke von 3-5 μm eingestellt wurde, wird das Spannfutter durch Drehen des Mikrotomrads vorgeschoben. Von dem Block werden Schnitte abgetragen, bis ein Schnittband mit mindestens einem annehmbaren Schnitt einschließlich der Gonaden vorliegt. (Während des Schneidvorgangs kann der Block aus dem Spannfutter genommen und erneut auf Eis gesetzt werden, damit das Gewebe die Feuchtigkeit aufnehmen kann; anschließend wird der Block wieder in das Mikrotom gespannt.)
 - c. Die Schnitte schwimmen im Wasserbad flach auf der Wasseroberfläche auf. Es wird versucht, mindestens einen Schnitt ohne Falten und ohne eingeschlossene Luftblasen zu erhalten.
 - d. Unter den besten Schnitt wird ein Objektträger geschoben, um den Schnitt dann mit dem Objektträger aus dem Wasser zu heben. Dieser Schritt wird als „Aufziehen“ des Schnitts bezeichnet.
 - e. Für die Proben eines Fisches werden jeweils drei Schnitte angefertigt. Der zweite und der dritte Schnitt werden in Abständen von 50 μm vom ersten Schnitt angesetzt. Wenn die Fische nicht mit den Gonaden auf derselben Schnittebene eingebettet wurden, müssen mehrere Schnitte angefertigt werden, um sicherzustellen, dass von jedem Fisch mindestens sechs Schnitte mit den Gonaden verfügbar sind.
 - f. Mit einem Folienstift wird auf dem Objektträger die Nummer des Blocks notiert, aus dem der Schnitt stammt.
 - g. Danach wird der Objektträger in ein Färbegestell gesetzt.
 - h. Nun wird der Block aus dem Spannfutter genommen und zur Lagerung mit der Oberseite nach unten gedreht.

Färben, Eindecken und Kennzeichnen der Objektträger

Ziele:

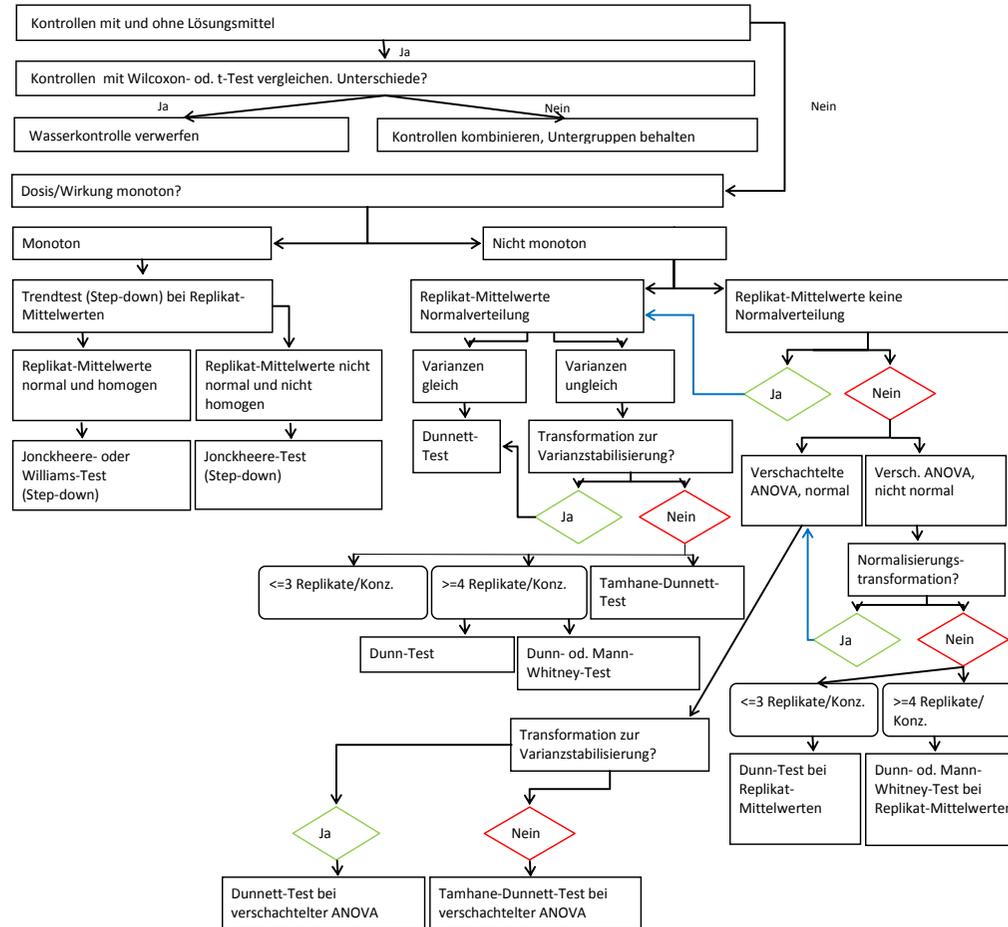
- Färben der Schnitte zur histopathologischen Untersuchung;
- Permanentversiegeln der aufgezogenen und gefärbten Gewebe;
- Permanente Kennzeichnung der gefärbten Schnitte, um eine uneingeschränkte Rückverfolgbarkeit zu gewährleisten;

Verfahren:

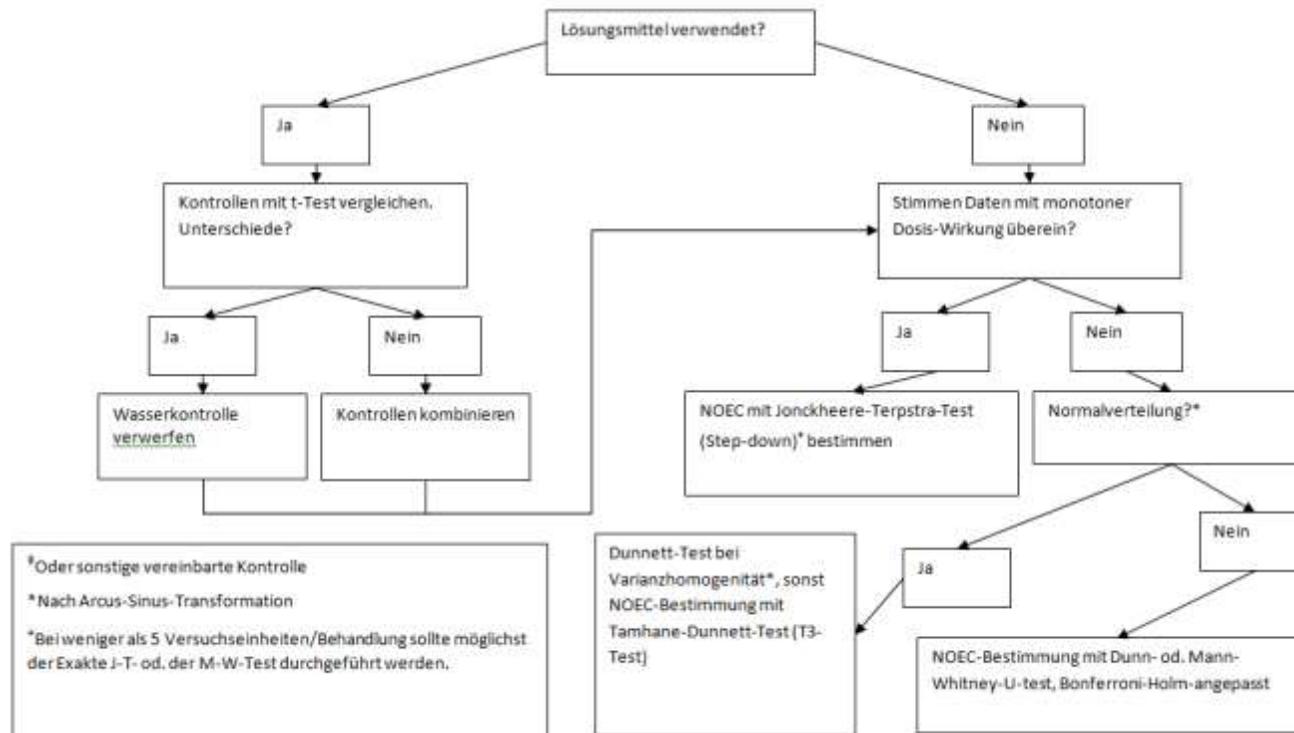
1. Färben
 - a. Die Objektträger werden vor dem Färben über Nacht an der Luft getrocknet.
 - b. Zur Färbung der Schnitte wird Hematoxylin-Eosin verwendet.
2. Eindecken
 - a. Die Deckel können von Hand oder automatisch aufgesetzt werden.
 - b. Die Objektträger werden in Xylol oder TissueClear getaucht; anschließend wird das überschüssige Xylol/TissueClear vorsichtig abgeklopft.
 - c. Zum Ende des Objektträgers hin werden auf die der gefrorenen Seite gegenüberliegende Seite oder auf das Deckglas etwa 0,1 ml Eindeckmedium gegeben.
 - d. Das Deckglas wird in spitzem Winkel gekippt auf den Objektträger aufgesetzt.
3. Kennzeichnung
 - a. Die Objektträger müssen jeweils mit folgenden Informationen gekennzeichnet werden:
 - i. Name des Labors
 - ii. Arten
 - iii. Proben-Nr. / Objektträger-Nr.
 - iv. Chemikalie / Behandlungsgruppe
 - v. Datum

ANLAGE 8

STATISTISCHES FLUSSDIAGRAMM ZUR VITELLOGENIN-ANALYSE



STATISTISCHES FLUSSDIAGRAMM ZUR ANALYSE DES GESCHLECHTERVERHÄLTNISSSES



ANLAGE 9

LEITLINIEN ZUR BESTIMMUNG DES GENETISCHEN GESCHLECHTS MIT GEWEBEPROBEN UND DURCH POLYMERASE-KETTENREAKTION

Entnahme, Präparation und Lagerung von Gewebeproben vor der Bestimmung des genetischen Geschlechts durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bei Medakas (erstellt vom Labor für aquatische Organismen der Bayer CropScience AG)

1. Mit einer feinen Schere wird bei den einzelnen Fischen die After- oder die Rückenflosse abgeschnitten und in ein Röhrchen mit 100 µl Extraktionspuffer 1 gegeben (Informationen zur Herstellung der Pufferlösung s. u.). Nach jedem Fisch wird die Schere in einem mit destilliertem H₂O gefüllten Becherglas gereinigt und mit einem Papiertuch getrocknet.
2. Danach wird das Flossengewebe mit einem Teflon-Mikro-Pistill homogenisiert, um die Zellen aufzuschließen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wird für jedes Röhrchen ein neues Pistill verwendet. Die Pistillen werden über Nacht in 0,5 M NaOH gestellt, anschließend 5 Minuten in destilliertem H₂O gewaschen und bis zum Gebrauch in Ethanol bzw. (nach dem Autoklavieren) steril aufbewahrt.
3. Das Flossengewebe kann auch ohne den Extraktionspuffer 1 auf Trockeneis aufbewahrt und dann bei -80 °C gefroren gelagert werden, um eine Beeinträchtigung der DNA zu vermeiden. Die Extraktion gelingt jedoch besser, wenn die DNA gleichzeitig extrahiert wird (Handhabung s. o.; bei -80 °C gelagerte Proben sind auf Eis aufzutauen, bevor die Pufferlösung in die Röhrchen gefüllt wird).
4. Nach dem Homogenisieren werden alle Röhrchen in ein Wasserbad gesetzt und 15 Minuten bei 100 °C aufgeköcht.
5. Anschließend werden jeweils 100 µl des Extraktionspuffers 2 (Hinweise zur Herstellung der Pufferlösung s. u.) in die Röhrchen pipettiert. Die Proben werden 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen; während dieser 15 Minuten werden sie vorsichtig von Hand geschüttelt.
6. Dann werden alle Röhrchen in das Wasserbad gesetzt und nochmals 15 Minuten bei 100 °C aufgeköcht.
7. Bis zur Durchführung der Analysen werden die Röhrchen bei -20 °C gefroren.

Herstellen der Pufferlösung

PCR-Puffer 1:

500 mg N-Lauroylsarcosine (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, DE)

2 ml 5M NaCl

ad 100 ml dest. H₂O

→ autoklavieren

PCR-Puffer 2:

20 g Chelex (z. B.. Biorad, München, DE)

In 100 ml dest. H₂O quellen lassen.

→ autoklavieren

Bestimmung des genetischen Geschlechts durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bei Medakas (erstellt vom Labor für aquatische Organismen der Bayer CropScience AG)

Die präparierten und gefrorenen Röhrchen (siehe Beschreibung im vorstehenden Abschnitt) werden auf Eis aufgetaut. Anschließend werden sie mit einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert (30 s mit maximaler Drehzahl bei Raumtemperatur). Für die PCR wird der vom Niederschlag getrennte klare Überstand verwendet. Es ist unbedingt zu vermeiden, dass Spuren von Chelex (aus dem Niederschlag) in die PCR gelangen, da sonst die Taq-Polymerase gestört wird. Der Überstand ist umgehend zu verwenden oder gefroren (bei -20 °C) aufzubewahren und in mehreren Schritten aufzutauen (damit bei später durchzuführenden Analysen die DNA nicht beeinträchtigt ist).

1. Herstellung des „Reaktionsgemischs“ (25 µl pro Probe):

	Menge	Endkonzentration
Template-DNA	0,5-2 µl	
10 x PCR-Puffer mit MgCl ₂	2,5 µl	1 x
Nukleotide (jeweils dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	4 µl (5 mM)	200 µM
Vorwärtsprimer (10 µM) (s. u. 3-5)	0,5 µl	200 nM
Rückwärtsprimer (10 µM) (s. u. 3-5)	0,5 µl	200 nM
DMSO	1,25 µl	5%
Wasser (PCR-Qualität)	bis zu 25 µl	
Taq-E-Polymerase	0,3 µl	1.5U

10 x PCR-Puffer mit MgCl₂: 670mM Tris/HCl (pH 8,8 bei 25 °C), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,1 % Tween 20

Bei jeder PCR (s. u. 3-5) werden für jede einzelne Probe (s. o.) der Spezialprimer als neue „Reaktionsmischung“ und die entsprechende Menge an Template-DNA benötigt. Die betreffenden Mengen werden in frische Röhrchen pipettiert. Danach werden alle Röhrchen verschlossen, gerührt (ca. 10 s) und zentrifugiert (10 s bei Raumtemperatur). Anschließend kann mit den jeweiligen PCR-Programmen begonnen werden. Für jedes

PCR-Programme werden außerdem eine positive Kontrolle (eine exemplarische DNA-Probe mit bekannter Aktivität und eindeutigen Ergebnissen) und eine negative Kontrolle (1 µl dest. H₂O) benötigt.

2. Herstellung des Agarosegels (1 %) – während der PCR-Programme:

- 3 g Agarose werden in 300 ml 1 x TAE-Puffer gelöst (1%-Agarosegel).
- Diese Lösung wird in einem Mikrowellengerät aufgekocht (ca. 2-3 min).
- Die heiße Lösung wird in einen auf Eis stehenden speziellen Gießkasten gegeben.
- Nach etwa 20 min kann das Agarosegel verwendet werden.
- Das Agarosegel wird bis zum Ende der PCR-Programme in 1x TAE-Puffer aufbewahrt.

3. Actin-PCR-Programm:

Mit dieser PCR soll nachgewiesen werden, dass die DNA der Probe nicht beschädigt ist.

- Spezialprimer:
„Mact1(aufwärts/vorwärts)“ → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA
„Mact2(abwärts/rückwärts)“ → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG
- Programm:
5 min bei 95 °C
Zyklus (35-mal):
Denaturierung → 45 s bei 95 °C
Annealing → 45 s bei 56 °C
Verlängerung → 1 min bei 68 °C
15 min bei 68 °C

4. X- und Y-Gen-PCR-Programm:

Bei diesem PCR-Programm werden die X- und Y-Gene anhand der Proben mit unversehrter DNA nachgewiesen. Proben männlicher Tiere müssen eine doppelsträngige und weiblicher Tiere eine einsträngige DNA aufweisen (nach dem Färben und nach der Gel-Elektrophorese). Bei diesem Programmdurchlauf ist jeweils eine positive Kontrolle für männliche (XY-Probe) und für weibliche Tiere (XX-Probe) zu berücksichtigen.

- Spezialprimer:
„PG 17,5“ (aufwärts/vorwärts) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG
„PG 17,6“ (abwärts/rückwärts) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG
AGA

- Programm:
5 min bei 95 °C
Zyklus (40-mal):
Denaturierung → 45 s bei 95 °C
Annealing → 45 s bei 55 °C
Verlängerung → 1 min 30 s bei 68 °C
15 min bei 68 °C

5. Y-Gen-PCR-Programm als „Kontrolle“ für das X- und Y-Gen-PCR-Programm:

Mit diesem PCR-Programm werden die Ergebnisse des „X- und Y-Gen-PCR-Programms“ verifiziert. Die „männlichen“ Proben müssen einen Strang aufweisen, in den „weiblichen“ Proben darf kein Strang enthalten sein (nach dem Färbern und der Gel-Elektrophorese).

- Spezialprimer:
„DMTYa (aufwärts/vorwärts)“ → GGC CGG GTC CCC GGG TG
„DMTYd (abwärts/rückwärts)“ → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G
- Programm:
5 min bei 95 °C
Zyklus (40-mal):
Denaturierung → 45 s bei 95 °C
Annealing → 45 s bei 56 °C
Verlängerung → 1 min bei 68 °C
15 min bei 68 °C

6. Färben der PCR-Proben:

Färbelösung:
50 % Glycerol
100 mM EDTA
1 % SDS
0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol

In die Röhren wird jeweils 1 µl der Färbelösung pipettiert.

7. Beginn der Gel-Elektrophorese:

- Das hergestellte 1%ige Agarosegel wird in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Gel-Elektrophoresekammer gegeben.
- Von den gefärbten PCR-Proben werden jeweils 10-15 µl in einen Agarosegel-Slot pipettiert.
- Außerdem werden 5-15 µl der 1kb-Ladder (Invitrogen) in einen eigenen Slot pipettiert.

- Die Elektrophorese wird mit 200 V begonnen.
- Nach 30-45 min wird die Elektrophorese beendet.

8. Bestimmung der Banden:

- Das Agarosegel wird in destilliertem H₂O gereinigt.
- Anschließend wird das Agarosegel 15-30 min in Ethidiumbromid gegeben.
- Danach ist in einem UV-Lichtschrank eine Aufnahme des Agarosegels herzustellen.
- Zum Schluss werden die Proben im Vergleich zum positiven Kontrollband (bzw. den positiven Kontrollbanden) und zur DNA-Leiter analysiert.

ANLAGE 10

LEITLINIEN ZUR HERSTELLUNG VON GEWEBEPROBEN ZUR BESTIMMUNG DES GENETISCHEN GESCHLECHTS DURCH PCR BEIM DREISTACHLIGEN STICHLING

Herstellung von Gewebeproben und DNA-Extraktion

Die DNA kann mit verschiedenen handelsüblichen Reagenzien und mit manuellen oder automatischen Systemen extrahiert werden. Im Folgenden wird das Protokoll des CEFAS-Labors (CEFAS = *Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science*) in Weymouth beschrieben; gegebenenfalls werden auch alternative Methoden erläutert.

1. Bei jedem einzelnen Fisch wird mit einer feinen Schere jeweils etwas Gewebematerial (10-20 mg) aus dem Rückenbereich (dorsolateral) entnommen (nachdem der Kopf und der Schwanz für die VTG-Analyse abgetrennt wurden). Das Gewebe wird in ein Röhrchen gegeben und entweder sofort in flüssigen Stickstoff gestellt (zur Lagerung bei -80 °C) oder mit 70%igem Ethanol gefüllt (zum Transport und zur anschließenden Aufbewahrung bei 4 °C). Jeweils nach Entnahme der Gewebeprobe bei einem Fisch wird die Schere zunächst mit 70%igem Ethanol und dann mit destilliertem Wasser gereinigt und mit Hygienepapier trockengetupft.

2. Das Ethanol wird (soweit vorhanden) abgesaugt und das Gewebe über Nacht mit Proteinase K in 400 µl ATL-Pufferlösung (Qiagen) gelöst. Eine Aliquote (200 µl) des gelösten Gewebes wird in einen S-Block (Qiagen) mit 96 Vertiefungen gegeben, und die DNA wird in mit Qiagen Universal BioRobot und dem QIamp-Investigator-BioRobot-Kit mit 96 Vertiefungen QIamp-Investigator-BioRobot-Kit extrahiert. Die DNA wird in 50 µl DNase- und RNase-freies Wasser eluiert. Wenn feste Gewebe zur DNA-Extraktion verwendet werden (z. B. die Wirbelsäule oder eine Brustflosse), muss die Probe unter Umständen mit einem FastPrep®-Tissue-Lyser oder mit einem gleichwertigen Aufschlusssystem im Lysepuffer homogenisiert werden.

Alternativ kann wie folgt verfahren werden:

(a) Das Gewebe wird über Nacht mit Proteinase K in 400 µl G2-Lysepuffer (Qiagen) gelöst, und die DNA wird entweder mit dem EZ-1-DNA-Easy-Tissue-Kit und dem EZ-1-Biorobot oder mit dem DNA-Easy-Tissue-Mini-Kit aus 200 µl des gelösten Gewebes extrahiert. Anschließend wird die DNA in ein Flüssigkeitsvolumen von 50 µl eluiert.

(b) Die Gewebe werden mit DNAzol-Reagens verarbeitet. Die Gewebeproben werden 10 Minuten lang in einem Mikrozentrifugen-Röhrchen (1,5 ml) in 1 ml DNAzol gelöst und dann 5 Minuten mit 13 000 U/min zentrifugiert, um vorhandene Partikel vollständig abzutrennen. Die gelöste Probe wird dann in ein frisches 1,5-ml-Mikrozentrifugen-Röhrchen mit 500 µl 100 % molekular reinem Ethanol gegeben und dann 10 Minuten mit 13 000 U/min zentrifugiert, um die DNA auszufällen. Das Ethanol wird entfernt, durch 400 µl molekular reines Ethanol (70 %) ersetzt und nochmals 5 Minuten mit 13 000 U/min zentrifugiert. Anschließend wird das DNA-Pellet in 50 µl molekularem DNase- und RNase-freiem Wasser gelöst. Auch in diesem Fall muss die Probe unter Umständen mit einem FastPrep®-Tissue-Lyser oder mit einem gleichwertigen Aufschlusssystem im Lysepuffer homogenisiert werden, wenn

festes Gewebe zur DNA-Extraktion verwendet werden (z. B. die Wirbelsäule oder eine Brustflosse),

c) Die DNA wird bis zur Verwendung bei -20 °C gespeichert.

Wichtiger Hinweis: Während der Verfahren sind Handschuhe zu tragen.

Analyse durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit 2,5 µl des DNA-Extrakts in 50 µl Reaktionsvolumen wurden unter Verwendung der IDH-Locus-Primer (nach Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416-1424) Amplifikationen vorgenommen:

Vorwärtsprimer 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3'

Rückwärtsprimer 5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3'

Geeignete PCR-Reagenzien werden von zahlreichen Herstellern angeboten. Die im Folgenden beschriebene Methode wird im CEFAS-Labor in Weymouth praktiziert.

1. Herstellung des „Reaktionsgemischs“ (50 µl pro Probe):

Im Folgenden wird die Herstellung eines Mastermix erläutert. Die Herstellung kann vorab erfolgen; anschließend wird der Mastermix bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Der hergestellte Mastermix muss auch für eine negative Kontrolle (nur Wasser in für die Molekularbiologie geeigneter Qualität) ausreichen.

	Menge (Konz. Stammlösung) / Probe	Endkonzentration
5xGoTaq® Reaktionspuffer	10 µl	1 x
MgCl ₂	5 µl (25 mM)	2,5 mM
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 µl (jeweils 25 mM)	jeweils 250 µM
Vorwärtsprimer	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Rückwärtsprimer	0,5µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Wasser in für die Molekularbiologie geeigneter Qualität	30,75 µl	
GoTaq-Polymerase	0,25 µl	1.25U

- 47,5 µl werden in ein gekennzeichnetes dünnwandiges 0,5ml-PCR-Röhrchen gegeben.
- 2,5 µl der gereinigten DNA werden in das entsprechend gekennzeichnete Röhrchen gegeben. Dieser Schritt ist für alle Proben und für die negative Kontrolle zu wiederholen.
- Mit 2 Tropfen Mineralöl wird ein Überstand erzeugt. Alternativ kann ein

Thermocycler mit beheiztem Deckel verwendet werden.

- Die Proben werden verschlossen.
- Die Proben wurden 5 Minuten in einem Thermocycler (Peltier PTC-225) bei $94 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ denaturiert; danach folgen weitere 39 Zyklen von jeweils 1 Minute bei $94 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 Minute bei $55 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 Minute bei $72 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ und schließlich nochmals 10 Minuten bei $72 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

2. Herstellung des Agarosegels (2 %):

Traditionell werden die PCR-Produkte auf einem 20%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid gelöst.

Alternativ können auch Kapillar-Elektrophoresesysteme verwendet werden.

- 2 g Agarose werden in 100 ml 1 x TAE-Puffer eingewogen.
- Die Agarose wird unter Erwärmung in einem Mikrowellengerät (ca. 2-3 min) aufgelöst.
- 2 Tropfen Ethidiumbromid werden hinzugegeben (Endkonzentration $0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$).
- Die heiße Lösung wird in den Gießstand gegossen.
- Anschließend muss gewartet werden, bis das Gel sich verfestigt hat.

3. Gel-Electrophorese:

- Das Agarosegel wird in das Elektrophorese-Gerät gegeben und mit 1 x TAE-Puffer bedeckt.
- Von den Proben werden jeweils $20 \text{ } \mu\text{l}$ in jeweils eine Vertiefung gefüllt; außerdem wird ein Molekulargewichtsmarker (100bp DNA-Leiter, Promega) in eine freie Vertiefung gegeben.
- Die Elektrophorese erfolgt über einen Zeitraum von 30-45 Minuten mit einer Spannung von 120 V.

4. Visualisierung der Amplifikationsprodukte

Wenn das Ethidiumbromid mit dem Agarosegel gemischt wurde, wie oben beschrieben, werden die DNA-Produkte unter einer UV-Quelle sichtbar gemacht. Alternativ kann das Agarosegel angefärbt werden, indem das Gel vor der Visualisierung 30 Minuten mit einer Ethidiumbromid-Verdünnungslösung ($0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ in Wasser) bedeckt wird.

ANLAGE 11

LEITLINIEN ZUR KÜNSTLICHEN BEFRUCHTUNG BEI DREISTACHLIGEN STICHLINGEN

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie Laich des Dreistachligen Stichlings zur anschließenden Verwendung im FSDT befruchtet wird.

Verfahren

Gewinnung des Spermias von den männlichen Fischen

1. Ein kräftig gefärbtes Männchen der gewünschten Population wird getötet.
2. Auf beiden Seiten werden die Hoden entnommen. *Die Hoden sind gewöhnlich als stark pigmentierte, rote Strukturen an der seitlichen Mittellinie des Körpers gut erkennbar.* Dabei kann eine der folgenden Methoden verwendet werden:
3. Mit einer feinen Schere wird von der Kloake im Winkel von etwa 45° mit einem einzigen Schnitt ein 1-1,5 cm langer Einschnitt vorgenommen.
4. Mit einem Skalpell wird ein kurzer seitlicher Schnitt hinter dem Becken und ventral zu den Knochenplatten entlang der Seitenlinie geführt.
5. Die Hoden werden mit einer feinen Pinzette entnommen und in eine Petrischale gelegt.
6. Jeder Hoden wird mit 100 µl frisch hergestellter **Hankscher Lösung*** bedeckt.
7. Die Hoden werden mit einer Rasierklinge oder einem Skalpell fein geschnitten. Dadurch wird das Sperma freigesetzt, und die Hanksche Lösung erhält ein milchiges Aussehen.
8. Die Flüssigkeit mit dem Sperma wird in ein Röhrchen gefüllt; beim Pipettieren ist darauf zu achten, dass kein Hodengewebe aufgenommen wird.
9. 800 µl Hankscher Lösung werden in das Röhrchen gegeben und gut gemischt.
10. Wenn erforderlich, kann das Männchen mit 100%igem Ethanol oder einer sonstigen Fixierlösung fixiert und aufbewahrt werden. Dies ist besonders wichtig, wenn die juvenilen Fische bei der Untersuchung den Elterntieren zugeordnet werden sollen.

* Gepufferte Hanksche Salzlösung (HBSS):

HBSS wird benötigt, um das Sperma zu konservieren, während die Befruchtung vorbereitet wird.

Wichtiger Hinweis: *Die meisten benötigten Stammlösungen können im Voraus hergestellt werden; nur **Stammlösung 5** und schließlich die **endgültige Lösung** müssen am Tag der Verwendung **frisch** hergestellt werden.*

Stammlösung 1

NaCl	8,00 g
KCl	0,40 g
Destilliertes Wasser (DW)	100 ml

Stammlösung 2

Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	0,358 g
KH ₂ PO ₄	0,60 g
DW	100 ml

Stammlösung 3

CaCl ₂	0,72 g
DW	50 ml

Stammlösung 4

MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,23 g
DW	50 ml

Stammlösung 5 (frisch hergestellt)

NaHCO ₃	0,35 g
DW	10 ml

Hinweis: Wenn einige der vorstehenden Salze bereits hergestellt wurden, aber einen anderen Wasseranteil aufweisen (d. h. statt wasserfrei 2H₂O), können auch diese verwendet werden, sofern sie vor der Verwendung auf das richtige Gewicht (bezogen Molekulargewicht) gebracht werden.

Die Hanksche Lösung wird in der nachstehenden Reihenfolge hergestellt:

Stammlösung 1	1,0 ml
Stammlösung 2	0,1 ml
Stammlösung 3	0,1 ml
DW	8,6 ml
Stammlösung 4	0,1 ml
Stammlösung 5	0,1 ml

Vor der Verwendung müssen die Lösungen gut gemischt werden.

Befruchtung

1. Aus der betreffenden Population werden große gravide Weibchen ausgewählt. Die Weibchen sind nur dann zum Herausdrücken des Laichs geeignet, wenn Eier aus der Kloake hervortreten. Typisch für laichbereite Weibchen ist der „angehobene“ Kopf.
2. Mit dem Daumen oder mit einem anderen Finger wird seitlich zum Schwanz über den Fisch gestrichen, um die Abgabe eines Eiersacks in eine frische Petrischale zu provozieren. Diese Behandlung wird auf der anderen Seite

wiederholt. Anschließend wird der Fisch wieder in das Becken zurückgesetzt.

3. Die Eier können mit einem feinen Pinsel (zu einer Monolage) verteilt werden. Wichtig ist, dass möglichst viele Eier mit dem Sperma in Berührung gebracht werden; hilfreich ist daher die Ausbreitung der Eier über eine möglichst große Fläche. Wichtiger Hinweis: Um die Eier herum müssen feuchte Tücher gelegt werden, damit sie nicht austrocknen. (Dabei ist darauf zu achten, dass die Eier nicht unmittelbar mit Wasser in Berührung kommen, damit das Chorion nicht vorzeitig verhärtet und eine Befruchtung verhindern würde.) Die Anzahl der von einem Weibchen produzierten Eier kann erheblich schwanken; in der Regel werden aber von einem einzigen graviden Weibchen leicht etwa 150 Eier gewonnen.
4. 25 µl Sperma in der Hankschen Lösung werden mit einem Pinsel gleichmäßig über die gesamte Fläche der Eier verteilt. Die Eier verhärten rasch und ändern (innerhalb einer Minute) ihre Farbe, sobald die Befruchtung begonnen hat. Wenn geschätzt mehr als 150 Eier entnommen wurden, ist der Schritt zu wiederholen. Verhärten die Eier nicht binnen einer Minute, ist etwas mehr Sperma hinzugeben. Wichtiger Hinweis: Die Zugabe einer größeren Spermamenge erhöht nicht zwangsläufig die Befruchtungsrate.
5. Die Eier und die Spermalösung müssen mindestens 15 Minuten miteinander „reagieren“ können; anschließend sind die befruchteten Eier spätestens 1,5 Stunden nach der Befruchtung in das Expositionsbecken zu bringen.
6. Das Verfahren wird mit einem anderen Weibchen wiederholt, bis die benötigte Anzahl an Eiern entnommen wurde.
7. Vom letzten Entnahmeschritt sind einige Eier aufzubewahren und in 10%iger Essigsäure zu fixieren.

Zählen und Verteilen der Eier im Testbecken

1. Um einen Bias durch genetische Effekte zu vermeiden, werden die Eier gleichmäßig auf die einzelnen Konzentrationen verteilt. Die Chargen der befruchteten Eier sind mit einem stumpfen Instrument (d. h. mit einer breiten Entomologiepinzette oder mit einer Inokulationsöse) jeweils in gleich große Gruppen zu teilen (entsprechend der Anzahl der Konzentrationen). Wenn 4 Replikate mit jeweils 20 Eiern pro Konzentration vorgesehen sind, müssen in jedes Expositionsbecken mindestens 80 Eier gegeben werden. Wichtiger Hinweis: Eine Zugabe von 20 % (d. h. insgesamt 96 Eier pro Konzentration) ist empfehlenswert, bis mit Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass die Eier zu 100 % befruchtet sind.
2. Stichling-Eier entwickeln außerhalb des von den Männchen bewachten Nests sehr leicht Pilzinfektionen. Daher ist entscheidend, dass alle Eier während der ersten 5 Tage des Tests mit Methylenblau behandelt werden. Methylenblau-Stammlösung wird mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt und in das Expositionsbecken gegeben, bis eine endgültige Konzentration von höchstens 2,125 mg/l erreicht ist. Wichtiger Hinweis: Stichlinge dürfen nicht mit Methylenblau in Berührung kommen; nach dem Schlüpfen muss das

Methylenblau entfernt werden, und an Tag 6 darf sich kein Methylenblau mehr im Becken befinden.

3. Die Eier werden täglich geprüft; die Anzahl der abgestorbenen und nicht befruchteten Eier wird protokolliert. Wichtiger Hinweis: Die Eier müssen bis zum Schlüpfen ständig unter Wasser bleiben und dürfen auch kurzzeitig nicht aus dem Wasser genommen werden.

C.42 Biologische Abbaubarkeit in Meerwasser

ALLGEMEINE EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 306 (1992). Als die ursprünglichen Prüfmethode entwickelt wurden, war nicht bekannt, in welchem Umfang Ergebnisse der Screening-Tests zur Prüfung auf leichte biologische Abbaubarkeit in Süßwasser mit Abwässern oder Belebtschlamm als Inokulum auf die Meeresumwelt übertragbar waren. In diesem Zusammenhang wurde über unterschiedliche Ergebnisse berichtet (z. B. (1)).
2. Viele industrielle Abwässer enthalten zahlreiche Chemikalien. Diese gelangen entweder über direkte Einleitung oder über Ästuarien und Flüsse, in denen die Verweilzeiten gemessen an den für einen vollständigen biologischen Abbau erforderlichen Zeiträumen vieler Chemikalien verhältnismäßig kurz sind, in die Meere. Da die Notwendigkeit des Schutzes der Meeresumwelt vor steigenden Belastungen durch Chemikalien zunehmend ins Bewusstsein rückt und da die wahrscheinlichen Konzentrationen von Chemikalien im Meer abgeschätzt werden müssen, wurden Methoden zur Prüfung der biologischen Abbaubarkeit im Meer entwickelt.
3. In den hier beschriebenen Methoden wird natürliches Meerwasser sowohl als wässrige Phase als auch als Lebensraum betrachtet, aus dem Mikroorganismen bezogen werden können. Im Bestreben, die Anforderungen der Methoden zu erfüllen, die eine leichte biologische Abbaubarkeit in Süßwasser gewährleisten, wurde ultragefiltertes und zentrifugiertes Meerwasser untersucht, und Meeressedimente wurden als Inokulum verwendet. Diese Untersuchungen führten nicht zum Ziel. Als Prüfmedium wird daher natürliches Meerwasser verwendet, aus dem grobe Partikel abgetrennt wurden.
4. Um die vollständige biologische Abbaubarkeit mit der Schüttelmethode zu ermitteln, müssen angesichts der geringen Empfindlichkeit des DOC-Dieaway-Tests (*DOC Dieaway* = Abnahme von gelöstem organischem Kohlenstoff) verhältnismäßig hohe Konzentrationen des Prüfstoffes verwendet werden. Dazu wiederum müssen zum Meerwasser mineralische Nährstoffe (N und P) hinzugegeben werden; ansonsten würden die betreffenden niedrigen Konzentrationen den Abbau des gelösten Kohlenstoffs beeinträchtigen. In Anbetracht der Konzentration des hinzuzufügenden Prüfstoffes müssen auch beim geschlossenen Flaschen-Test Nährstoffe hinzugegeben werden.
5. Insoweit handelt es sich bei den Methoden nicht um Prüfungen auf leichte biologische Abbaubarkeit, da über die bereits im Meerwasser befindlichen Mikroorganismen hinaus kein Inokulum zugegeben wird. In den Tests wird auch die Meeresumwelt nicht simuliert, weil Nährstoffe hinzugegeben werden und weil die Konzentration des Prüfstoffes wesentlich höher ist als in natürlicher Umgebung. Aus diesen Gründen werden die Methoden unter dem neuen Unterabschnitt „Biologische Abbaubarkeit in Meerwasser“ vorgeschlagen.

ANWENDUNG

6. Die Tests werden durchgeführt, weil die betreffenden Stoffe aufgrund ihrer

Verwendungsformen und ihrer Entsorgung letztlich ins Meer gelangen; die Ergebnisse der Tests vermitteln einen ersten Eindruck von der biologischen Abbaubarkeit in Meerwasser. Bei positivem Ergebnis (Abbau des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) >70 %; theoretischer Sauerstoffbedarf (ThSB) >60 %) kann ein Potenzial für den biologischen Abbau in der Meeresumwelt festgestellt werden. Ein negatives Ergebnis schließt ein solches Potenzial jedoch nicht zwangsläufig aus, sondern bedeutet nur, dass weitere Untersuchungen vorgenommen werden müssen (beispielsweise mit einer möglichst niedrigen Konzentration des Prüfstoffes).

7. Wenn ein definitiverer Wert für die Rate des biologischen Abbaus in Meerwasser an einem bestimmten Standort benötigt wird, müssen in beiden Fällen komplexere, aufwendigere und entsprechend kostspieligere Methoden verwendet werden. Beispielsweise könnte ein Simulationstest mit einer Konzentration des Prüfstoffes durchgeführt werden, die näher an der wahrscheinlichen Konzentration in der Umwelt liegt. Auch nicht angereichertes, nicht behandeltes Meerwasser, das am betreffenden Standort entnommen wurde, kann verwendet werden; nach dem primären biologischen Abbau kann eine spezifische chemische Analyse vorgenommen werden. Zur Prüfung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit werden mit ^{14}C markierte Stoffe benötigt, damit der Abbau von löslichem organischem ^{14}C sowie die Entstehung von $^{14}\text{CO}_2$ bei realistischen Konzentrationen gemessen werden können.

WAHL DER METHODEN

8. Die Wahl der zu verwendenden Methode hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die folgende Tabelle vermittelt einen Überblick, der die Wahl erleichtern soll. Stoffe mit einer Wasserlöslichkeit unterhalb der Löslichkeit von etwa 5 mg C/l können mit der Schüttelmethode nicht getestet werden; schlecht lösliche Stoffe können jedoch zumindest einem geschlossenen Flaschen-Test unterzogen werden.

Tabelle: Vorteile und Nachteile des Schüttelkolben-Tests und des geschlossenen Flaschentests

METHODE	VORTEILE	NACHTEILE
SCHÜTTEL-KOLBEN	<ul style="list-style-type: none"> - einfache Apparatur (abgesehen vom C-Analysegerät) - Eine Dauer von 60 Tagen ist unproblematisch. - Keine Beeinflussung durch Nitrifikation - Anpassung zur Berücksichtigung flüchtiger Stoffe möglich 	<ul style="list-style-type: none"> - C-Analysegerät erforderlich - 5-40 mg DOC/l werden verwendet; mögliche Hemmwirkung - Die Ermittlung des gelösten organischen Kohlenstoffs mit geringen Konzentrationen im Meerwasser ist schwierig (Chlorideffekt) - Der DOC ist bei Meerwasser manchmal

		hoch.
GESCHLOSSENE FLASCHE	<ul style="list-style-type: none"> - einfache Apparatur - einfache Endbestimmung - Verwendung geringer Konzentrationen des Prüfstoffes (2 mg/l); entsprechend geringeres Hemmpotenzial - einfache Anpassung zur Berücksichtigung flüchtiger Stoffe 	<ul style="list-style-type: none"> - unter Umständen Schwierigkeiten beim Aufrechterhalten der Luftdichtheit der Flaschen - mögliche Verfälschung der Werte durch Bakterienwachstum an den Wänden - die Werte für die Sauerstoffaufnahme der Blindkontrolle können hoch sein, besonders nach 28 Tagen; Abhilfe möglicherweise durch Alterung des Meerwassers - mögliche Störungen infolge der Sauerstoffaufnahme durch die Nitrifikation

SCHÜTTELMETHODE

EINLEITUNG

1. Diese Methode ist die Meerwasser-Variante des in diesem Anhang in Kapitel C.4B beschriebenen modifizierten OECD-Screening-Tests (2). Der Test wurde nach einem vom Dänischen Institut für Wasserqualität im Auftrag der Europäischen Kommission durchgeführten Ringtest abschließend beschrieben (3).
2. Wie beim begleitenden geschlossenen Flaschen-Test für Meerwasser sind auch die Ergebnisse dieses Tests nicht als Indikatoren für eine leichte biologische Abbaubarkeit zu betrachten, sondern vielmehr zur Ermittlung weiterer Informationen über die biologische Abbaubarkeit von Stoffen in der Meeresumwelt zu verwenden.

PRINZIP DER METHODE

3. Eine vorher festgelegte Menge des Prüfstoffes wird im Testmedium so gelöst, dass sich eine Konzentration von 5-40 mg gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC)/l ergibt. Wenn die Nachweisgrenzen der Analysen auf organischen Kohlenstoff verbessert werden, kann die Verwendung geringerer Konzentrationen des jeweiligen Prüfstoffes von Vorteil sein, insbesondere bei Stoffen mit hemmender Wirkung. Die Lösung des Prüfstoffes im Prüfmedium wird unter Schütteln im Dunkeln oder bei diffuser Beleuchtung unter aeroben Bedingungen bei einer konstanten Temperatur (gewöhnlich im Bereich von 15-20 °C, geregelt auf ± 2 °C) inkubiert. Wenn mit der Untersuchung Umweltbedingungen simuliert werden sollen, können die Tests auch außerhalb dieses normalen Temperaturbereichs durchgeführt werden. Der Test sollte im Allgemeinen höchstens etwa 60 Tage dauern. Der Abbau wird durch DOC-Messungen überwacht (endgültiger Abbau); in manchen Fällen erfolgt die Überwachung durch spezifische Analysen (primärer Abbau).

INFORMATIONEN ZUM PRÜFSTOFF

4. Um festzustellen, welcher Test bei einem bestimmten Stoff durchzuführen ist, müssen einige Merkmale des Stoffes bekannt sein. Der Gehalt des Stoffes an organischen Kohlenstoffen ist zu ermitteln; die Flüchtigkeit muss so weit begrenzt sein, dass es während des Tests nicht zu erheblichen Verlusten kommt, und die Löslichkeit in Wasser muss mehr als 25-40 mg C/l entsprechen. Außerdem darf sich der Prüfstoff nicht erheblich auf Glasflächen adsorbieren. Informationen zur Reinheit oder zu den relativen Anteilen wesentlicher Bestandteile des Prüfstoffes werden benötigt, damit die Testergebnisse entsprechend interpretiert werden können. Dies gilt insbesondere bei sehr knappen Testergebnissen.
5. Informationen über die Toxizität des Prüfstoffes für Bakterien (beispielsweise gemessen anhand von Kurzzeit-Atemfrequenztests (4)) können für die Wahl geeigneter Testkonzentrationen zweckdienlich und für die korrekte Auswertung niedriger Abbaubarkeitswerte ausschlaggebend sein. Diese Informationen sind jedoch nicht immer hinreichend für die Interpretation der Ergebnisse von Tests zur Prüfung der biologischen Abbaubarkeit; eher geeignet ist gegebenenfalls das in Nummer 18

beschriebene Verfahren.

REFERENZSTOFFE

6. Zur Prüfung der mikrobiologischen Aktivität der Meerwasserproben sind geeignete Referenzstoffe zu verwenden, beispielsweise Natriumbenzoat, Natriumacetat und Anilin. Die Referenzstoffe müssen in einer kurzen Zeitspanne abgebaut sein; ansonsten sollte der Test mit einer anderen Meerwasserprobe wiederholt werden.
7. Im Ringtest der Europäischen Kommission, bei dem Meerwasserproben an unterschiedlichen Standorten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Laufe eines Jahres genommen wurden (3), betrug die „Lag“-Phase (t_L) und die Zeitdauer bis zu einem Abbau von 50 % (t_{50}) (ohne „Lag“-Phase) bei Natriumbenzoat 1-4 bzw. 1-7 Tage. Bei Anilin belief sich t_L auf 0-10 Tage; t_{50} lag bei 1-10 Tagen.

REPRODUZIERBARKEIT UND EMPFINDLICHKEIT DER METHODE

8. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde im Ringtest nachgewiesen (3). Die niedrigste Konzentration des Prüfstoffs, bei der diese Methode noch in Verbindung mit einer DOC-Analyse verwendet werden kann, hängt weitgehend von der Nachweisgrenze bei der Ermittlung des Gehalts an organischen Kohlenstoff (gegenwärtig etwa 0,5 mg C/l) und von der Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs im verwendeten Meerwasser (gewöhnlich 3-5 mg/l bei Proben aus dem offenen Meer) ab. Die Hintergrundkonzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff darf nicht mehr als etwa 20 % der gesamten DOC-Konzentration nach Zugabe des Prüfstoffs betragen. Wenn dies nicht möglich ist, kann die DOC-Hintergrundkonzentration manchmal durch Alterung des Meerwassers vor dem Testen reduziert werden. Wird diese Methode ausschließlich in Verbindung mit bestimmten chemischen Analysen verwendet (um den primären Abbau zu messen), muss der Prüfer anhand zusätzlicher Informationen angeben, ob ein vollständiger Abbau zu erwarten ist. Diese zusätzlichen Informationen können aus den Ergebnissen anderer Tests zum Nachweis einer leichten oder inhärenten biologischen Abbaubarkeit bestehen.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Apparatur

9. Übliche Laborausrüstung und folgende Geräte:
 - a. Schüttelmaschine für 0,5- bis 2-l-Erlenmeyer-Kolben, entweder mit automatischer Temperaturregelung oder zur Verwendung in einem Raum mit konstanter Temperatur von 15-20 °C (geregelt auf $\pm 2^\circ\text{C}$);
 - b. 0,5- bis 2-l-Erlenmeyer-Kolben mit engem Hals;
 - c. Membranfiltrationsgerät oder Zentrifuge;
 - d. Membranfilter, 0,2-0,45 μm ;

- e. Kohlenstoffanalysator;
- f. Ausrüstung für spezifische Analysen (optional).

Meerwasser

10. In einem gründlich gereinigten Behältnis wird eine Meerwasserprobe genommen und möglichst innerhalb von ein bis zwei Tagen nach der Entnahme ins Labor gebracht. Während des Transports darf die Proben temperatur die Testtemperatur nicht erheblich überschreiten. Der Entnahme-Standort ist genau zu bezeichnen und hinsichtlich seines Verschmutzungsgrads und des Nährstoffgehalts zu beschreiben. Insbesondere bei Proben aus Küstengewässern werden zudem die Koloniezahl heterotropher Mikroorganismen und die Konzentrationen an gelöstem Nitrat, Ammonium und Phosphat angegeben.
11. Für die eigentliche Meerwasserprobe sind folgende Informationen anzugeben:
 - Entnahmedatum;
 - Tiefe der Probenahme;
 - Aussehen der Probe – z. B. trüb;
 - Temperatur zum Entnahmezeitpunkt;
 - Salzgehalt;
 - DOC;
 - Zeitspanne zwischen der Probenahme und der Verwendung im Test.
12. Wenn der DOC-Gehalt der Meerwasserprobe zu hoch ist (Nummer 8), wird vor der Verwendung eine Alterung des Meerwassers um etwa eine Woche empfohlen. Die Alterung erfolgt durch Aufbewahrung unter aeroben Bedingungen bei Testtemperatur im Dunkeln oder bei diffuser Beleuchtung. Erforderlichenfalls ist durch mäßige Belüftung Sauerstoff zuzuführen. Bei der Alterung verringert sich der Anteil leicht abbaubaren organischen Materials. Im Ringtest (3) wurden keine Unterschiede zwischen dem Abbaupotenzial gealterter und frisch entnommener Meerwasserproben festgestellt. Vor der Verwendung werden grobe Partikel aus dem Meerwasser abgetrennt (beispielsweise unter Filtration durch einen Nylonfilter oder ein grobes Papier (jedoch keine Membran- und keine GF-C-Filter) oder durch Ausfällen und Dekantieren). Das verwendete Verfahren wird im Bericht vermerkt. Eine Vorbehandlung wird ggf. nach der Alterung durchgeführt.

Stammlösungen mit mineralischen Nährstoffen

13. Die folgenden Stammlösungen werden mit Reagenzien in Analysequalität hergestellt:

Das	(a)	Kaliumdihydrogenorthosphat, KH_2PO_4	8,50 g
		Dikaliummonohydrogenorthosphat, K_2HPO_4	21,75 g
		Dinatriummonohydrogenorthosphat-Dihydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,30 g
		Ammoniumchlorid, NH_4Cl	0,50 g
		In Wasser lösen und mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.	
	(b)	Calciumchlorid, CaCl_2	27,50 g
		In Wasser lösen und mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.	
	(c)	Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
		In Wasser lösen und mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.	
	(d)	Eisen (III)chlorid-Hexahydrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
	In Wasser lösen und mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.		

Ausfällen aus Lösung (d) kann verhindert werden, indem ein Tropfen konzentrierter Chlorwasserstoff oder 0,4 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Dinatriumsalz) pro Liter hinzugegeben werden. Wenn es in einer Stammlösung zu einer Ausfällung kommt, ist die Lösung durch eine frisch hergestellte Lösung zu ersetzen.

Herstellung des Prüfmediums

- Pro Liter vorbehandeltes Meerwasser wird jeweils 1 ml der oben genannten Stammlösungen hinzugegeben.

Inokulum

- Zusätzlich zu den bereits im Meerwasser vorhandenen Mikroorganismen darf kein spezifisches Inokulum hinzugegeben werden. Die Anzahl der koloniebildenden Heterotrophe im Meerwasser-Prüfmedium (sowie vorzugsweise auch in den ursprünglichen Meerwasserproben) wird (beispielsweise durch Plattenzählung mit Meerwasseragar) (fakultativ) bestimmt. Dies ist insbesondere bei Proben aus Küstengewässern oder aus verschmutzten Standorten wünschenswert. Die heterotrophe mikrobiologische Aktivität des Meerwassers wird anhand eines Tests mit einem Referenzstoff geprüft.

Ansetzen der Flaschen

- Um Kontaminationen durch Rückstände aus früheren Tests zu vermeiden, müssen

sämtliche Glasgeräte äußerst sauber (wenn auch nicht unbedingt steril) sein (beispielsweise kann alkoholische Salzsäure verwendet werden) und vor der Verwendung abgewaschen und getrocknet werden. Auch vor der erstmaligen Verwendung sind die Kolben zu reinigen.

17. Die Prüfstoffe werden jeweils in zwei Kolben gleichzeitig zusammen mit einer einzelnen Flasche mit dem Referenzstoff bewertet. Zur Bestimmung des Blindwerts wird ein doppelter Blindtest durchgeführt, bei dem weder der Prüfstoff noch ein Referenzstoff verwendet werden. Die Prüfstoffe werden im Prüfmedium gelöst (einfache Zugabe über eine konzentrierte Stammlösung), um die gewünschten Ausgangskonzentrationen von gewöhnlich 5-40 mg DOC/l zu erhalten. Die Referenzstoffe werden in der Regel bei einer Ausgangskonzentration von 20 mg DOC/l getestet. Wenn Stammlösungen der Prüfstoffe und/oder der Referenzstoffe verwendet werden, ist sicherzustellen, dass der Salzgehalt des Meerwassermediums nicht erheblich verändert wird.
18. Wenn toxische Wirkungen zu erwarten sind oder nicht ausgeschlossen werden können, kann es empfehlenswert sein, im Prüfprotokoll zwei Inhibitionstests vorzusehen. Die Prüfstoffe und die Referenzstoffe werden in das gleiche Gefäß gegeben; um einen Vergleich zu ermöglichen, wird der Referenzstoff gewöhnlich in der gleichen Konzentration wie die Kontrolle (d. h. 20 mg DOC/l) hergestellt.
19. In die Erlenmeyer-Kolben werden gleiche Mengen an Testlösungen gegeben (bewährt hat sich eine Füllung bis etwa zur Hälfte des Fassungsvermögens); anschließend werden die Kolben lose verschlossen (z. B. mit einer Alufolie), damit noch ein Gasaustausch zwischen dem Kolben und der Umgebungsluft stattfinden kann. (Baumwollstopfen sind für DOC-Analysen ungeeignet.) Die Gefäße werden in die Schüttelmaschine gestellt und während des gesamten Tests kontinuierlich mit mäßiger Bewegung (z. B. 100 U/min) geschüttelt. Die Temperatur wird geregelt ($15-20 \pm 2$ °C), und die Gefäße werden vor Lichteinfall geschützt, damit sich keine Algen bilden. Die Umgebungsluft muss frei von toxischen Materialien sein.

Physikalisch-chemische Kontrolle (optional)

20. Wenn ein abiotischer Abbau oder ein Verlust (z. B. aufgrund einer Hydrolyse, die allerdings nur bei bestimmten Analysen vorkommt), eine Verflüchtigung oder eine Adsorption zu erwarten sind, ist anzuraten, eine physikalisch-chemische Kontrolle durchzuführen. Um das Wachstum von Mikroorganismen zu unterbinden, kann Quecksilber(II)-chlorid (HgCl_2)⁽¹⁾ (50-100 mg/l) in die Gefäße mit dem Prüfstoff gegeben werden. Ein erheblicher Rückgang des DOC oder eine spezifische Konzentration eines Stoffes in der physikalisch-chemischen Kontrolle deutet auf abiotische Abbaumechanismen hin. (Wenn Quecksilberchlorid verwendet wird, ist bei der DOC-Analyse auf etwaige Störungen oder die Freisetzung von Katalysatorgiften zu achten.)

⁽¹⁾ Quecksilber(II)-chlorid (HgCl_2) ist ein stark toxischer Stoff, die mit entsprechender Vorsicht zu handhaben ist. Wässrige Abfälle mit dieser Chemikalie sind entsprechend zu entsorgen und dürfen nicht in das Abwassersystem gelangen.

Anzahl der Kolben

21. Bei einem typischen Test werden die folgenden Flaschen verwendet:

- Kolben 1 und 2 – Prüfstoff (Testsuspension);
- Kolben 3 und 4 – nur Meerwasser (Blindprobe);
- Kolben 5 – Referenzstoff (Verfahrenskontrolle);
- Kolben 6 – Prüfstoff und Referenzstoff (Toxizitätskontrolle) - optional;
- Kolben 7 – Prüfstoff und Sterilisationsmittel (abiotische sterile Kontrolle) – optional.

DOC-Analyse

22. Im Laufe des Tests werden in geeigneten Intervallen Proben zur DOC-Analyse entnommen (Anlage 1). Grundsätzlich muss eine Entnahme zu Beginn des Tests (Tag 0) und an Tag 60 erfolgen. Insgesamt werden mindestens fünf Proben benötigt, um den zeitlichen Verlauf des Abbaus beschreiben zu können. Ein bestimmter zeitlicher Rahmen für die Probenahme kann nicht vorgegeben werden, da sich der biologische Abbau von Fall zu Fall unterschiedlich vollzieht. Die DOC-Analyse wird für die einzelnen Proben jeweils doppelt vorgenommen.

Probenahme

23. Das benötigte Probenvolumen hängt von der Analysemethode (spezifische Analyse) sowie vom verwendeten Kohlenstoffanalysator und vom gewählten Verfahren (Membranfiltration oder Zentrifugierung) zur Behandlung der Probe vor der Bestimmung des Kohlenstoffgehalts ab (Nummern 25 und 26). Vor der Probenahme ist sicherzustellen, dass das Prüfmedium gut gemischt wird und dass jegliches an den Wänden der Kolben anhaftende Material gelöst oder suspendiert wird.
24. Unmittelbar nach der Probenahme wird eine Membranfiltration oder eine Zentrifugierung vorgenommen. Erforderlichenfalls werden die gefilterten oder zentrifugierten Proben bis zu 48 Stunden bei 2-4 °C oder über längere Zeiträume bei -18 °C aufbewahrt. (Wenn bekannt ist, dass der Stoff dadurch nicht beeinträchtigt wird, wird die Probe vor der Lagerung auf einen pH-Wert von 2 eingestellt.)
25. Membranfilter (0,2-0,45 µm) können verwendet werden, wenn gewährleistet ist, dass sie bei der Filtration weder Kohlenstoff freisetzen noch den Stoff adsorbieren (z. B. Polycarbonat-Filter). Manche Membranfilter werden mit Tensiden hydrophilisiert und können beträchtliche Mengen an gelöstem Kohlenstoff freisetzen. Diese Filter sind dreimal nacheinander jeweils für eine Stunde in entionisiertem Wasser auszukochen. Nach dem Auskochen werden die Filter in entionisiertem Wasser aufbewahrt. Die ersten 20 ml des Filtrats werden verworfen.
26. Alternativ zur Membranfiltration können die Proben auch zentrifugiert werden. Die Zentrifugierung erfolgt über 15 Minuten bei 40 000 m.s⁻² (~ 4000 g), vorzugsweise in einer Kühlzentrifuge.

Hinweis: Beim Zentrifugieren mit sehr niedrigen Konzentrationen scheint die Unterscheidung zwischen TOC (*Total Organic Carbon* = gesamter organisch gebundener Kohlenstoff) und DOC (*Dissolved Organic Carbon* = gelöster Kohlenstoff) nicht möglich zu sein, da entweder nicht alle Bakterien abgetrennt werden oder da der im Bakterienplasma enthaltene Kohlenstoff wieder gelöst wird. Bei höheren Testkonzentrationen (> 10 mg C/l) scheint der Fehler beim Zentrifugieren verhältnismäßig gering zu sein.

Häufigkeit der Probenahme

27. Wenn Analysen unmittelbar nach der Probenahme vorgenommen werden, richtet sich der Zeitpunkt der nächsten Probenahme nach dem Ergebnis der Analyse.
28. Werden Proben zur Analyse zu einem späteren Zeitpunkt aufbewahrt (Nummer 24), sind mehr als die mindestens erforderlichen fünf Proben zu nehmen. Die zuletzt entnommenen Proben werden zuerst analysiert; indem anschließend „rückwärts“ gezählt weitere Proben für die Analysen ausgewählt werden, kann die Entwicklung des biologischen Abbaus mit verhältnismäßig wenigen Analysen bestimmt werden. Wenn seit dem Ende des Tests kein biologischer Abbau erfolgt ist, brauchen keine weiteren Proben analysiert zu werden. In diesem Fall kann die Strategie der „Rückwärtszählung“ Analysekosten in erheblichem Umfang einsparen.
29. Wenn die Abbaukurve vor Tag 60 ein Plateau erreicht, wird der Test beendet. Hat der Abbau bis zum 60. Tag offensichtlich begonnen, aber noch kein Plateau erreicht, ist der Versuch zu verlängern.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

30. Die Ergebnisse der Analyse werden auf dem beigefügten Datenblatt (Anlage 2) protokolliert; anschließend wird der biologische Abbau des Prüfstoﬀs und der Referenzstoﬀe mit folgender Gleichung ermittelt:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

Dabei sind:

- D_t = Abbau in Prozent DOC oder spezifischer Stoffabbau zum Zeitpunkt t,
- C_0 = Ausgangskonzentration DOC oder des spezifischen Stoﬀs im Prüfmedium,
- C_t = Konzentration DOC oder des spezifischen Stoﬀs im Prüfmedium zum Zeitpunkt t,
- $C_{bl(0)}$ = Ausgangskonzentration DOC oder des spezifischen Stoﬀs in der Blindprobe,
- $C_{bl(t)}$ = Konzentration DOC oder des spezifischen Stoﬀs in der Blindprobe zum Zeitpunkt t,

31. Der Abbau ist als prozentualer Abbau des gelösten organischen Kohlenstoﬀs (vollständiger Abbau) oder als Abbau spezifischer Stoﬀe (primärer Abbau) zum Zeitpunkt t anzugeben. Die DOC-Konzentrationen werden auf 0,1 mg/l berechnet; die

Mittelwerte von D_t werden auf volle Prozentwerte gerundet.

32. Der Verlauf des biologischen Abbaus wird grafisch dargestellt (siehe Abbildung „Validität und Interpretation der Ergebnisse“. Wenn hinreichende Daten vorliegen, werden aus der Kurve die „Lag“-Phase (t_L) und der Zeitpunkt berechnet, zu dem bezogen auf das Ende der „Lag“-Phase ein Abbau um 50 % erreicht ist (t_{50}).

Prüfbericht

33. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfstoff:

- physikalischer Zustand und, soweit relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften.
- Kenndaten;

Prüfbedingungen:

- Lage und Beschreibung des Standorts der Probenahme; Verschmutzungsgrad und Nährstoffgehalt (ggf. Koloniezahl, Nitrat, Ammonium, Phosphat);
- Merkmale der Probe (Datum der Probenahme, Tiefe, Aussehen, Temperatur, Salzgehalt, DOC (optional), Zeitraum zwischen Probenahme und Verwendung im Test;
- verwendete Methode (ggf.) zur Alterung des Meerwassers;
- Methode zur Vorbehandlung (Filtration/Sedimentation) des Meerwassers;
- Methode zur DOC-Bestimmung;
- Ausrüstung für spezifische Analysen (optional);
- Methode zur Bestimmung der Anzahl der Heterotrophen im Meerwasser (Plattenzählung oder alternatives Verfahren) (optional);
- sonstige Methoden (optional) zur Beschreibung des Meerwassers (ATP-Messungen usw.).

Ergebnisse:

- auf einem Datenblatt eingetragene Analysedaten (Anlage 2);
- Der Verlauf des Abbautests wird in einem Diagramm dargestellt, aus dem die „Lag“-Phase (t_L), die Steigung und die Dauer (ab dem Ende der „Lag“-Phase) bis zu einem Abbau von 50 % (t_{50}) hervorgehen. Die „Lag“-Phase kann aufgrund der grafischen Darstellung abgeschätzt (siehe Abbildung im Abschnitt „Validität und Interpretation der Ergebnisse“) oder auch einfach als Dauer bis zu einem Abbau von 10 % angenommen werden.
- nach 60 Tagen oder am Ende des Tests gemessener Abbau in Prozent.

Diskussion der Ergebnisse.

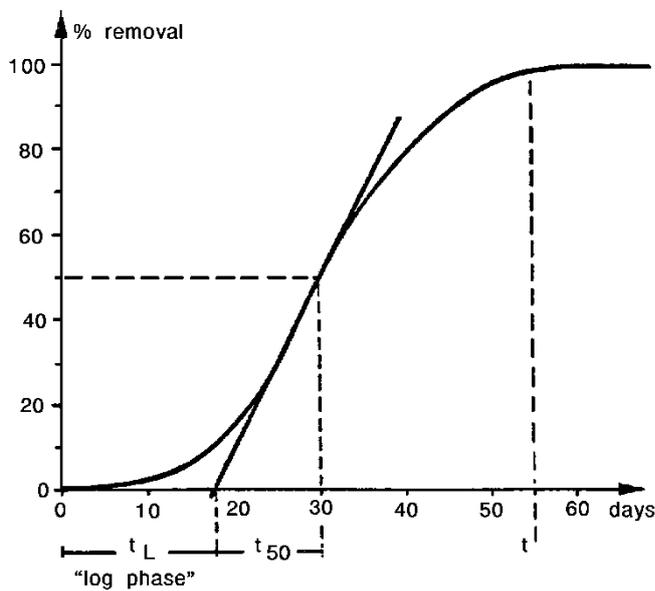
Validität und Interpretation der Ergebnisse

34. Die mit den Referenzstoffen (z. B. Natriumbenzoat, Natriumacetat oder Anilin) ermittelten Ergebnisse müssen den im Ringtest erhaltenen Ergebnissen (3) vergleichbar sein (siehe Abschnitt „Referenzstoffe“, Nummer 7). Wenn mit Referenzstoffen untypische Ergebnisse ermittelt werden, ist der Test mit einer anderen Meerwasserprobe zu wiederholen. Die Ergebnisse von Inhibitionstests sind zwar nicht immer ohne Weiteres zu interpretieren (wegen des vom Prüfstoff ausgehenden DOC-Beitrags); eine signifikante Verringerung des gesamten gelösten Kohlenstoffs

gegenüber der Kontrolle ist jedoch ein klares Anzeichen für toxische Wirkungen.

35. Wegen der verhältnismäßig hohen Testkonzentrationen im Vergleich zu den meisten natürlichen Systemen (und entsprechend einem ungünstigen Verhältnis zwischen den Konzentrationen der Prüfstoffe und sonstiger Kohlenstoffquellen) wird diese Methode als Vorversuch betrachtet, mit dem ermittelt werden kann, ob ein Stoff grundsätzlich leicht biologisch abbaubar ist. Ein niedriges Ergebnis bedeutet daher nicht unbedingt, dass der Prüfstoff in der Meeresumwelt nicht biologisch abbaubar wäre, sondern ist Anzeichen dafür, dass zur Klärung weitere Arbeiten durchgeführt werden müssen.

In der folgenden Abbildung ist beispielhaft ein Versuch zur Ermittlung des theoretischen Abbaus als Möglichkeit zur Abschätzung von t_L (Dauer der „Lag“-Phase) und t_{50} (Zeitdauer ab t_L bis zu einem Abbau von 50 %) dargestellt:



GESCHLOSSENER FLASCHEN-TEST

EINLEITUNG

1. Diese Methode ist eine für Meerwasser angepasste Variante des geschlossenen Flaschen-Tests (5); sie beruht auf einem von der Europäischen Kommission organisierten und vom Dänischen Institut für Wasserqualität durchgeführten Ringtest (3).
2. Wie bei der begleitenden Schüttelmethode sind auch die Ergebnisse dieses Tests nicht als Indikatoren für eine leichte biologische Abbaubarkeit zu betrachten, sondern vielmehr zur Beschaffung weiterer Informationen über die biologische Abbaubarkeit von Stoffen in der Meeresumwelt zu verwenden.

PRINZIP DER METHODE

3. Eine zuvor festgelegte Menge des Prüfstoffs wird im Prüfmedium in einer Konzentration von gewöhnlich 2-10 mg/l gelöst. (Es können eine oder auch mehrere Konzentrationen verwendet werden.) Die Lösung wird in einer geschlossenen Flasche im Dunkeln in einem Bad mit konstanter Temperatur oder in einem Schrank bei einer auf ± 1 °C geregelten Temperatur von 15-20 °C aufbewahrt. Wenn mit der Untersuchung Umweltbedingungen simuliert werden sollen, können die Tests auch außerhalb dieses normalen Temperaturbereichs durchgeführt werden, sofern eine geeignete Temperaturregelung gegeben ist. Der Abbau wird über einen Zeitraum von 28 Tagen mithilfe von Sauerstoffanalysen überwacht.
4. Der Ringtest hat gezeigt, dass eine Ausdehnung des Tests auf mehr als 28 Tage wegen der dann meist auftretenden erheblichen Störungen keine hilfreichen Informationen mehr ergibt. Der biologische Sauerstoffbedarf (BSB) der Blindkontrolle war wahrscheinlich wegen des Wachstums an den Wänden (wegen fehlender Schüttelung) und aufgrund der Nitrifikation übermäßig hoch. Daher wird eine Dauer von 28 Tagen empfohlen. Wenn jedoch der BSB-Wert einen Anteil von 30 % nicht übersteigt (Nummern 15 und 40), kann der Test auch über einen längeren Zeitraum fortgesetzt werden.

INFORMATIONEN ZUM PRÜFSTOFF

5. Um festzustellen, welcher Test bei einem bestimmten Stoff durchzuführen ist, müssen einige Merkmale des Stoffes bekannt sein. Die empirische Formel wird benötigt, um den theoretischen Sauerstoffbedarf (ThSB) zu berechnen (siehe Anlage 3). Sonst ist als Referenzwert der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) des jeweiligen Stoffes zu bestimmen. Die Verwendung des CSB ist weniger zufriedenstellend, da manche Stoffe beim CSB-Test nicht vollständig oxidieren.
6. Die Löslichkeit des Stoffes muss mindestens bei 2 mg/l liegen, wenngleich grundsätzlich auch weniger lösliche Stoffe (z. B. unter Ultraschallbehandlung) und flüchtige Stoffe getestet werden könnten. Informationen zur Reinheit oder zu den relativen Anteilen wesentlicher Bestandteile des Prüfstoffs werden benötigt, damit die

Testergebnisse entsprechend interpretiert werden können. Dies gilt insbesondere bei sehr knappen Testergebnissen.

7. Informationen über die Toxizität des Prüfstoffs für Bakterien (beispielsweise gemessen anhand von Kurzzeit-Atemfrequenztests (4)) können für die Wahl geeigneter Testkonzentrationen sehr hilfreich und für die korrekte Auswertung niedriger Abbaubarkeitswerte ausschlaggebend sein. Diese Informationen sind jedoch nicht immer hinreichend für die Interpretation der Ergebnisse von Tests zur Prüfung der biologischen Abbaubarkeit; eher geeignet ist gegebenenfalls das in Nummer 27 beschriebene Verfahren.

REFERENZSTOFFE

8. Zur Prüfung der mikrobiologischen Aktivität der Meerwasserproben sind geeignete Referenzstoffe zu verwenden. Geeignet sind beispielsweise Anilin, Natriumacetat und Natriumbenzoat. Diese Stoffe müssen in einer angemessenen kurzen Zeitspanne zu mindestens 60 % (ihres jeweiligen ThSB) abgebaut werden; ansonsten sollte der Test mit einer anderen Meerwasserprobe wiederholt werden.
9. Im Ringtest der Europäischen Kommission, bei dem Meerwasserproben an unterschiedlichen Standorten und zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Laufe eines Jahres genommen wurden, betragen die „Lag“-Phase (t_L) und die Zeitdauer bis zu einem Abbau von 50 % (t_{50}) (ohne „Lag“-Phase) bei Natriumbenzoat 0-2 bzw. 1-4 Tage. Für Anilin betragen t_L und t_{50} 0-7 bzw. 2-12 Tage.

REPRODUZIERBARKEIT

10. Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde im Ringtest der Europäischen Kommission nachgewiesen (3).

BESCHREIBUNG DER METHODE

Apparatur

11. Übliche Laborausrüstung und folgende Geräte:
 - (a) 250-300 ml-BSB-Flaschen mit Glasstopfen oder 250-ml-Flaschen mit engem Hals und mit Glasstopfen;
 - (b) mehrere 2-, 3- und 4-l-Flaschen mit Literteilung zur Vorbereitung des Versuchs und zum Füllen der BSB-Flaschen;
 - (c) Wasserbad oder Raum mit konstanter Temperatur zur Aufbewahrung der Flaschen bei einer konstanten Temperatur ($\pm 1^\circ\text{C}$) unter Lichtabschluss;
 - (d) Ausrüstung zur Analyse des gelösten Sauerstoffs;

- (e) Membranfilter, 0,2-0,45 µm (optional);
- (f) Ausrüstung für spezifische Analysen (optional).

Meerwasser

12. Eine Meerwasserprobe wird in einem gründlich gereinigten Behältnis genommen und möglichst innerhalb von ein bis zwei Tagen nach der Entnahme ins Labor gebracht. Während des Transports darf die Proben temperatur die Testtemperatur nicht erheblich überschreiten.
13. Der Entnahme-Standort ist genau zu bezeichnen und hinsichtlich seines Verschmutzungsgrads und des Nährstoffgehalts zu beschreiben. Insbesondere bei Proben aus Küstengewässern und bei verschmutzten Gewässern werden zudem die Koloniezahl heterotropher Mikroorganismen und die Konzentrationen an gelöstem Nitrat, Ammonium und Phosphat angegeben.
14. Für die eigentliche Meerwasserprobe sind folgende Informationen anzugeben:
 - Entnahmedatum;
 - Tiefe der Probenahme;
 - Aussehen der Probe – z. B. trüb;
 - Temperatur zum Entnahmezeitpunkt;
 - Salzgehalt;
 - gelöster organischer Kohlenstoff (DOC = *Dissolved organic Carbon*);
 - Zeitspanne zwischen der Probenahme und der Verwendung im Test.
15. Wenn der DOC-Gehalt der Probe zu hoch ist oder wenn vermutet wird, dass der BSB der Blindkontrolle nach 28 Tagen mehr als 30 % über dem BSB des Referenzstoffes liegt, wird vor der Verwendung eine Alterung des Meerwassers um etwa eine Woche empfohlen.
16. Die Alterung der Probe erfolgt durch Aufbewahrung unter aeroben Bedingungen bei Testtemperatur im Dunkeln oder bei diffuser Beleuchtung. Erforderlichenfalls ist Sauerstoff durch mäßige Belüftung zuzuführen. Bei der Alterung verringert sich der Anteil leicht abbaubaren organischen Materials. Im Ringtest (3) wurden keine Unterschiede zwischen dem Abbaupotenzial gealterter und frisch entnommener Meerwasserproben festgestellt.
17. Vor der Verwendung werden grobe Partikel aus dem Meerwasser abgetrennt (beispielsweise unter Filtration durch einen Nylonfilter oder ein grobes Papier (jedoch keine Membran oder GF-C-Filter) oder durch Ausfällen und Dekantieren). Das verwendete Verfahren ist zu protokollieren. Vor der Alterung (wenn vorgesehen) wird eine Vorbehandlung vorgenommen.

Stammlösungen mit mineralischen Nährstoffen

18. Die folgenden Stammlösungen werden mit Reagenzien in Analysequalität hergestellt:

(a) Kaliumdihydrogenorthosphat, KH_2PO_4 8,50 g

	Dikaliummonohydrogenorthosphat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriummonohydrogenorthosphat-Dihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,30 g
	Ammoniumchlorid, NH_4Cl	0,50 g
	In Wasser lösen und mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.	
(b)	Calciumchlorid, $CaCl_2$	27,50 g
	In Wasser lösen und mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.	
(c)	Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	22,50 g
	In Wasser lösen und mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.	
(d)	Eisen(III)chlorid-Hexahydrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	In Wasser lösen und mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen.	

Das Ausfällen aus der Lösung (d) kann verhindert werden, indem ein Tropfen konzentrierter Chlorwasserstoff oder 0,4 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Dinatriumsalz) pro Liter hinzugegeben werden. Wenn es in einer Stammlösung zu einer Ausfällung kommt, ist die Lösung durch eine frisch hergestellte Lösung zu ersetzen.

Herstellung des Prüfmediums

19. Pro Liter vorbehandeltes Meerwasser wird jeweils 1 ml der oben genannten Stammlösungen hinzugegeben. Das Prüfmedium wird mit Luft (auf Testtemperatur) gesättigt, indem es etwa 20 Minuten mit sauberer Druckluft belüftet wird. Danach wird die Konzentration des gelösten Sauerstoffs für Kontrollzwecke ermittelt. Die gesättigte Konzentration an gelöstem Sauerstoff in Abhängigkeit vom Salzgehalt und von der Temperatur kann dem dieser Prüfmethode beigegeführten Nomogramm entnommen werden (Anlage 4).

Inokulum

20. Zusätzlich zu den bereits im Meerwasser vorhandenen Mikroorganismen darf kein spezifisches Inokulum hinzugegeben werden. Die Anzahl der koloniebildenden Heterotrophe im Meerwasser-Prüfmedium (sowie vorzugsweise auch in der ursprünglichen Meerwasserprobe) wird (beispielsweise durch Plattenzählung mit Meerwasseragar) (fakultativ) bestimmt. Dies ist insbesondere bei Proben aus Küstengewässern oder aus verschmutzten Standorten wünschenswert. Die heterotrophe mikrobiologische Aktivität des Meerwassers wird anhand eines Tests mit einem Referenzstoff geprüft.

Ansetzen der Testflaschen

21. Alle erforderlichen Schritte einschließlich des Alterns und der Vorbehandlung des Meerwassers sind bei der gewählten Testtemperatur im Bereich von 15-20 °C durchzuführen; die verwendeten Glasgeräte müssen sauber sein, brauchen aber nicht sterilisiert zu werden.
22. Zur Bestimmung des BSB der Prüfstoffe und der Referenzstoffe werden mehrere Gruppen von BSB-Flaschen für gleichzeitige Versuchsreihen vorbereitet. Sämtliche Analysen sind an jeweils zwei Flaschen (Blindkontrollen, Referenzstoffe und Prüfstoffe) vorzunehmen (d. h. für jede Messung jeweils zwei Flaschen). Die Analysen werden mindestens an den Tagen 0, 5, 15 und 28 vorgenommen (4 Messungen). Für die Analysen des Sauerstoffbedarfs werden insgesamt $3 \times 2 \times 4 = 24$ Flaschen (Blindprobe, Referenzstoff und Prüfstoff) und entsprechend etwa 8 l Prüfmedium (pro Konzentration des Prüfstoffs) benötigt.
23. Von den Prüfstoffen und den Referenzstoffen werden in großen Flaschen mit hinreichendem Fassungsvermögen (siehe Nummer 11) getrennte Lösungen hergestellt, indem die Prüfstoffe bzw. die Referenzstoffe zunächst entweder direkt oder über eine konzentrierte Stammlösung in die teilweise gefüllten großen Flaschen gegeben werden. Danach wird weiteres Prüfmedium hinzugefügt, bis die gewünschte Endkonzentration erreicht ist. Wenn Stammlösungen der Prüfstoffe und/oder der Referenzstoffe verwendet werden, ist sicherzustellen, dass der Salzgehalt des Meerwassermediums nicht erheblich verändert wird.
24. Bei der Auswahl der Prüfstoffe und der Referenzstoffe sind die folgenden Punkte zu berücksichtigen:
 - (a) die Löslichkeit des gelösten Sauerstoffs im Meerwasser bei der jeweiligen Testtemperatur und beim jeweiligen Salzgehalt (siehe beigefügtes Nomogramm, Anlage 4);
 - (b) der BSB der Blindprobe des Meerwassers und
 - (c) der erwartete biologische Abbau des Prüfstoffs.
25. Bei einer Temperatur von 15 °C bzw. 20 °C und einem Salzgehalt von 32 ppm (Meerwasser) liegt die Löslichkeit des gelösten Sauerstoffs etwa bei 8,1 bzw. 7,4 mg/l. Der Sauerstoffbedarf des eigentlichen Meerwassers (Sauerstoffzehrung der Blindprobe) kann 2 mg O₂/l oder mehr betragen, wenn das Meerwasser nicht gealtert ist. Um eine signifikante Sauerstoffkonzentration nach der Oxidation des Prüfstoffs sicherzustellen, wird bei Stoffen, bei denen (ebenso wie bei den Referenzstoffen) unter den Testbedingungen ein vollständiger Abbau erwartet wird, mit einer Ausgangskonzentration des Prüfstoffs von etwa 2-3 mg/l (je nach ThSB) begonnen. Weniger leicht abbaubare Stoffe werden mit höheren Konzentrationen (bis zu etwa 10 mg/l) getestet, wenn keine toxischen Wirkungen eintreten. Es kann vorteilhaft sein, Tests gleichzeitig mit einer niedrigen (ca. 2 mg/l) und einer hohen (ca. 10 mg/l) Konzentration des Prüfstoffs durchzuführen.
26. Parallel muss eine Sauerstoff-Kontrolle in Flaschen geprüft werden, die weder den Prüfstoff noch einen Referenzstoff enthalten.

27. Wenn Inhibitionswirkungen festgestellt werden sollen, sind die folgenden Reihen von Lösungen in getrennten großen Flaschen herzustellen (Nummer 13):

- (a) 2 mg/l eines leicht abbaubaren Stoffs (z. B. eine der genannten Referenzstoffe);
- (b) x mg/l Prüfstoff (x ist gewöhnlich 2);
- (c) 2 mg/l leicht abbaubarer Stoff und x mg/l Prüfstoff.

Physikalisch-chemische Kontrolle (optional)

28. Wenn spezifische Analysen durchgeführt werden sollen, kann mit einem physikalisch-chemischen Versuch geprüft werden, ob der Prüfstoff durch abiotische Mechanismen (z. B. Hydrolyse oder Adsorption) abgebaut wird. Um das Wachstum von Mikroorganismen zu unterbinden, wird Quecksilber(II)-chlorid (HgCl_2)⁽¹⁾ (50-100 mg/l) in zwei Gefäße mit dem Prüfstoff gegeben. Ein erheblicher Rückgang der Konzentration des spezifischen Stoffs im Laufe des Tests ist Anzeichen für die Wirkung abiotischer Abbaumechanismen.

Anzahl der BSB-Flaschen bei einem typischen Testdurchlauf

29. Bei einem typischen Test werden die folgenden Flaschen verwendet:

- mindestens 8 Flaschen mit dem Prüfstoff,
- mindestens 8 Flaschen mit Meerwasser, das nur mit Nährstoffen angereichert wurde,
- mindestens 8 Flaschen mit dem Referenzstoff und (erforderlichenfalls)
- 6 Flaschen mit Prüfstoffen und Referenzstoffen (zur Toxizitätskontrolle).

VERFAHREN

30. Nach der Herstellung werden die einzelnen Lösungen umgehend aus dem unteren Viertel (aber nicht ganz vom Boden) der jeweiligen großen Flasche abgesaugt, um die entsprechende Gruppe von BSB-Flaschen zu füllen. Unmittelbar danach wird der Anteil des gelösten Sauerstoffs in den Null-Kontrollen (d. h. den Kontrollen zum Zeitpunkt 0) geprüft (Nummer 33), oder die Kontrollen werden für eine chemische Analyse durch Ausfällung mit MnCl_2 (Mangan(II)-chlorid) und NaOH (Natriumhydroxid) aufbewahrt.

31. Die übrigen parallelen BSB-Flaschen werden bei Testtemperatur (15-20 °C) im Dunkeln inkubiert; in regelmäßigen Zeitabständen werden sie aus dem Inkubationsbereich genommen (mindestens z. B. nach 5, 15 und 28 Tagen) und auf den Anteil an gelöstem Sauerstoff geprüft (Nummer 33).

32. Die Proben werden 15 Minuten lang einer Membranfiltration (0,2-0,45 μm)

⁽¹⁾ Quecksilber(II)-chlorid (HgCl_2) ist ein stark toxischer Stoff, die mit entsprechender Vorsicht zu handhaben ist. Wässrige Abfälle mit dieser Chemikalie sind entsprechend zu entsorgen und dürfen nicht unmittelbar in das Abwassersystem gelangen.

unterzogen oder zentrifugiert, um spezifische Analysen durchzuführen (optional). Werden die Analysen nicht unmittelbar danach durchgeführt, sind die gefilterten oder zentrifugierten Proben bis zu 48 Stunden bei 2-4 °C oder über längere Zeiträume bei -18 °C aufzubewahren. (Wenn bekannt ist, dass der Prüfstoff dadurch nicht beeinträchtigt wird, wird die Probe vor der Lagerung auf einen pH-Wert von 2 eingestellt.)

Bestimmung der Konzentration des gelösten Sauerstoffs

33. Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs wird mit einer national oder international anerkannten chemischen oder elektrochemischen Methode ermittelt.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

34. Die Analyseergebnisse werden auf den beigelegten Datenblättern protokolliert (Anlage 5).
35. Der BSB wird als Unterschied zwischen dem Sauerstoffabbau einer Blindprobe und einer Lösung des Prüfstoffs unter den Testbedingungen ermittelt. Der Nettoabbau des Sauerstoffs wird durch die Konzentration (w/w) des jeweiligen Stoffs geteilt, um den BSB als mg BSB/mg Prüfstoff auszudrücken. Als Abbau wird das Verhältnis des biochemischen Sauerstoffbedarfs entweder (vorzugsweise) zum theoretischen Sauerstoffbedarf (ThSB) oder zum chemischen Sauerstoffbedarf (CSB) in Prozent bezeichnet (siehe Nummer 36).
36. Der biologische Abbau wird für die Prüfstoffe und die Referenzstoffe bezogen auf die einzelnen Zeitpunkte der Probenahme mit einer der folgenden Gleichungen ermittelt:

$$\% \text{ biologischer Abbau} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg Prüfstoff}}{\text{mg ThOD}/\text{mg Prüfstoff}} \times 100$$

$$\% \text{ biologischer Abbau} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg Prüfstoff}}{\text{mg COD}/\text{mg Prüfstoff}} \times 100$$

Dabei sind:

ThSB = theoretischer Sauerstoffbedarf (Berechnung, Anlage 3)

CSB = chemischer Sauerstoffbedarf; experimentell zu bestimmen

Hinweis: Manchmal führen zwei Berechnungsmethoden (prozentualer ThSB oder prozentualer CSB) zu unterschiedlichen Ergebnissen. In diesen Fällen ist vorzugsweise vom ThSB auszugehen, da manche Stoffe im CSB-Test nicht vollständig oxidiert werden.

37. Der Verlauf des Tests zum biologischen Abbau wird grafisch dargestellt (siehe z. B. Abbildung „Validität und Interpretation der Ergebnisse“. Wenn hinreichende Daten vorliegen, werden aus der Kurve die „Lag“-Phase (t_L) und der Zeitpunkt berechnet, zu dem bezogen auf das Ende der „Lag“-Phase ein Abbau um 50 % erreicht ist (t_{50}).

38. Wenn spezifische Analysen durchgeführt werden (optional), ist der prozentuale primäre Abbau als Prozentanteil des Abbaus eines spezifischen Stoffs während der Testdauer (bereinigt um Blindproben) anzugeben.

Prüfbericht

39. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfstoff:

- physikalischer Zustand und, soweit relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften.
- Kenndaten;

Prüfbedingungen:

- Lage und Beschreibung des Standorts der Probenahme; Verschmutzungsgrad und Nährstoffgehalt (ggf. Koloniezahl, Nitrat, Ammonium, Phosphat);
- Merkmale der Probe (Datum der Probenahme, Tiefe, Aussehen, Temperatur, Salzgehalt, DOC (optional), Zeitraum zwischen Probenahme und Verwendung im Test;
- verwendete Methode (ggf.) zur Alterung des Meerwassers;
- Methode zur Vorbehandlung (Filtration/Sedimentation) des Meerwassers;
- Methode zur CSB-Bestimmung (wenn durchgeführt);
- Methode für die Sauerstoffmessungen;
- Verfahren zur Dispergierung von unter den Testbedingungen schlecht löslichen Stoffen;
- Methode zur Bestimmung der Anzahl der Heterotrophen im Meerwasser (Plattenzählung oder alternatives Verfahren);
- Methode zur Bestimmung des Meerwasser-DOC (optional);
- Ausrüstung für spezifische Analysen (optional);
- sonstige optionale Methoden zur Beschreibung des Meerwassers (ATP-Messungen usw.).

Ergebnisse:

- auf einem Datenblatt eingetragene Analysedaten (beigefügt, Anlage 5);
- der Verlauf des Abbautests wird in einem Diagramm dargestellt, aus dem die „Lag“-Phase (t_L), die Steigung und die Dauer (ab dem Ende der „Lag“-Phase) bis zu einem Anteil von 50 % der durch die Oxidation des Prüfstoffs bewirkten endgültigen Sauerstoffzehrung (t_{50}) hervorgehen. Die „Lag“-Phase kann aufgrund der grafischen Darstellung (in der beigefügten Abbildung) abgeschätzt werden oder einfach auch aufgrund des Zeitintervalls für einen Abbau um 10 % ermittelt werden;
- prozentualer Abbau, gemessen nach 28 Tagen.

Diskussion der Ergebnisse.

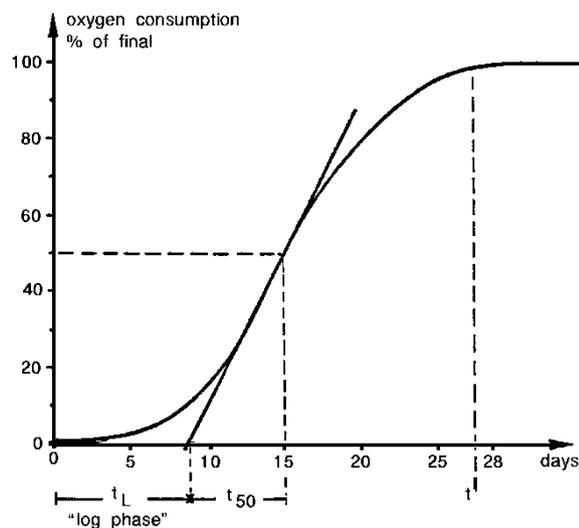
Validität und Interpretation der Ergebnisse

40. Die Sauerstoffzehrung der Blindprobe muss sich auf 30 % des Sauerstoffs in der Testflasche beschränken. Wenn dieses Kriterium mit frisch entnommenem Meerwasser nicht erfüllt werden kann, muss das Meerwasser vor der Verwendung altern (stabilisiert werden).
41. Zu berücksichtigen ist, dass stickstoffhaltige Stoffe die Ergebnisse beeinträchtigen

können.

42. Mit den Referenzstoffen Natriumbenzoat und Anilin ermittelte Ergebnisse müssen mit den Ergebnissen des Ringtests (3) (Nummer 9) vergleichbar sein. Wenn mit Referenzstoffen untypische Ergebnisse ermittelt werden, ist der Test mit einer anderen Meerwasserprobe zu wiederholen.
43. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Prüfstoff das Bakterienwachstum (bei der verwendeten Konzentration) hemmt, wenn der BSB des Referenzstoffs und des Prüfstoffs geringer ist als die Summe der BSB-Werte der getrennten Lösungen der beiden Stoffe.
44. Wegen der verhältnismäßig hohen Testkonzentrationen im Vergleich zu den meisten natürlichen Systemen (und entsprechend einem ungünstigen Verhältnis zwischen den Konzentrationen des Prüfstoffs und sonstiger Kohlenstoffquellen) wird diese Methode als Vorversuch betrachtet, mit dem ermittelt werden kann, ob ein Stoff grundsätzlich leicht biologisch abbaubar ist. Ein niedriges Ergebnis bedeutet entsprechend nicht unbedingt, dass der Prüfstoff in der Meeresumwelt nicht biologisch abbaubar wäre, sondern ist Anzeichen dafür, dass zur Klärung weitere Arbeiten durchgeführt werden müssen.

In der folgenden Abbildung ist beispielhaft ein Versuch zur Ermittlung des theoretischen Abbaus als Möglichkeit zur Abschätzung von t_L (Dauer der „Lag“-Phase) und t_{50} (Zeitdauer ab t_L bis zu einem Anteil von 50 % der endgültigen Sauerstoffzehrung infolge der Oxidation des Prüfstoffs) dargestellt:



LITERATUR

- (1) de Kreuk J.F., und Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. *Chemosphere*, 10 (6); 561-573.
- (2) Kapitel C.4-B in diesem Anhang: Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit, Teil III, Modifizierter OECD-Screening-Test.
- (3) Nyholm N., und Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, März 1987, Kommission der Europäischen Gemeinschaften.
- (4) Kapitel C.11 in diesem Anhang: Biologische Abbaubarkeit – Belebtschlamm-Atmungshemmungstest
- (5) Kapitel C.4-E in diesem Anhang: Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit, Teil IV: Geschlossener Flaschen-Test.

Anlage 1

BESTIMMUNG DES GEHALTS AN ORGANISCHEM KOHLENSTOFF IN MEERWASSER

SCHÜTTELMETHODE

Zur Ermittlung des Anteils an organischem Kohlenstoff in einer Wasserprobe werden die organischen Bestandteile der Probe mit einem der folgenden Verfahren zu Kohlendioxid oxidiert:

- Nassoxidation durch Persulfat/UV-Bestrahlung;
- Nassoxidation durch Persulfat/höhere Temperatur (116-130 °C);
- Verbrennung.

Die Menge des entstandenen CO₂ wird durch Infrarotspektromie oder Titrimetrie ermittelt. Alternativ wird das CO₂ zu Methan reduziert; dieses wird auf einem Flammenionisations-Detektor (FID) quantifiziert.

Die Methode mit Persulfat/UV-Bestrahlung ist bei der Analyse von „sauberem“ Wasser mit geringem Partikelgehalt allgemein üblich. Die beiden letztgenannten Methoden können bei den meisten Wasserproben angewendet werden; die Methode der Oxidation mit Persulfat und einer höheren Temperatur ist besonders für Proben mit niedriger Konzentration geeignet, und die Verbrennung empfiehlt sich für Verfahren mit nicht flüchtigen organischen Kohlenstoffen (NVOC = *Non-Volatile Organic Carbon*) in einer Konzentration von deutlich über 1 mg C/l.

Störungen

Bei allen drei Verfahren muss in den Proben vorhandener anorganischer Kohlenstoff entfernt oder kompensiert werden. Die für die Entfernung von anorganischem Kohlenstoff am häufigsten verwendete Methode ist die Ausschleusung von CO₂, auch wenn dabei flüchtige organische Verbindungen verloren gehen (1). Die vollständige Entfernung oder Kompensation des anorganischen Kohlenstoffs ist für jede einzelne Probenmatrix sicherzustellen; je nach Probentyp muss zusätzlich zum NVOC der Anteil an flüchtigem Kohlenstoff (VOC = *Volatile Organic Carbon*) bestimmt werden.

Hohe Chloridkonzentrationen beeinträchtigen die Wirksamkeit der Oxidation mit der Persulfat-/UV-Methode (2). Mit einem durch Zusatz von Quecksilber-(II)-nitrat modifizierten Oxidationsreagens kann diese Störung jedoch verhindert werden. Zur Untersuchung der verschiedenen Typen chloridhaltiger Proben sollte das maximal zulässige Probenvolumen verwendet werden. Hohe Salzkonzentrationen der mit der Verbrennungsmethode analysierten Proben können zur Bildung einer Salzsäure des Katalysators und zu übermäßiger Korrosion des Verbrennungsrohrs führen. Daher sind die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen gemäß den Herstelleranweisungen (Handbuch) zu treffen.

Stark getrübe Proben sowie Proben mit Partikelmaterial oxidieren mit der Persulfat-/UV-Methode unter Umständen nicht vollständig.

Beispiel einer geeigneten Methode

Der Anteil an nicht flüchtigem organischem Kohlenstoff wird durch Oxidation mit Persulfat/UV-Bestrahlung und anschließende Quantifizierung des entstandenen CO₂ durch nichtdispersive Infrarotspektromie ermittelt.

Das Oxidationsreagens wird nach den Vorschlägen in (2) und gemäß den Herstelleranweisungen modifiziert:

a) 8,2 g HgCl₂ und 9,6 g Hg(NO₃)₂·H₂O werden in mehreren Hundert Millilitern Reagenzwasser mit niedriger Kohlenstoffkonzentration gelöst.

b) 20 g K₂S₂O₈ werden in Quecksilbersalzlösung gelöst.

c) 5 ml HNO₃ (konz.) werden zum Gemisch hinzugegeben.

d) Das Reagens wird auf 1000 ml verdünnt.

Die Störung durch das Chlorid wird unterbunden, indem für 10%iges Chlorid ein Probenvolumen von 40 µl und für 1,9%iges Chlorid ein Probenvolumen von 200 µl verwendet wird: Proben mit hohen Chloridkonzentrationen und/oder größere Probenvolumina können mit dieser Methode analysiert werden, wenn eine Chloridakkumulation im Oxidationsgefäß verhindert wird. Anschließend kann (wenn für den betreffenden Probenotyp von Bedeutung) der Anteil an flüchtigem organischem Kohlenstoff ermittelt werden.

LITERATUR

(1) ISO, Water quality - determination of total organic carbon. Draft International Standard ISO/DIS 8245, 16. Januar 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association & Water Pollution Control Federation, 16th edition, 1985.

Ebenfalls von Interesse (Beschreibung eines automatischen Analysesystems):

(3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, 137-142.

Anlage 2

BIOLOGISCHER ABBAU IN MEERWASSER

SCHÜTTELMETHODE

DATENBLATT

1. LABOR:

2. DATUM DES TESTBEGINNS:

3. PRÜFSTOFF:

Name:

Konzentration der Stammlösung: mg/l als Stoff

Ausgangskonzentration im Medium, t_0 : mg/l als Stoff

: mg DOC/l

4. MEERWASSER:

Herkunft:

Entnahmedatum:

Tiefe der Probenahme:

Aussehen zum Entnahmezeitpunkt (z. B. trüb):

Salzgehalt bei Entnahme: ‰

Temperatur bei Entnahme: °C

DOC „x“ Stunden nach der Entnahme: mg/l

Vorbehandlung vor dem Test (Filtration, Sedimentation, Alterung usw.):

Mikrobenkoloniezahl - ursprüngliche Probe: Kolonien/ml

- zu Beginn des Tests: Kolonien/ml

Sonstige Merkmale:

5. ERMITTLUNG DES KOHLENSTOFFGEHALTS:

Kohlenstoffanalysator:

	Kolben Nr.		DOC nach n Tagen (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Test: mit Nährstoffen angereichertes Meerwasser mit Prüfstoff	1	a1					
		a2					
		mittlere C _{a(t)}					
	2	b1					
		b2					
		mittlere C _{b(t)}					
Blindprobe: mit Nährstoffen angereichertes Meerwasser ohne Prüfstoff	1	c ₁					
		c ₂					
		mittlere C _{c(t)}					
	2	d ₁					
		d ₂					
		mittlere C _{d(t)}					
	<i>mittlere C_{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$</i>						

6. EVALUIERUNG DER ROHDATEN:

Kolben Nr.	Berechnung der Ergebnisse:	% Abbau nach n Tagen				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
2	$D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$	0				
Mittelwert (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

* Bei erheblichen Unterschieden darf kein Mittelwert aus D₁ und D₂ gebildet werden.

Hinweis: Ähnliche Formate können bei Durchführung einer spezifischen Analyse sowie für die Referenzstoffe und für Toxizitätskontrollen verwendet werden.

7. ABIOTISCHER ABBAU (optional)

	Zeit (Tage)	
	0	T
Konzentration DOC (mg/l) in steriler Kontrolle	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ abiotischer Abbau} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

Anlage 3

BERECHNUNG DES THEORETISCHEN BIOCHEMISCHEN SAUERSTOFFBEDARFS

GESCHLOSSENER FLASCHEN-TEST

Der ThSB des Stoffs $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ mit der Molekülmasse MW wird wie folgt berechnet:

$$ThOD_{NH_3} = \frac{16[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o]}{MW}$$

Diese Berechnung geht davon aus, dass C in CO_2 , H in H_2O , P in P_2O_5 und Na in Na_2O umgewandelt wird. Halogene werden zu Halogenwasserstoff und Stickstoff zu Ammoniak abgebaut.

Beispiel:

Glucose $C_6H_{12}O_6$, $MW = 180$

$$ThOD = \frac{16(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6)}{180} = 1.07 \text{ mg } O_2/\text{mg Glukose}$$

Die Molekülmassen von Salzen (mit Ausnahme der Alkalimetalle) werden unter der Annahme berechnet, dass die Salze durch Hydrolyse aufgelöst wurden.

Es wird angenommen, dass Schwefel bis auf Stufe +6 oxidiert wurde.

Beispiel:

Natrium n-dodecylbenzolsulfonat $C_{18}H_{29}SO_3Na$, $MW = 348$

$$ThOD = \frac{16(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3)}{348} = 2.34 \text{ mg } O_2/\text{mg Stoff}$$

Bei stickstoffhaltigen Stoffen kann der Stickstoff entsprechend dem jeweiligen theoretischen biochemischen Sauerstoffbedarf zu Ammoniak, Nitrit oder Nitrat abgebaut werden.

$$ThOD_{NO_2} = \frac{16[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o]}{MW}$$

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2n} + \frac{5}{2p} + \frac{1}{2na} - o]}{MW}$$

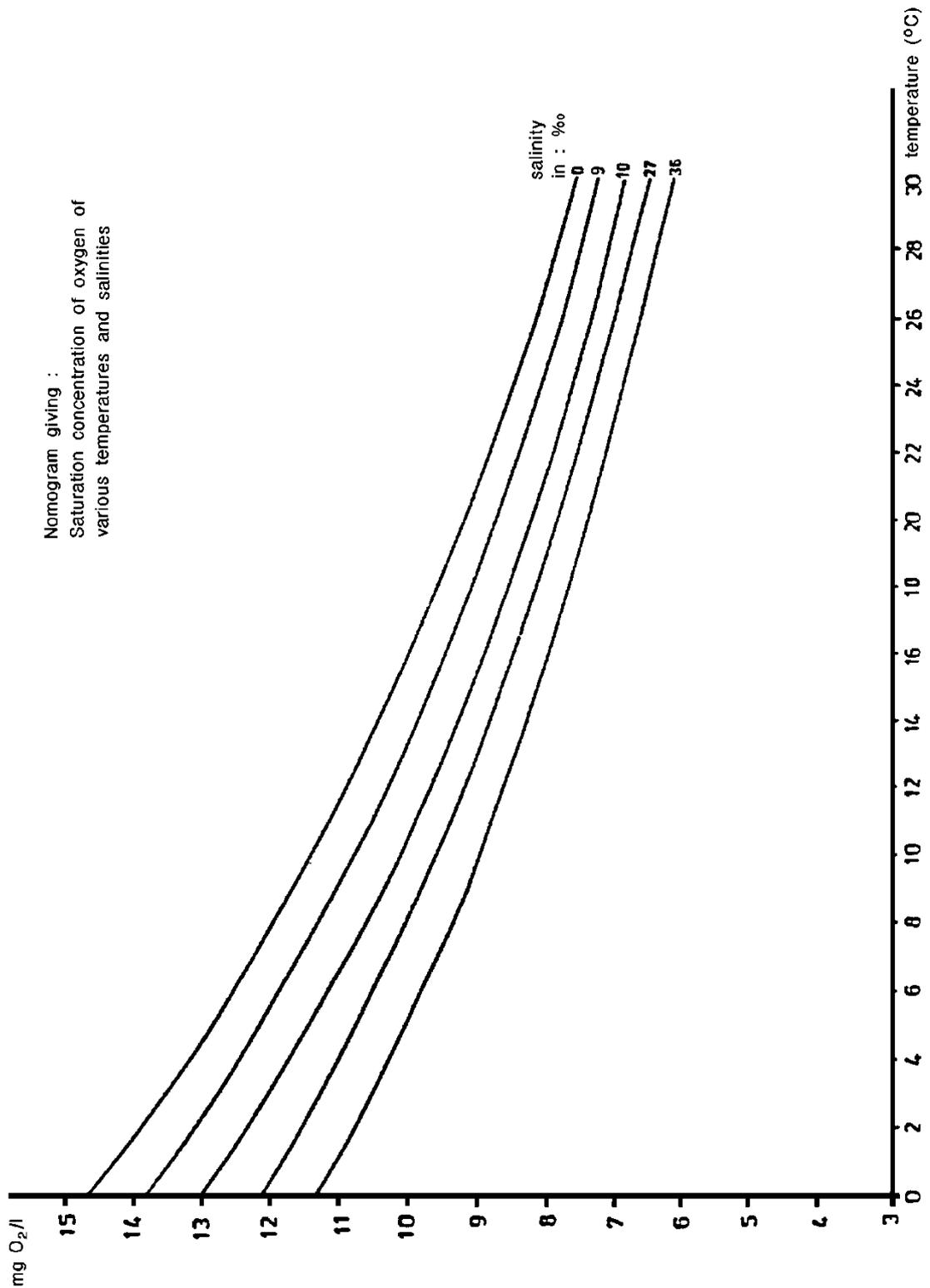
Annahme: Bei einem sekundären Amin wurde durch Analyse eine vollständige Nitratbildung festgestellt:

$(C_{12}H_{25})_2NH$, $MW = 353$

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2})}{353} = 3.44 \text{ mg } O_2/\text{mg Stoff}$$

Anlage 4

Nomogram giving :
Saturation concentration of oxygen of
various temperatures and salinities



ANLAGE 5

BIOLOGISCHER ABBAU IN MEERWASSER

GESCHLOSSENER FLASCHEN-TEST

DATENBLATT

1. LABOR:

2. DATUM DES TESTBEGINNS:

3. PRÜFSTOFF:

Name:

Konzentration der Stammlösung: mg/l

Ausgangskonz. in Meerwassermedium: mg/l

ThSB oder CSB: mg O₂/mg Prüfstoff

4. MEERWASSER:

Herkunft:

Entnahmedatum:

Tiefe der Probenahme:

Aussehen zum Entnahmezeitpunkt (z. B. trüb):

Salzgehalt bei Entnahme: ‰

Temperatur bei Entnahme: °C

DOC „x“ Stunden nach der Entnahme: mg/l

Vorbehandlung vor dem Test (Filtration, Sedimentation, Alterung usw.):

Mikrobenkoloniezahl – ursprüngliche Probe: Kolonien/ml

– zu Beginn des Tests: Kolonien/ml

Sonstige Merkmale:

5. PRÜFMEDIUM:

Temperatur nach Belüftung: °C

O₂-Konzentration nach Belüftung und
Stand vor Beginn des Tests: mg O₂/l

6. BESTIMMUNG DES GELÖSTEN SAUERSTOFFS:

Methode: Winkler/Elektrode

	Kolben Nr.		mg O ₂ /l nach n Tagen			
			0	5	15	28
Test: Nährstoff - angereichertes Meerwasser mit Prüfstoff	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Mittelwert Blindkontrolle	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				
Blindprobe: Nährstoff - angereichertes Meerwasser ohne Prüfstoff	1	c ₁				
	2	c ₂				
	Mittelwert Test	$m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$				

Hinweis: Ein ähnliches Format kann für den Referenzstoff und für die Toxizitätskontrollen verwendet werden.

7. ABBAU DES GELÖSTEN SAUERSTOFFS (DO): PROZENTUALER ABBAU (% D):

	DO-Abbau nach n Tagen		
	5	15	28
$(m_b - m_t)^{(1)}$			
$\%D = \frac{(m_b - m_t)^{(1)}}{\text{Prüfstoff (mg/l)} \times ThOD} \times 100$			

⁽¹⁾ Es wird angenommen $m_{b(0)} = m_{t(0)}$, Dabei sind:
 $m_{b(0)}$ = Wert der Blindprobe an Tag 0,
 $m_{t(0)}$ = Wert des Prüfstoffs an Tag 0.

Wenn $m_{b(0)}$ nicht gleich $m_{t(0)}$ ist, wird $(m_{t(0)} - m_{t(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$ angenommen.
Dabei sind:

$m_{b(x)}$ = Wert der Blindprobe an Tag x,

$m_{t(x)}$ = Wert des Prüfstoffs an Tag x.

C.43. Anaerobe biologische Abbaubarkeit organischer Stoffe in Klärschlamm: Bestimmung durch Messung der Gasproduktion

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 311 (2006). Es gibt eine Reihe von Screening-Tests zur Bewertung der aeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe (Prüfmethoden C.4, C.9, C.10 und C.11 (1) und OECD-Prüfrichtlinie TG 302C (2)). Aufgrund der Ergebnisse dieser Tests konnten die Persistenz und das Verhalten von Stoffen in der aeroben Umgebung, insbesondere in den aeroben Stufen der Abwasserbehandlung, prognostiziert werden. Außerdem werden im Abwasser vorhandene Anteile von Ausfällungen wasserunlöslicher Stoffe sowie Anteile von Stoffen, die sich auf in Abwässern enthaltene Feststoffe adsorbieren, aerob umgewandelt. Die größeren Fraktionen dieser Stoffe sind jedoch an den primär ausgefällten Schlamm gebunden, der in den Absetzbecken vom Rohabwasser getrennt wird, bevor das Sediment bzw. der Überstand aerob umgewandelt werden. Der Schlamm, in dem diese löslichen Stoffe teilweise im Interstitialwasser enthalten sind, wird dann zur anaeroben Umwandlung in die beheizten Faulbehälter geführt. Bislang gibt es in dieser Reihe noch keine Tests zur Beurteilung der anaeroben biologischen Abbaubarkeit in anaeroben Faulbehältern; der hier beschriebene Test soll nun diese Lücke schließen. Auf andere anoxische Umweltbereiche ist der Test nicht unbedingt übertragbar.
2. Respirometrische Verfahren zur Messung der Mengen der produzierten Gase – vorwiegend Methan (CH_4) und Kohlendioxid (CO_2) – wurden unter anaeroben Bedingungen erfolgreich zur Bewertung der anaeroben biologischen Abbaubarkeit genutzt. Birch et al. (3) haben diese Verfahren untersucht und betrachten die auf früheren Studien (5)(6)(7) beruhende Arbeit von Shelton und Tiedje (4) als die umfassendste Untersuchung. Die von anderen (8) weiterentwickelte Methode (4) hat sich in den USA als Standard etabliert (9)(10); mit dieser Methode wurden die Probleme im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Löslichkeiten von CO_2 und CH_4 im Prüfmedium und in Verbindung mit der Berechnung der theoretischen Gasproduktion eines Prüfstoffs aber nicht gelöst. Im ECETOC-Bericht (3) wurde die zusätzliche Messung des gelösten anorganischen Kohlenstoffs ($\text{DIC} = \text{Dissolved Inorganic Carbon}$) der überstehenden Flüssigkeit empfohlen; dadurch wurde das Verfahren in größerem Umfang einsetzbar. Die ECETOC-Methode wurde einer internationalen Kalibrierungsuntersuchung (einem Ringtest) unterzogen und zur ISO-Norm 11734 entwickelt (11).
3. Die hier beschriebene Prüfmethode beruht auf ISO 11734 (11) und besteht aus einem Untersuchungsverfahren zur Bewertung der potenziellen anaeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe unter bestimmten Gegebenheiten (d. h. in einem anaeroben Faulbehälter zu einem bestimmten Zeitpunkt und mit verschiedenen Konzentrationen von Mikroorganismen). Da ein verdünnter Schlamm mit verhältnismäßig hoher Konzentration des Prüfstoffs verwendet wird und da die Testdauer in der Regel nicht mit der Retentionszeit in anaeroben Faulbehältern übereinstimmt, decken sich die Testbedingungen nicht unbedingt mit den Bedingungen in anaeroben Faulbehältern; außerdem kann der Test unter anderen Umgebungsbedingungen nicht zur Beurteilung der anaeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe verwendet werden. Der Schlamm wird dem Prüfstoff

bis zu 60 Tage lang ausgesetzt; dieser Zeitraum ist länger als die normale Retentionszeit des Schlammes (25-30 Tage) in anaeroben Faulbehältern; in Industrieanlagen können die Retentionszeiten unter Umständen allerdings erheblich länger sein. Die Schätzungen aufgrund der Ergebnisse dieses Tests sind weniger zuverlässig als beim aeroben biologischen Abbau, denn die Fakten, die über das Verhalten von Prüfstoffen in Tests zur „leichten“ biologischen Abbaubarkeit und in Simulationstests sowie über die aerobe Umgebung gewonnen wurden, reichen aus, um von einem Zusammenhang ausgehen zu können. Für anaerobe Umgebungen liegen wenig vergleichbare Erfahrungen vor. Ein vollständiger anaerober biologischer Abbau kann als erfolgt betrachtet werden, wenn 75-80 % der theoretischen Gasproduktion erreicht sind. Aufgrund der hohen Konzentrationen des Prüfstoffs im Vergleich zur Biomasse in diesen Tests kann davon ausgegangen werden, dass ein Stoff, der als abbaubar eingestuft wird, umso wahrscheinlicher auch in einem anaeroben Faulbehälter abgebaut wird. Wenn Stoffe im Test nicht in Gas umgewandelt werden, kann daraus allerdings nicht geschlossen werden, dass eine Persistenz zwangsläufig auch bei realistischeren Umweltbedingungen (Konzentration Stoff: Biomasse) gegeben wäre. Außerdem kommt es zu weiteren anaeroben Reaktionen, durch die Stoffe mindestens teilweise abgebaut werden können (z. B. durch Dechlorierung); diese Reaktionen werden mit diesem Test aber nicht nachgewiesen. Mit spezifischen Analysemethoden zum Nachweis des Prüfstoffs kann auch der Abbau des Prüfstoffs überwacht werden (siehe Nummern 6, 30, 44 und 53).

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

4. Gewaschener Faulschlamm¹ mit niedrigen (<10 mg/l) Konzentrationen an anorganischem Kohlenstoff wird etwa zehnfach auf eine Feststoffkonzentration von insgesamt 1-3 g/l verdünnt und bis zu 60 Tage bei 35 °C ± 2 °C in verschlossenen Gefäßen mit dem Prüfstoff in einer Konzentration von 20-100 mg C/l inkubiert. Um die Aktivität des Schlammes zu berücksichtigen, werden parallel Blindkontrollen mit einem Schlamm-Inokulum (aber ohne den Prüfstoff) im Medium geprüft.
5. Der durch die Kohlendioxid- und Methanproduktion verursachte Druckanstieg im Kopfraum der Gefäße wird gemessen. Das erzeugte CO₂ wird unter Testbedingungen zu einem erheblichen Teil in der flüssigen Phase gelöst oder in Karbonat oder Hydrogencarbonat umgewandelt. Dieser Anteil an anorganischem Kohlenstoff wird am Ende des Tests gemessen.
6. Der Kohlenstoffanteil (anorganisch und Methan) infolge des biologischen Abbaus des Prüfstoffs wird aus der Netto-Gasproduktion und der Netto-Produktion an anorganischem Kohlenstoff in der flüssigen Phase berechnet, die über die Produktion in der Blindkontrolle hinausgeht. Der Umfang des biologischen Abbaus wird aus dem insgesamt produzierten anorganischen Kohlenstoff und dem Methan-C als

¹ Faulschlamm besteht aus einem Gemisch der ausgefallenen Phasen des Abwassers und Belebtschlamm, das in einem anaeroben Faulbehälter bei etwa 35 °C inkubiert wurde, um die Biomasse und Geruchsbelästigungen zu reduzieren und die Entwässerbarkeit des Schlammes zu verbessern. Das Gemisch besteht aus anaeroben fermentativen Bakterien und methanogenen Bakterien, die Kohlendioxid und Methan erzeugen (11).

Prozentanteil des gemessenen oder berechneten Anteils des als Prüfstoff hinzugefügten Kohlenstoffs ermittelt. Der Verlauf des biologischen Abbaus kann verfolgt werden, indem sofort (ausschließlich) die Gasproduktion gemessen wird. Außerdem kann durch spezifische Analysen zu Beginn und am Ende des Tests der primäre biologische Abbau ermittelt werden.

INFORMATIONEN ZUM PRÜFSTOFF

7. Die Reinheit, die Wasserlöslichkeit, die Flüchtigkeit und das Adsorptionsverhalten des Prüfstoffs müssen bekannt sein, damit die Ergebnisse angemessen ausgewertet werden können. Der Gehalt des Prüfstoffs an organischem Kohlenstoff (Gew.-%) muss entweder aufgrund ihrer chemischen Struktur oder aus Messungen bekannt sein. Bei flüchtigen Prüfstoffen bietet eine gemessene oder berechnete Henry-Konstante einen Anhaltspunkt dafür, ob der Test durchgeführt werden kann. Angaben über die Toxizität des Prüfstoffs gegenüber anaeroben Bakterien sind wichtig für die Auswahl einer geeigneten Prüfkonzentration und die Auslegung der Ergebnisse bei geringem Abbau. Es wird empfohlen, eine Hemmkontrolle vorzusehen, außer wenn bekannt ist, dass der Prüfstoff keine Hemmung der Aktivität anaerober Mikroorganismen bewirkt (siehe Nummer 21 und ISO 13641-1 (12)).

ANWENDBARKEIT DER PRÜFMETHODE

8. Die Prüfmethode kann bei wasserlöslichen Stoffen angewendet werden. Bei schlecht löslichen und nicht löslichen Stoffen ist sie anwendbar, wenn ein exaktes Dosierverfahren verwendet wird (siehe z. B. ISO 10634 (13)). Bei flüchtigen Stoffen ist im Allgemeinen im Einzelfall zu entscheiden. Beispielsweise müssen unter Umständen besondere Maßnahmen getroffen werden, damit während des Tests kein Gas freigesetzt wird.

REFERENZCHEMIKALIEN

9. Um das Verfahren zu prüfen, wird eine Referenzchemikalie getestet; dazu werden im Rahmen der normalen Testdurchläufe parallel geeignete Gefäße bereitgestellt. Beispiele sind etwa Phenol, Natriumbenzoat und Polyethylenglykol 400; bei diesen Stoffen wäre innerhalb von 60 Tagen ein Abbau um mehr als 60 % der theoretischen Gasproduktion (Methan und anorganischer Kohlenstoff) zu erwarten (3)(14).

REPRODUZIERBARKEIT VON TESTERGEBNISSEN

10. In einem internationalen Ringtest (14) wurde eine gute Reproduzierbarkeit bei Gasdruckmessungen in Replikaten mit drei Gefäßen festgestellt. Die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) lag überwiegend unter 20 %; allerdings stieg dieser Wert in Verbindung mit toxischen Stoffen sowie gegen Ende der 60-tägigen Inkubationsdauer häufig auf über 20 %. Stärkere Abweichungen wurden auch bei Gefäßen mit einem Fassungsvermögen von <150 ml festgestellt. Die endgültigen pH-Werte der Prüfmedien lagen zwischen 6,5 und 7,0.

11. Im Ringtest wurden folgende Ergebnisse ermittelt:

Prüfstoff	Daten insg. n1	Mittlerer Abbau (bezogen auf die Gesamtdaten) (%)	Relative Standardabweichung (bezogen auf die Gesamtdaten) (%)	Gültige Daten n2	Mittlerer Abbau (gültige Daten) (%)	Relative Standardabweichung (gültige Daten) (%)	Daten > 60 % Abbau in gültigen Tests n3
Palmitinsäure	36	68,7 + 30,7	45	27	72,2 + 18,8	26	19 = 70 %*
Polyethylen Glycol 400	38	79,8 + 28,0	35	29	77,7 + 17,8	23	24 = 83 %*

* Anteil n₂

12. Die Variationskoeffizienten des Mittelwerts aller mit Palmitinsäure und Polyethylenglykol 400 ermittelten Werte lagen bei 45 % (n = 36) bzw. 35 % (n = 38). Wenn Werte von < 40 % und > 100 % übergangen werden (wobei erstere auf suboptimale Bedingungen und letztere auf unbekannte Gründe zurückgeführt wurden), reduzierten sich die Variationskoeffizienten auf 26 % bzw. 23%. Die Anteile „gültiger“ Werte (Abbau von mindestens 60 %) betrugen 70 % bei Palmitinsäure und 83 % bei Polyethylenglykol 400. Der aus dem Anteil an gelöstem anorganischem Kohlenstoff ermittelte prozentuale biologische Abbau war verhältnismäßig gering, aber unterschiedlich. Bei Palmitinsäure bewegte der Wert sich bei 0-35 % (Mittelwert 12 %) bei einem Variationskoeffizienten von 92 %; für Polyethyleneglykol 400 wurden 0-40 % (Mittelwert 24 %) bei einem Variationskoeffizienten von 54 % ermittelt.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Apparatur

13. Benötigt werden die übliche Laborausstattung sowie die folgenden Geräte und Hilfsmittel:

- a. Inkubator – funktionsfähig und auf $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ geregelt
- b. Druckbeständige Glasgefäße mit geeigneter Nenngröße,¹ jeweils mit einem gasdichten Septum, das bis zu etwa 2 bar druckbeständig ist; der Kopfraum muss etwa 10-30 % des Gesamtvolumens betragen. Wenn regelmäßig Biogas freigesetzt wird, sind ca. 10 % Kopfraum angemessen. Wird das Gas aber erst am Ende des Tests freigesetzt, werden 30 % benötigt. Wenn bei jeder Probenahme der Druck abgebaut wird, sind gläserne Serumflaschen mit einem nominellen Inhalt von 125 ml, einem tatsächlichen Volumen von etwa 160 ml, mit Serumseptum² und gepressten

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; mehrere im Handel erhältliche Septa sind nämlich nicht hinreichend dicht gegenüber Methan, und manche Septa bleiben nicht dicht, wenn sie unter

- Aluminiumringen zu empfehlen;
- c. Druckmesser,¹ angepasst zur Messung und zum Ablassen des erzeugten Gases, beispielsweise ein handgeführter Präzisionsdruckmesser, der mit einer geeigneten Spritzenadel verbunden wurde; ein gasdichtes 3-Wege-Ventil erleichtert das Ablassen des überschüssigen Drucks (Anlage 1). Das Innenvolumen der Leitung und des Ventils des Druckaufnehmers muss möglichst gering sein, damit Fehler infolge der Vernachlässigung des Volumens der Ausrüstung nicht erheblich ins Gewicht fallen;
 - Hinweis – Die Druckwerte werden direkt zur Berechnung des erzeugten Kohlenstoffs im Kopfraum verwendet (Nummern 42-44). Alternativ können aus den angezeigten Druckwerten mithilfe eines Umrechnungsdiagramms die Volumina des (bei 35 °C, Atmosphärendruck) erzeugten Gases ermittelt werden. Das Diagramm wird ausgehend von Daten erstellt, die nach Injektion bekannter Volumina an Stickstoffgas bei 35 +/- 2 °C in verschiedene Prüfgefäße (z. B. Serumflaschen) nach Stabilisierung der Druckanzeigen ermittelt wurden (siehe Anlage 2). Die durchzuführende Berechnung wird im Hinweis in Nummer 44 erläutert.
 - Achtung! – Mikrospritzen sind vorsichtig zu handhaben, damit es nicht zu Stichverletzungen kommt.
 - d. Kohlenstoffanalysator, geeignet für die direkte Bestimmung des Gehalts an anorganischem Kohlenstoff im Bereich 1-200 mg/l;
 - e. Präzisionspritzen für Gas- und Flüssigproben;
 - f. Magnetrührer und Rührfische (optional);
 - g. Glove-Box (empfohlen).

Reagenzien

14. Im gesamten Test sind ausschließlich Reagenzien in Analysequalität zu verwenden.

Wasser

15. Destilliertes oder entionisiertes Wasser (dessen Sauerstoffkonzentration durch Besprühen mit Stickstoffgas auf weniger als 5 µl/l reduziert wurde) mit weniger als 2 mg/l gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC).

Prüfmedium

16. Das Verdünnungsmedium wird so vorbereitet, dass die folgenden Bestandteile in den jeweils genannten Anteilen enthalten sind:

den Bedingungen dieses Versuchs mit einer Nadel durchstochen werden.

¹ Das Gerät ist regelmäßig entsprechend den Herstelleranweisungen zu verwenden und zu kalibrieren. Wenn ein Druckmesser der vorgeschriebenen Qualität verwendet wird (z. B. gekapselt mit einer Stahlmembran), ist eine Kalibrierung im Labor nicht mehr erforderlich. Die Genauigkeit der Kalibrierung kann im Labor durch eine punktuelle Messung bei 1×10^5 Pa anhand eines Druckmessers 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 Kalibrierung über den gesamten Bereich zu empfehlen.

Wasserfreies Kaliumdihydrogenorthosphat (KH_2PO_4)	0,27 g
Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1,12 g
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	0,53 g
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,075 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
Eisen(II)-Chloridtetrahydrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	0,02 g
Resazurin (Sauerstoffindikator)	0,001 g
Natriumsulfid-Nonahydrat ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)	0,10 g
Stammlösung mit Spurenelementen (optional, Nummer 18)	10 ml.
Desoxygeniertes Wasser wird hinzugegeben (Nummer 15).	auf 1 l

Hinweis: Um eine hinreichende Reduktionsfähigkeit zu gewährleisten, ist frisches Natriumsulfid zu verwenden oder das zu verwendende Natriumsulfid vor der Verwendung zu waschen und zu trocknen. Der Test kann auch ohne Glove-Box durchgeführt werden (siehe Nummer 26). In diesem Fall ist die Endkonzentration im Medium auf 0,20 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ zu erhöhen. Natriumsulfid kann auch aus einer geeigneten anaeroben Stammlösung durch das Septum der verschlossenen Prüfgefäße gegeben werden, da bei diesem Verfahren das Oxidationsrisiko verringert wird. Statt Natriumsulfid kann Titan-(III)-citrat verwendet werden; der Stoff ist durch das Septum der verschlossenen Prüfgefäße bis zu einer Endkonzentration von 0,8-1,0 mmol/l hinzuzugeben. Titan-(III)-citrat ist ein hoch wirksames Reduziermittel mit geringer Toxizität, das wie folgt hergestellt wird: 2,94 g Trinatriumcitrat-Dihydrat wird in 50 ml desoxygeniertem Wasser gelöst (bis zu einer Konzentration von 200 mmol/l); anschließend werden 5 ml einer 15%igen (w/v) Titan-(III)-chlorid-Lösung hinzugegeben. Mit Natriumcarbonat wird der pH-Wert mit mineralischem Alkali auf $7 \pm 0,2$ eingestellt; danach wird die Lösung unter einem Stickstoff-Gasstrom in ein geeignetes Gefäß gegeben. Die Konzentration des Titan-(III)-citrats in dieser Stammlösung beträgt 164 mmol/l.

17. Die Bestandteile des Prüfmediums mit Ausnahme des Reduziermittels (Natriumsulfid bzw. Titan-(III)-citrat) werden gemischt; anschließend wird die Lösung unmittelbar vor der Verwendung etwa 20 Minuten lang mit Stickstoffgas besprüht, um den vorhandenen Sauerstoff abzubauen. Danach wird unmittelbar vor der Verwendung des Mediums eine geeignete Menge an frisch hergestellter Lösung des Reduziermittels (mit desoxygeniertem Wasser zubereitet) hinzugegeben. Das Medium wird erforderlichenfalls mit verdünnter Mineralsäure oder Lauge auf einen pH-Wert von $7 \pm 0,2$ eingestellt.

Stammlösung mit Spurenelementen (optional)

18. Das Prüfmedium sollte die folgenden Spurenelemente enthalten, um anaerobe Abbauprozesse insbesondere bei niedrigen Inokulum-Konzentrationen (z. B. 1 g/l) zu unterstützen (11):

Manganchlorid-Tetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	50 mg
Borsäure (H_3BO_3)	5 mg
Zinkchlorid (ZnCl_2)	5 mg

Kupfer(II)-chlorid (CuCl ₂)	3 mg
Dinatriummolybdat-Dihydrat (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	1 mg
Kobaltchlorid-Hexahydrat (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	100 mg
Nickelchlorid-Hexahydrat (NiCl ₂ ·6H ₂ O)	10 mg
Dinatriumselenit (Na ₂ SeO ₃)	5 mg
Desoxygeniertes Wasser wird hinzugegeben (Nummer 15).	auf 1 l

Prüfstoff

19. Der Prüfstoff wird als Stammlösung, Suspension oder Emulsion oder unmittelbar als Feststoff oder Flüssigkeit oder absorbiert auf Glasfaserfilter bis zu einer Konzentration von höchstens 100 mg/l organischem Kohlenstoff hinzugegeben. Wenn Stammlösungen verwendet werden, ist mit Wasser (Nummer 15) (das zuvor durch Besprühen mit Stickstoffgas desoxygeniert wurde) eine geeignete Lösung in einer Konzentration herzustellen, bei der das hinzugefügte Volumen weniger als 5 % des Gesamtvolumens des Reaktionsgemischs ausmacht. Die Stammlösung kann erforderlichenfalls auf einen pH-Wert von $7 \pm 0,2$ eingestellt werden. Bei in Wasser nicht hinreichend löslichen Prüfstoffen ist ISO 10634 (13) zu beachten. Wenn ein Lösungsmittel verwendet wird, muss eine zusätzliche Kontrolle hergestellt werden, bei der ausschließlich das Lösungsmittel zum geimpften Medium hinzugegeben wird. Organische Lösungsmittel, die erfahrungsgemäß die Methanproduktion hemmen (z. B. Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff), sind zu vermeiden.

Achtung! – Toxische Prüfstoffe und Prüfstoffe mit unbekanntem Eigenschaften sind mit Vorsicht zu handhaben.

Referenzstoffe

20. Referenzstoffe wie z. B. Natriumbenzoat, Phenol und Polyethylenglykol 400 sind innerhalb von 60 Tagen zu mehr als 60 % abbaubar und haben sich zur Prüfung des Verfahrens bewährt. Von dem ausgewählten Referenzstoff wird auf die gleiche Weise wie für den Prüfstoff eine Stammlösung (in desoxygeniertem Wasser) hergestellt; die Stammlösung ist erforderlichenfalls auf einen pH-Wert von $7 \pm 0,2$ einzustellen.

Inhibitionskontrolle (bedingt)

21. Um Informationen über die Toxizität des Prüfstoffs für anaerobe Mikroorganismen zu erhalten und entsprechend die am besten geeignete Testkonzentration zu ermitteln, werden der Prüfstoff und der Referenzstoff in ein Gefäß mit dem Prüfmedium gegeben (siehe Nummer 16); dabei sind jeweils die gleichen Konzentrationen hinzuzufügen (siehe Nummern 19 und 20 und ISO 13641-1 (12)).

Faulschlamm

22. Der Faulschlamm wird aus einem Faulbehälter einer Kläranlage entnommen, in der

vorwiegend häusliche Abwässer aufbereitet werden. Der Schlamm muss vollständig beschrieben werden; entsprechende Hintergrundinformationen sind zu protokollieren (siehe Nummer 54). Wenn ein modifiziertes Inokulum verwendet werden soll, kann der Faulschlamm auch aus einer Anlage zur Klärung von Industrieabwässern entnommen werden. Zur Entnahme des Faulschlammes werden Flaschen mit weitem Hals aus hochdichtem Polyethylen oder ähnlichem dehnbarem Material verwendet. Der Schlamm wird bis zu einer Höhe von etwa 1 cm unter der Oberkante in die Flaschen gegeben; anschließend werden die Flaschen luftdicht verschlossen – vorzugsweise mit einem Druckventil. Nach der Beförderung ins Labor kann der entnommene Schlamm entweder sofort verwendet oder in einen Laborkocher gegeben werden. Überschüssiges Biogas wird unter vorsichtigem Öffnen der Flaschen freigesetzt. Alternativ kann im Labor gereifter anaerober Schlamm als Inokulum verwendet werden; in diesem Fall kann das Aktivitätsspektrum allerdings beeinträchtigt sein.

Achtung! – Faulschlamm erzeugt entzündbare Gase; die Gase können verbrennen oder eine Explosion verursachen. Außerdem enthalten die Gase potenziell pathogene Organismen. Daher sind beim Umgang mit Faulschlamm entsprechende Vorsichtsmaßnahmen zu treffen. Aus Sicherheitsgründen dürfen zur Entnahme des Schlammes keine Glasgefäße verwendet werden.

23. Um die Entstehung von Hintergrundgas zu vermeiden und um den Einfluss der Blindkontrollen zu reduzieren, kann eine Vorfaulung des Schlammes in Betracht gezogen werden. Wenn eine Vorfaulung erforderlich ist, muss die Faulung ohne Zugabe von Nährstoffen oder Substraten über einen Zeitraum von höchstens 7 Tagen bei einer Temperatur von 35 ± 2 °C erfolgen. Mit einer Vorfaulung von etwa 5 Tagen wird (Erfahrungen mit einer geringen Anzahl an Stoffen zufolge) gewöhnlich eine optimale Reduzierung der Gasproduktion der Blindkontrolle ohne unannehmbare Erhöhung der „Lag“-Phase oder der Inkubationszeiten im Test und ohne Beeinträchtigung der Aktivität erzielt.
24. Bei biologisch nur schwer abbaubaren Prüfstoffen bzw. bei Prüfstoffen, bei denen davon ausgegangen wird, dass sie biologisch schwer abzubauen sind, kann eine Vorexposition des Schlammes gegenüber dem Prüfstoff vorgenommen werden, um ein besser angepasstes Inokulum zu erhalten. In diesem Fall ist der Prüfstoff mit einer Konzentration von 5-20 mg/l an organischem Kohlenstoff in den Faulschlamm zu geben und bis zu 2 Wochen zu inkubieren. Nach dieser Vorexposition ist der Schlamm vor der Verwendung sorgfältig zu waschen (siehe Nummer 25); im Prüfprotokoll werden die Bedingungen der Vorexposition vermerkt.

Inokulum

25. Unmittelbar vor der Verwendung wird der Schlamm gewaschen (siehe Nummern 22 bis 24), um die Konzentration an anorganischem Kohlenstoff in der endgültigen Testsuspension auf weniger als 10 mg/l zu reduzieren. Der Schlamm wird in verschlossenen Röhrchen zentrifugiert (z. B. 5 Minuten mit 3000 g); anschließend wird der Überstand entsorgt. Das entstandene Pellet wird in desoxygeniertem Medium (Nummern 16 und 17) suspendiert. Danach wird die Suspension nochmals zentrifugiert und wiederum die überstehende Flüssigkeit abgegossen. Wenn der Anteil an anorganischem Kohlenstoff nicht ausreichend verringert wurde, kann der Waschvorgang noch höchstens zweimal wiederholt werden. Dadurch scheint die

Aktivität der Mikroorganismen nicht beeinträchtigt zu werden. Schließlich wird das Pellet auf das benötigte Volumen des Prüfmediums suspendiert und die Konzentration der Gesamtfeststoffe ermittelt (siehe z. B. ISO 11923 (15)). Die Endkonzentration der Gesamtfeststoffe in den Prüfgefäßen muss bei 1-3 g/l (oder ca. 10 % der Konzentration des nicht verdünnten Faulschlamm) liegen. Die vorstehenden Schritte sind so durchzuführen, dass der Schlamm möglichst wenig mit Sauerstoff in Berührung kommt (beispielsweise, indem in einer Stickstoffatmosphäre gearbeitet wird).

PRÜFVERFAHREN

26. Zunächst sind die folgenden Schritte mit Verfahren durchzuführen, bei denen der Faulschlamm möglichst wenig mit Sauerstoff in Berührung kommt. Beispielsweise kann die Verwendung einer Glove-Box in einer Stickstoffatmosphäre und/oder eine Stickstoffspülung der Flaschen erforderlich sein (4).

Vorbereitung der Prüfgefäße und der Kontrollen

27. Es werden jeweils mindestens drei Prüfgefäße (siehe Nummer 13-b) für den Prüfstoff, die Blindkontrollen, den Referenzstoff und die Inhibitionskontrollen (bedingt) sowie Kammern mit Druckregelung (optionales Verfahren) vorbereitet (siehe Nummern 7 und 19-21). Außerdem können Gefäße zur Prüfung des primären biologischen Abbaus mit für den jeweiligen Prüfstoff spezifischen Analysen vorbereitet werden. Innerhalb eines Tests können für mehrere Prüfstoffe dieselben Blindkontrollen verwendet werden, sofern die Kopfraumvolumina einheitlich sind.
28. Das verdünnte Inokulum wird hergestellt und in die Gefäße gegeben (beispielsweise mit einer Pipette mit großer Öffnung). Aliquoten des gut gemischten Inokulums (Nummer 25) werden hinzugegeben, bis in allen Gefäßen die gleiche Konzentration an Gesamtfeststoffen besteht (1-3 g/l). Stammlösungen des Prüfstoffs und des Referenzstoffs werden erforderlichenfalls auf einen pH-Wert von $7 \pm 0,2$ eingestellt und hinzugefügt. Der Prüfstoff und der Referenzstoff sind in der jeweils am besten geeigneten Weise hinzuzugeben (Nummer 19).
29. Die Testkonzentration an organischem Kohlenstoff liegt gewöhnlich zwischen 20 und 100 mg/l (Nummer 4). Wenn der Prüfstoff toxisch ist, wird die Testkonzentration auf 20 mg C/l reduziert; diese Konzentration kann noch unterschritten werden, wenn mit speziellen Analysen nur der primäre biologische Abbau ermittelt werden soll. Bei niedrigeren Testkonzentrationen kommt es allerdings zu größeren Unterschieden zwischen den Testergebnissen.
30. In die Gefäße mit den Blindkontrollen ist anstelle einer Stammlösung, Suspension oder Emulsion eine entsprechende Menge der zur Dosierung des Prüfstoffs verwendeten Trägerlösung hinzuzugeben. Wenn der Prüfstoff absorbiert auf einem Glasfaserfilter oder mit organischen Lösungsmitteln hinzugegeben wurde, ist auch bei den Blindkontrollen ein Filter zu verwenden bzw. eine den verdunsteten Lösungsmitteln entsprechende Menge hinzuzugeben. Zur Messung des pH-Werts wird ein zusätzliches Replikat mit dem Prüfstoff hergestellt. Das Medium ist erforderlichenfalls mit geringen Mengen an verdünnter Mineralsäure oder Lauge auf einen pH-Wert von $7 \pm 0,2$ einzustellen. In alle Prüfgefäße wird die gleiche Menge an Neutralisierungsmitteln gegeben. Diese Zugaben dürften allerdings nicht erforderlich

sein, weil der pH-Wert der Stammlösungen des Prüfstoffs und des Referenzstoffs bereits eingestellt wurde (siehe Nummern 19 und 20). Wenn der primäre biologische Abbau gemessen werden soll, ist eine geeignete Probe aus dem Gefäß zur pH-Kontrolle oder aus einem zusätzlichen Prüfgefäß zu entnehmen; die Konzentration des Prüfstoffs ist dann mit spezifischen Analysen zu messen. In alle Gefäße können beschichtete Magnetrührstäbchen gegeben werden, wenn die Reaktionsgemische umgerührt werden sollen (optional).

31. Das Gesamtvolumen der Flüssigkeit V_1 und das Volumen des Kopfraums V_h müssen in allen Gefäßen gleich sein. Die Werte für V_1 und V_h sind zu messen und zu protokollieren. Die Gefäße werden mit gasdichten Septa verschlossen und in der Glove-Box (siehe Nummer 26) in den Inkubator gestellt (siehe Nummer 13-a).

Nicht lösliche Prüfstoffe

32. Wenn Stoffe in Wasser schwer löslich sind, werden die betreffenden Mengen direkt in die vorbereiteten Gefäße eingewogen. Muss ein Lösungsmittel verwendet werden (siehe Nummer 19), wird die Lösung oder Suspension mit dem Prüfstoff in die leeren Gefäße gegeben. Wenn möglich, wird das Lösungsmittel verdampft, indem Stickstoffgas durch die Gefäße geleitet wird; anschließend werden die anderen Bestandteile (verdünnter Schlamm (Nummer 25) und – nach Bedarf – desoxygeniertes Wasser) hinzugegeben. Außerdem wird eine zusätzliche Lösungsmittelkontrolle hergestellt (siehe Nummer 19). Bezüglich anderer Methoden zur Zugabe unlöslicher Stoffe wird auf ISO 10634 (13) verwiesen. Flüssige Prüfstoffe können mit einer Spritze in die entsprechend vorbereiteten und verschlossenen Gefäße injiziert werden, wenn davon ausgegangen wird, dass der pH-Ausgangswert bei 7 ± 1 liegt; ansonsten ist die Dosierung vorzunehmen, wie oben beschrieben (siehe Nummer 19).

Inkubation und Gasdruckmessungen

33. Die vorbereiteten Gefäße werden etwa 1 Stunde bei 35 ± 2 °C inkubiert, um den nötigen Ausgleich zu ermöglichen. Um die Freisetzung von überschüssigem Gas in die Atmosphäre zu bewirken, kann beispielsweise wie folgt verfahren werden: Die Gefäße werden nacheinander geschüttelt; die Nadel des Druckmessers (Nummer 13-c) wird durch den Verschluss gestochen und das Ventil geöffnet, bis der Druckmesser auf 0 steht. Wenn bei diesem Schritt oder bei Zwischenmessungen der Druck im Kopfraum unter den Atmosphärendruck fällt, sollte Stickstoffgas zugeführt werden, um den Atmosphärendruck wiederherzustellen. Das Ventil wird geschlossen (siehe Nummer 13-c); danach wird die Inkubation im Dunkeln fortgesetzt. Dabei ist sicherzustellen, dass in allen Bereichen der Gefäße die nötige Faultemperatur aufrechterhalten wird. Nach einer Inkubationsdauer von 24-48 h Stunden werden die Gefäße kontrolliert. Gefäße, bei denen die überstehende Flüssigkeit deutlich rosa gefärbt ist, sind zu verwerfen. (Wenn sich das Resazurin (siehe Nummer 16) verfärbt hat, ist Sauerstoff vorhanden (siehe Nummer 50)). Im System sind kleine Mengen an Sauerstoff annehmbar; höhere Konzentrationen können den anaeroben biologischen Abbau aber erheblich hemmen. Die Verwerfung einzelner Gefäße (von jeweils drei gleichen Gefäßen) ist annehmbar. Wenn jedoch mehr Gefäße verworfen werden müssen, sind die Versuchsverfahren zu prüfen; außerdem muss der betreffende Test wiederholt werden.

34. Der Inhalt der einzelnen Gefäße wird sorgfältig gemischt, indem der Inhalt der Gefäße

mindestens 2- oder 3-mal wöchentlich sowie kurz vor den Druckmessungen einige Minuten gerührt oder geschüttelt wird. Beim Schütteln wird das Inokulum neu suspendiert, und das erforderliche Gleichgewicht der Gase hergestellt. Alle Druckmessungen sind rasch vorzunehmen, da die Messergebnisse infolge der sinkenden Temperatur der Prüfgefäße beeinträchtigt werden könnten. Bei den Druckmessungen muss im gesamten Prüfgefäß (einschließlich des Kopfraums) die Faultemperatur aufrechterhalten werden. Der Gasdruck wird gemessen, indem beispielsweise die mit dem Druckmesser verbundene Spritzenadel durch das Septum gestochen wird (Nummer 13-c). Dabei ist darauf zu achten, dass kein Wasser in die Spritzenadel gelangt. Ansonsten müssen die feuchten Teile getrocknet und eine frische Nadel verwendet werden. Der Druck ist in Millibar zu messen (siehe Nummer 42). Der Gasdruck in den Gefäßen kann regelmäßig (z. B. wöchentlich) gemessen werden; das überschüssige Gas kann in die Atmosphäre freigesetzt werden. Alternativ wird der Gasdruck erst am Ende des Tests gemessen, um die Menge des erzeugten Biogases zu ermitteln.

35. Zwischenmessungen des Gasdrucks sind zu empfehlen, da der Druckanstieg einen Anhaltspunkt dafür bietet, wann der Test beendet werden kann; außerdem kann die Kinetik überwacht werden (siehe Nummer 6).
36. Normalerweise wird der Test nach einer Inkubationsdauer von 60 Tagen beendet, wenn die aufgrund der Druckmessungen erstellte Kurve des biologischen Abbaus nicht bereits vorher ein Plateau erreicht hat. Dann ist der maximale Abbaugrad erreicht, und die Abbaukurve flacht ab. Wird ein Plateau bei weniger als 60 % erreicht, ist die Bewertung schwierig, weil davon auszugehen ist, dass die vorhandenen Moleküle nur teilweise mineralisiert wurden oder bei der Durchführung des Versuchs ein Fehler gemacht wurde. Wenn am Ende der normalen Inkubationsdauer Gas erzeugt wird, aber offensichtlich kein Plateau erreicht wurde, ist eine Verlängerung des Tests in Betracht zu ziehen, um zu prüfen, ob sich vielleicht doch noch ein Plateau (> 60 %) einstellt.

Messung des anorganischen Kohlenstoffs

37. Am Ende des Tests nach der letzten Messung des Gasdrucks wird abgewartet, bis der Schlamm sich gesetzt hat. Die Gefäße werden nacheinander geöffnet; anschließend wird umgehend eine Probe zur Bestimmung der Konzentration an anorganischem Kohlenstoff in der überstehenden Flüssigkeit (in mg/l) entnommen. Die überstehende Flüssigkeit ist weder zu zentrifugieren noch zu filtern; ansonsten würde es zu einem unannehmbaren Verlust an gelöstem Kohlendioxid kommen. Wenn eine Analyse der Flüssigkeit unmittelbar nach der Probenahme nicht möglich ist, ist die Flüssigkeit bei etwa 4° C bis zu 2 Tage in einem verschlossenen Fläschchen ohne Kopfraum aufzubewahren. Nach der Messung der Konzentration an anorganischem Kohlenstoff wird der pH-Wert bestimmt und protokolliert.
38. Alternativ kann die Konzentration des anorganischen Kohlenstoffs auch unmittelbar bestimmt werden; dazu wird der gelöste anorganische Kohlenstoff als Kohlendioxid freigesetzt und dann im Kopfraum gemessen. Nach der letzten Messung des Gasdrucks wird in den einzelnen Prüfgefäßen der Atmosphärendruck hergestellt. Der Inhalt der einzelnen Gefäße wird etwa auf den pH-Wert 1 eingestellt, indem durch das Septum der verschlossenen Gefäße konzentrierte Mineralsäure (z. B. H₂SO₄) hinzugegeben wird. Die geschüttelten Gefäße werden etwa 24 Stunden bei 35 ± 2 °C inkubiert. Anschließend wird der durch die Freisetzung von Kohlendioxid entstandene Gasdruck

mit dem Druckmesser ermittelt.

39. Für die entsprechende Blindkontrolle sowie für den Referenzstoff und (soweit vorhanden) für die Gefäße zur Inhibitionskontrolle werden ähnliche Messungen vorgenommen (siehe Nummer 21).
40. Manchmal, insbesondere wenn für mehrere Prüfstoffe dieselben Kontrollgefäße verwendet werden, können Zwischenmessungen der Konzentrationen an anorganischem Kohlenstoff in den Gefäßen mit dem Prüfstoff und mit den Kontrollen in Betracht gezogen werden. In diesem Fall ist eine hinreichende Anzahl an Gefäßen für alle vorgesehenen Zwischenmessungen vorzubereiten. Dieses Verfahren ist vorteilhafter als die Entnahme sämtlicher Proben aus einem einzigen Gefäß. Letzteres kommt nur dann in Betracht, wenn für die Analyse des gelösten anorganischen Kohlenstoffs kein allzu großes Volumen benötigt wird. Die Messung der Konzentration des gelösten anorganischen Kohlenstoffs ist nach der Messung des Gasdrucks wie im Folgenden beschrieben vorzunehmen; dabei darf kein überschüssiges Gas freigesetzt werden.
- Mit einer durch das Septum gestochenen Spritze wird eine möglichst geringe Menge des Überstands entnommen, ohne die Gefäße zu öffnen; anschließend wird die Konzentration des anorganischen Kohlenstoffs in der Probe ermittelt;
 - nach der Probenahme kann das überschüssige Gas freigesetzt werden;
 - selbst bei einer geringen Reduzierung der Menge des Überstands (z. B. um etwa 1 %) kann sich das Gasvolumen im Kopfraum (V_h) beträchtlich erhöhen;
 - die Gleichungen (siehe Nummer 44) werden gegebenenfalls korrigiert, indem in Gleichung 3 der Wert für V_h erhöht wird.

Spezifische Analysen

41. Wenn der primäre anaerobe Abbau (siehe Nummer 30) bestimmt werden soll, wird am Anfang und am Ende des Tests aus den Gefäßen mit dem Prüfstoff eine geeignete Menge der Probe für spezifische Analysen entnommen. Dadurch ändern sich die Volumina des Kopfraums (V_h) und der Flüssigkeit (V_l). Dies ist bei der Berechnung der Gasproduktion zu berücksichtigen. Alternativ können Proben für spezifische Analysen auch aus zusätzlichen Gemischen entnommen werden, die zuvor für diesen Zweck hergestellt wurden (Nummer 30).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

42. Aus praktischen Gründen werden der Gasdruck in Millibar ($1 \text{ mbar} = 1 \text{ h Pa} = 10^2 \text{ Pa}$; $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$), das Volumen in Litern und die Temperatur in Grad Celsius gemessen.

Kohlstoff im Kopfraum

43. Da 1 mol Methan und 1 mol Kohlendioxid jeweils 12 g Kohlenstoff enthalten, kann die Masse des Kohlenstoffs in einem bestimmten Volumen eines entstandenen Gases wie folgt ausgedrückt werden:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Gleichung [1]}$$

Dabei sind:

m = Masse des Kohlenstoffs (mg) in einem bestimmten Volumen des entwickelten Gases;

12 = relative Atommasse des Kohlenstoffs;

n = Molzahl des Gases in einem bestimmten Volumen.

Wenn ein anderes Gas als Methan oder Kohlendioxid (z. B. N_2O) in erheblichen Mengen entsteht, ist die Formel [1] entsprechend dem betreffenden Wirkungspotenzial des Gases zu modifizieren.

44. Nach den Gasgesetzen kann n ausgedrückt werden als:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Gleichung [2]}$$

Dabei sind:

p = Gasdruck (Pascal);

V = Gasvolumen (m^3);

R = molare Gaskonstante [8,314 J/(mol K)];

T = Inkubationstemperatur (Kelvin).

Durch eine Kombination der Gleichungen [1] und [2] und durch eine Rationalisierung zur Berücksichtigung der Gasproduktion der Blindkontrolle ergibt sich:

$$m_h = \frac{12000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Gleichung [3]}$$

Dabei sind:

m_h = Nettomasse des im Kopfraum erzeugten gasförmigen Kohlenstoffs (mg);

Δp = Mittelwert des Unterschieds zwischen Ausgangs- und Enddruck in den Prüfgefäßen abzüglich des entsprechenden Mittelwerts der Blindgefäße (Millibar);

V_h = Kopfraumvolumen (l);

0,1 = Umrechnung $Newton/m^2$ in Millibar und m^3 in l.

Gleichung [4] ist für die normale Inkubationstemperatur von 35 °C (308 K) zu verwenden:

$$m_h = 0,468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Gleichung [4]}$$

Hinweis: Alternative Volumenberechnung: Aus den auf dem Druckmesser angezeigten Werten wird anhand der erstellten Standardkurve (injiziertes Volumen (ml) vs. angezeigter Messwert) in ml das produzierte Gasvolumen berechnet (Anlage 2). Die Molzahl (n) des Gases im Kopfraum der einzelnen Gefäße wird berechnet, indem die gesamte Gasproduktion (ml) durch 25 286 ml/mol geteilt wird. (Dies ist das von einem

mol des Gases bei einer Temperatur von 35 °C und dem normalen Atmosphärendruck beanspruchte Volumen.) Da 1 mol CH₄ und 1 mol CO₂ jeweils 12 g Kohlenstoff enthalten, kann die Menge des Kohlenstoffs (mg) im Kopfraum (m_h) mit der folgenden Gleichung [5] ermittelt werden:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Gleichung [5]}$$

Rationalisierung zur Berücksichtigung der Gasproduktion in der Blindkontrolle:

$$m_h = \frac{12\,000 \times \Delta V}{25\,286} = 0,475 \Delta V \quad \text{Gleichung [6]}$$

Dabei sind:

m_h = Nettomasse des im Kopfraum erzeugten gasförmigen Kohlenstoffs (mg);
 ΔV = Mittelwert des Unterschieds zwischen dem Volumen des im Kopfraum der Prüfgefäße und der Gefäße mit den Blindkontrollen erzeugten Gases;
 25 286 = von 1 mol Gas bei 35 °C, 1 atm beanspruchtes Volumen.

45. Der biologische Abbau kann verfolgt werden, indem der kumulierte Druckanstieg Δp (millibar) (ggf.) zeitbezogen grafisch dargestellt wird. Aus der entsprechenden Kurve kann die „Lag“-Phase (in Tagen) ermittelt und protokolliert werden. Als „Lag“-Phase wird der Zeitraum vom Beginn des Tests bis zum Einsetzen eines signifikanten Abbaus bezeichnet (siehe z. B. Anlage 3). Wenn Zwischenproben des Überstands genommen und analysiert wurden (siehe Nummern 40, 46 und 47), kann anstelle des bloßen Gesamtdrucks auch die Summe des erzeugten Kohlenstoffs (gasförmig und flüssig) dargestellt werden.

Kohlstoff im Kopfraum

46. Die Menge des Methans in der Flüssigkeit ist unerheblich, da sich Methan in Wasser sehr schlecht löst. Mit der folgenden Gleichung [7] wird die Masse des anorganischen Kohlenstoffs in der Flüssigkeit der Prüfgefäße ermittelt:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Gleichung [7]}$$

Dabei sind:

m_l = Masse des anorganischen Kohlenstoffs in der Flüssigkeit (mg);
 C_{net} = Konzentration des anorganischen Kohlenstoffs in den Prüfgefäßen abzüglich des organischen Kohlenstoffs in den Kontrollgefäßen am Ende des Tests (mg/l);
 V_l = Volumen der Flüssigkeit im Gefäß (l).

Gasförmiger Kohlenstoff insgesamt

47. Die Gesamtmasse des gasförmigen Kohlenstoffs im Gefäß wird mit der folgenden Gleichung [8] berechnet:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Gleichung [8]}$$

Dabei sind:

m_t = Gesamtmasse des gasförmigen Kohlenstoffs (mg);
 m_h und m_l wie oben angegeben.

Kohlstoff im Prüfstoff

48. Mit der folgenden Gleichung [9] wird die Masse des Kohlenstoffs in den Prüfgefäßen aufgrund des hinzugegebenen Prüfstoffs ermittelt:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Gleichung [9]}$$

Dabei sind:

m_v = Masse des Kohlenstoffs im Prüfstoff (mg);
 C_c = Konzentration des in im Prüfstoff enthaltenen Kohlenstoffs im Prüfgefäß (mg/l)
 V_l = Volumen der Flüssigkeit im Prüfgefäß (l).

Umfang des biologischen Abbaus

49. Der prozentuale biologische Abbau des Gases im Kopfraum wird mit der folgenden Gleichung [10] berechnet; mit Gleichung [11] wird der prozentuale gesamte biologische Abbau ermittelt:

$$D_h = (m_h / m_v) \times 100 \quad \text{Gleichung [10]}$$

$$D_t = (m_t / m_v) \times 100 \quad \text{Gleichung [11]}$$

Dabei sind:

D_h = biologischer Abbau des Gases im Kopfraum (%);
 D_t = gesamter biologischer Abbau (%);
 m_h , m_v und m_t wie oben angegeben.

Der Umfang des primären biologischen Abbaus wird mit der folgenden Gleichung [12] aus den (optionalen) Messungen der Konzentration des Prüfstoffs zu Beginn und am Ende der Inkubationsdauer berechnet:

$$D_p = (1 - S_e / S_i) \times 100 \quad \text{Gleichung [12]}$$

Dabei sind:

D_p = primärer Abbau des Prüfstoffs (%);
 S_i = Ausgangskonzentration des Prüfstoffs (mg/l);
 S_e = Konzentration des Prüfstoffs am Ende (mg/l).

Wenn die Analysemethode ergibt, dass sich im unbehandelten anaeroben Schlamm-Inokulum erhebliche Konzentrationen des Prüfstoffs befinden, ist Gleichung [13] zu verwenden:

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Gleichung [13]}$$

Dabei sind:

D_p^1 = korrigierter primärer Abbau des Prüfstoffs (%);

S_{ib} = „offensichtliche“ Ausgangskonzentration des Prüfstoffs in den Blindkontrollen (mg/l);

S_{eb} = „offensichtliche“ Konzentration des Prüfstoffs in den Blindkontrollen am Ende (mg/l).

Gültigkeit der Ergebnisse

50. Angezeigte Druckwerte sind nur von den Gefäßen zu berücksichtigen, die sich nicht rosa verfärbt haben (siehe Nummer 33). Die Kontamination durch Sauerstoff wird durch die Verwendung geeigneter Verfahren zur anaeroben Handhabung minimiert.
51. Ein Test ist dann als gültig zu betrachten, wenn die Kurve des Referenzstoffs ein Plateau erreicht, das einem biologischen Abbau von mehr als 60 % entspricht.¹
52. Wenn der pH-Wert am Ende des Tests nicht mehr im Bereich 7 ± 1 liegt und kein ausreichender biologischer Abbau erfolgt ist, wird die Pufferkapazität des Mediums erhöht und der Test wiederholt.

Hemmung des Abbaus

53. In den Gefäßen, die sowohl den Prüfstoff als auch den Referenzstoff enthalten, muss mindestens die gleiche Menge an Gas produziert werden wie in den Gefäßen ausschließlich mit dem Referenzstoff. Ansonsten ist eine Inhibition der Gasproduktion festzustellen. Manchmal ist die Gasproduktion in Gefäßen mit dem Prüfstoff ohne den Referenzstoff geringer als in den Blindkontrollen; auch in diesem Fall ist eine hemmende Wirkung des Prüfstoffs festzustellen.

Prüfbericht

54. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfstoff:

- Common name, chemische Bezeichnung, CAS-Nummer, Strukturformel und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Reinheit (Verunreinigungen) des Prüfstoffs.

Prüfbedingungen:

¹ Die Bewertung ist zu wiederholen, wenn adsorptive und nicht lösliche Referenzstoffe verwendet werden.

- Volumina der verdünnten Faulschlammflüssigkeit (V_l) und des Kopfraums (V_h) im Gefäß;
- Beschreibung der Prüfgefäße, der wesentlichen Merkmale der Biogasmessung (z. B. Druckmessertyp) und des Geräts zur Analyse des Gehalts an anorganischem Kohlenstoff;
- Applikation des Prüf- und des Referenzstoffs in das Prüfsystem: verwendete Testkonzentration und Verwendung von Lösungsmitteln;
- nähere Angaben zum verwendeten Inokulum: Name der Kläranlage, Angaben zur Herkunft des behandelten Abwassers (Betriebstemperatur, Retentionszeit des Schlammes, vorwiegend häusliche Abwässer usw.), Konzentration, erforderliche Belege für diese Angaben und Informationen zu Vorbehandlungen des Inokulums (Vorfaulung, Vorexposition usw.);
- Inkubationstemperatur;
- Anzahl der Replikate.

Ergebnisse:

- pH-Werte und Konzentration des anorganischen Kohlenstoffs am Ende des Tests;
- Konzentration des Prüfstoffs zu Beginn und am Ende des Tests, wenn eine spezifische Messung vorgenommen wurde;
- alle gemessenen Daten zu den Prüfgefäßen und Blindgefäßen sowie zu den Gefäßen mit dem Referenzstoff und den Inhibitionskontrollen (soweit verwendet) (z. B. Druck in Millibar und Konzentration des anorganischen Kohlenstoffs (mg/l)) in tabellarischer Form (unter getrennter Angabe der Messwerte für den Kopfraum und für die Flüssigkeit);
- statistische Aufbereitung der Daten, Testdauer und grafische Darstellung des biologischen Abbaus (Prüfstoff, Referenzstoff und Inhibitionskontrolle);
- prozentualer biologischer Abbau des Prüfstoffs und des Referenzstoffs;
- Angabe von Gründen, falls die Prüfergebnisse verworfen werden;
- Diskussion der Ergebnisse.

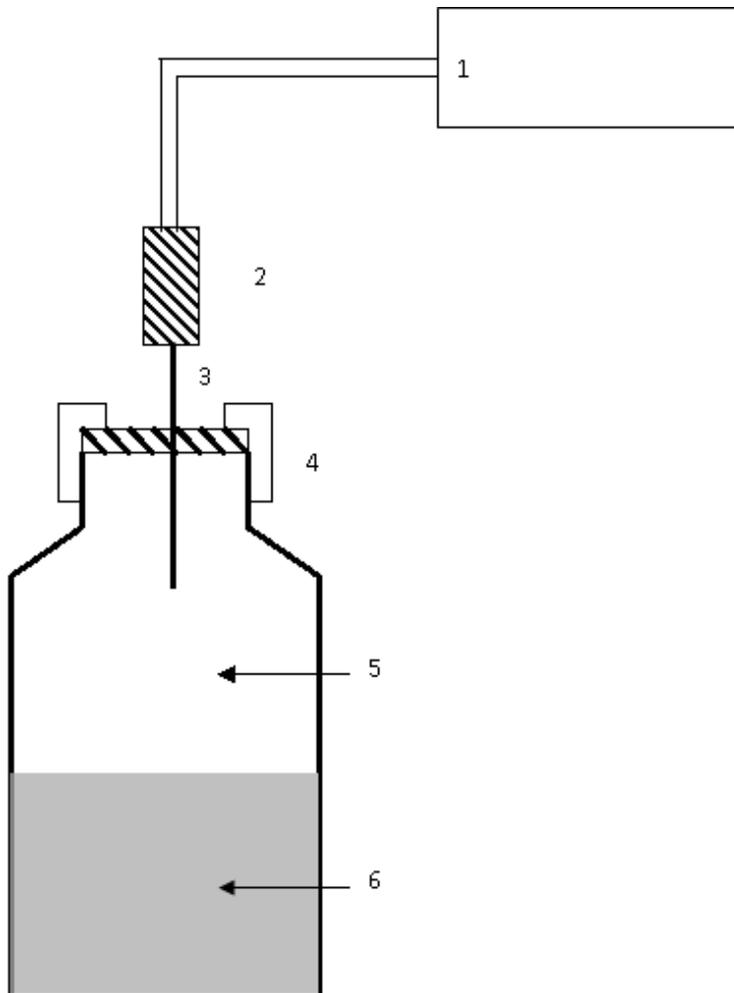
LITERATUR

- (1) Die folgenden Kapitel in diesem Anhang:
C.4, Bestimmung leichter biologischer Abbaubarkeit;
C.9, Biologische Abbaubarkeit – Zahn-Wellens-Test;
C.10, Simulationstest – Aerobe Abwasserbehandlung:
A: Belebtschlamm-Anlagen, B: Biofilme
C.11, Biologische Abbaubarkeit – Belebtschlamm-
Atmungshemmungstest
- (2) OECD (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II),
OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 302C, OECD, Paris
- (3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber,
J., Reust, H., und Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for
anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550. (veröffentlicht
auch als ECETOC Technical Report Nr. 28, Juni 1988).
- (4) Shelton, D.R., und Tiedje, J.M. (1984) General method for determining
anaerobic biodegradation potential. *Appl. Environ. Microbiology*, 47,
850-857.
- (5) Owen, W.F., Stuckey, D.C., Healy, J.B., Jr, Young, L.Y., und McCarty,
P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and
anaerobic toxicity. *Water Res.* 13, 485-492.
- (6) Healy, J.B. Jr., und Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of
eleven aromatic compounds to methane. *Appl. Environ. Microbiol.* 38,
84-89.
- (7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination
of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Working
document. Draft 2 no.35.24. American Society for Testing Materials,
Philadelphia.
- (8) Battersby, N.S., und Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle
technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic
chemicals under methanogenic conditions. *Chemosphere*, 17, 2441-
2460.
- (9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic
Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Philadelphia.
- (10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines
OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.
- (11) Internationale Organisation für Normung (1995) ISO 11734
Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der vollständigen anaerobischen
Abbaubarkeit organischer Verbindungen in Belebtschlamm - Verfahren
durch Messung der Biogasproduktion

- (12) Internationale Organisation für Normung (2003) ISO 13 641-1 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmwirkung der Gasproduktion auf anaerobe Bakterien – Teil 1: Allgemeiner Test.
- (13) 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.
- (14) Pagga, U., und Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499-1509.
- (15) Internationale Organisation für Normung (1997) ISO 11 923 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Schwebstoffe mittels Filtration durch ein Glasfaserfilter.

ANLAGE 1

BEISPIEL EINER APPARATUR ZUR MESSUNG DER BIOGASPRODUKTION ANHAND DES GASDRUCKS



Legende:

- 1 - Druckmesser
- 2 - Gasdichtes 3-Wege-Ventil
- 3 - Spritzennadel
- 4 - Gasdichter Verschluss (gepresster Deckel und Septum)
- 5 - Kopfraum (V_h)
- 6 - Faulschlamm-Inokulum (V_l)

Prüfgefäße bei einer Temperatur von $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

ANLAGE 2

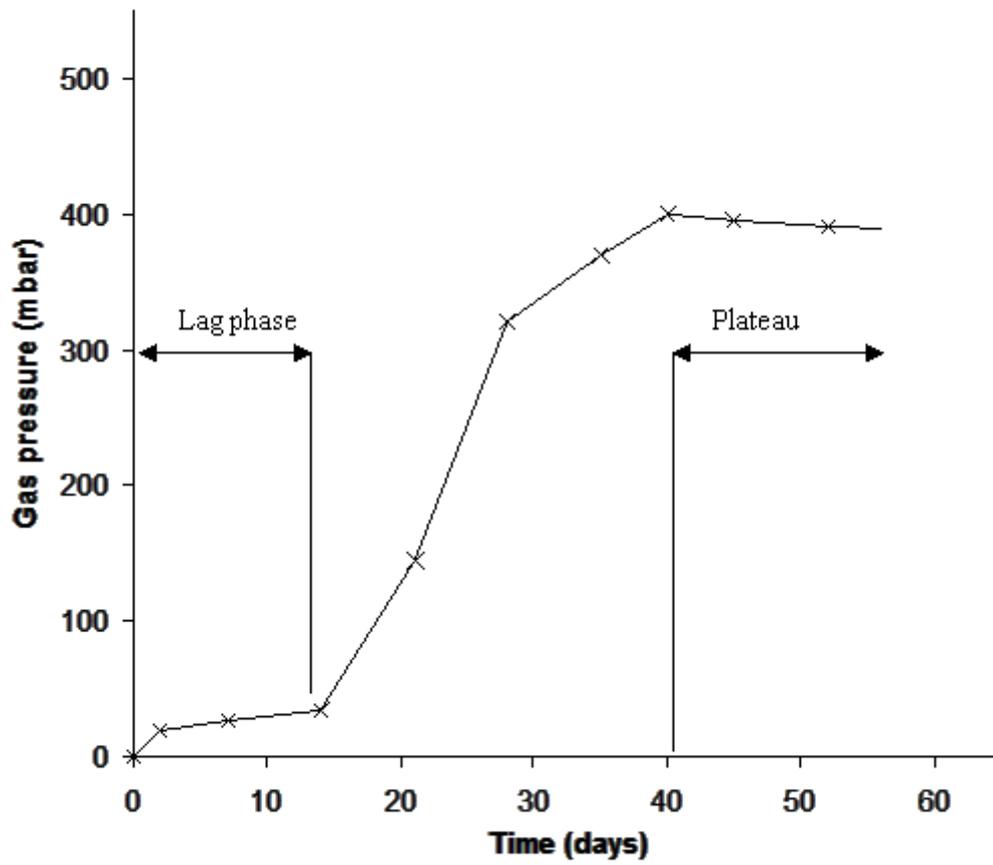
UMRECHNUNG DER MESSWERTE DES DRUCKMESSERS

Anhand einer Standardkurve, die nach Injektion bekannter Luftvolumina bei einer Temperatur von mindestens $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ in Serumflaschen mit einem Wasseranteil entsprechend dem Reaktionsgemisch (V_R) erstellt wurde, können die angezeigten Druckwerte Gasvolumina zugeordnet werden:

- Auf $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ temperierte Wasseraliquoten mit einem Volumen von V_R ml werden in fünf Serumflaschen gegeben. Die Flaschen werden verschlossen und 1 Stunde zum Ausgleichen in ein Wasserbad mit einer Temperatur von $35 \text{ }^\circ\text{C}$ gestellt;
- der Druckmesser wird eingeschaltet, und nach der Stabilisierung der Anzeige wird das Gerät auf null gestellt;
- die Spritzennadel wird durch den Verschluss in eine der Flaschen gestochen, und das Ventil wird geöffnet; wenn der Druckmesser den Wert null anzeigt, wird das Ventil wieder geschlossen;
- dieses Verfahren ist mit den übrigen Flaschen zu wiederholen;
- In jede Flasche wird 1 ml Luft mit einer Temperatur von $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ injiziert. Die Nadel (am Druckmesser) wird durch den Verschluss einer Flasche gestochen; danach muss abgewartet werden, bis sich die Druckanzeige stabilisiert hat. Nachdem der Druckwert protokolliert wurde, wird das Ventil geöffnet, bis die Anzeige wieder auf null steht. Danach wird das Ventil geschlossen;
- dieses Verfahren ist mit den übrigen Flaschen zu wiederholen;
- anschließend wird 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 wiederholt;
- die Kurve der umgerechneten Druckwerte (Pa) wird bezogen auf das injizierte Gasvolumen V_b (ml) grafisch dargestellt. Das Messgerät reagiert im Bereich von 0-70 000 Pa und bei einer Gasproduktion von 0-50 ml linear.

ANLAGE 3

BEISPIEL EINER ABBAUKURVE (KUMULATIVER NETTO-DRUCKANSTIEG)



ANLAGE 4

**DATENBLÄTTER ZUM TEST ZUR PRÜFUNG DER ANAEROBEN BIOLOGISCHEN ABBAUBARKEIT (BEISPIEL) –
DATENBLATT DES PRÜFSTOFFS**

Labor: Prüfstoff: Test Nr.:
 Testtemperatur: (°C):... Volumen des Kopfraums (V_h):.....(l) Volumen der Flüssigkeit (V_l) :.....(l)
 Kohlenstoff im Prüfstoff $C_{c,v}$:.....(mg/l) m_v^1 : (mg)

Tag	p1 (Test) (mbar)	p2 (Test) (mbar)	p3 (Test) (mbar)	p (Test) Mittelwert (mbar)	p4 (Blind) (mbar)	p5 (Blind) (mbar)	p6 (Blind) (mbar)	p (Blind) Mittelwert (mbar)	p (netto) Test – Blind- kontrolle Mittelwert (mbar)	□ p (netto) Kumulativ (mbar)	m _h Kohlenstoff im Kopfraum, C ₂ (mg)	D _h Biologischer Abbau ³ (%)
	$C_{IC,1}$	$C_{IC,2}$	$C_{IC,3}$	C_{IC}	$C_{IC,4}$	$C_{IC,5}$	$C_{IC,6}$	C_{IC}	$C_{IC,net}$	m_t	MT	D_t

1 Kohlenstoff im Prüfgefäß, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$
 2 Kohlenstoff im Kopfraum, m_h (mg) bei normaler Inkubationstemperatur (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$
 3 Biologischer Abbau berechnet aus dem Gas im Kopfraum, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

	Test (mg)	Test (mg)	Test (mg)	Mittelwert Test (mg)	Blindkontrolle (mg)	Blindkontrolle (mg)	Blindkontrolle (mg)	Mittelwert Blindkontrolle (mg)	Test – Blindkontrolle Mittelwert (mg)	Flüssiger Kohlenstoff ¹ (mg)	Kohlenstoff insgesamt ² (mg)	Biologischer Abbau ³ (%)
Anorganischer Kohlenstoff (Ende)												
pH-Wert (Ende)												

¹ Kohlenstoff in der Flüssigkeit, ml (mg): $ml = C_{IC,net} \times V_1$

² Gasförmiger Kohlenstoff insgesamt, m_t (mg): $m_t + ml$

³ Biologischer Abbau insgesamt, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

ANLAGE 4 (Forts.):

**DATENBLÄTTER ZUM TEST ZUR PRÜFUNG DER ANAEROBEN BIOLOGISCHEN ABBAUBARKEIT (BEISPIEL) –
DATENBLATT DES REFERENZSTOFFS**

Labor: Referenzstoff: Test Nr.:
 Testtemperatur: (°C): Volumen des Kopfraums (V_h): (l) Volumen der Flüssigkeit (V_l) (l):
 Kohlenstoff im Referenzstoff $C_{c,v}$ (mg/l): m_v ¹(mg):

Tag	p_1 (Ref.) (mbar)	p_2 (Ref.) (mbar)	p_3 (Ref.) (mbar)	p (Ref.) Mittel- wert (mbar)	p_4 (Inhib.) (mbar)	p_5 (Inhib.) (mbar)	p_6 (Inhib.) (mbar)	p (Inhib.) Mittel- wert (mbar)	p (Ref.) Ref. – Blind (mbar)	Δp (Ref.) Kumulativ (mbar)	MH Kohlenstoff im Kopfraum, C^2 (mg)	D_h Biologischer Abbau ³ (%)

¹ Kohlenstoff im Prüfgefäß, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$
² Kohlenstoff im Kopfraum, m_h (mg) bei normaler Inkubationstemperatur (35 °C): $m_h = 0,468 \Delta p \times V_h$
³ Biologischer Abbau, berechnet aus dem Gas im Kopfraum, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

	$C_{IC, 1}$ Ref. (mg)	$C_{IC, 2}$ Ref. (mg)	$C_{IC, 3}$ Ref. (mg)	C_{IC} Mittel- werte Ref. (mg)	$C_{IC, 4}$ Inhib. (mg)	$C_{IC, 5}$ Inhib. (mg)	$C_{IC, 6}$ Inhib. (mg)	C_{IC} Mittel- werte Inhib. (mg)	$C_{IC, net}$ Ref. Inhib. (mg)	- m_1 Flüssiger Kohlen- stoff ¹ (mg)	MT Kohlenstoff insgesamt ² (mg)	D_t Biologischer Abbau ³ (%)
Anorga- nischer Kohlen- stoff (Ende)												
pH-Wert (Ende)												

-
- 1 Kohlenstoff in der Flüssigkeit, ml (mg): $ml = C_{IC, net} \times V_1$
2 Gasförmiger Kohlenstoff insgesamt, m_t (mg): $m_t + ml$
3 Biologischer Abbau insgesamt, D_t (%): $D_t = (m_t \times 100) / m_v$

C.44. Auswaschen in Bodensäulen

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 312 (2004). Synthetisch hergestellte Chemikalien können durch bewusste Ausbringung (z. B. Agrochemikalien) oder über indirekte Wege (z. B. Abwasser → Klarschlamm → Boden oder Luft → feuchte/trockene Deposition) in den Boden gelangen. Für eine Bewertung des mit diesen Chemikalien verbundenen Risikos muss das Potenzial der Chemikalien zur Umwandlung und zum Eindringen (Auswaschen) in tiefere Bodenschichten sowie eventuell ins Grundwasser ermittelt werden.
2. Das Potenzial von Chemikalien zur Auswaschung in den Boden kann unter kontrollierten Laborbedingungen mit verschiedenen Verfahren ermittelt werden (Dünnschichtchromatographie, Dickschichtchromatographie, Bodensäulenchromatographie und Adsorptions-/Desorptionsmessungen) (1)(2). Bei nicht ionisierten Chemikalien ermöglicht der n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (P_{ow}) eine frühzeitige Abschätzung des Adsorptions- und Auswaschungspotenzials (3)(4)(5).
3. Das in dieser Prüfmethode beschriebene Verfahren beruht auf der Bodensäulenchromatographie mit gestörten Böden (zur Begriffsbestimmung siehe Anlage 1). Das Auswaschungspotenzial (i) der Prüfchemikalie und (ii) von Transformationsprodukten (Untersuchung mit gealterten Rückständen) von Böden unter kontrollierten Laborbedingungen wurde mit zwei Testtypen ermittelt.¹ Die Prüfmethode beruht auf bestehenden Methoden (6)(7)(8)(9)(10)(11).
4. 1995 wurde in einem OECD-Workshop über die Auswahl von Böden/Sedimenten in Belgirate, Italien, (12) Einigung über Anzahl und Typ der für diese Prüfmethode zu verwendenden Böden erzielt. Außerdem wurden Empfehlungen bezüglich der Entnahme, Handhabung und Lagerung von Bodenproben für Auswaschungstests formuliert.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

5. Säulen aus geeignetem inertem Material (Glas, Edelstahl, Aluminium, Teflon, PVC usw.) werden mit Bodenmaterial gepackt. Anschließend wird die Packung mit einer künstlichen Regenerlösung (Begriffsbestimmung siehe Anlage 1) gesättigt und abgewartet, bis ein Ausgleich hergestellt und die überschüssige Flüssigkeit abgelaufen ist. Danach wird die Oberfläche der Bodensäulen jeweils mit der Prüfchemikalie und/oder mit gealterten Rückständen der Prüfchemikalie behandelt. Die Bodensäulen werden mit dem künstlichen Regen getränkt, und das Sickerwasser wird aufgefangen. Nach dem Auswaschen wird der Boden aus den Säulen entnommen und je nach den zu

¹ Untersuchungen zur Auswaschung von Pflanzenschutzprodukten in Bodensäulen können Aufschluss über die Mobilität eines Prüfstoffs und seine Transformationsprodukte geben und Chargenuntersuchungen zum Sorptionsverhalten ergänzen.

untersuchenden Merkmalen in eine geeignete Anzahl an Unterproben geteilt. Diese Unterproben und das Sickerwasser werden auf Rückstände der Prüfchemikalie sowie gegebenenfalls auf Transformationsprodukte oder sonstige relevante Chemikalien untersucht.

ANWENDBARKEIT DER PRÜFMETHODE

6. Die Prüfmethode kann bei (nicht markierten oder radioaktiv (etwa mit ^{14}C) markierten) Prüfchemikalien verwendet werden, für die eine hinreichend genaue und empfindliche Analysemethode verfügbar ist. Für Chemikalien, die sich aus dem Boden und aus Wasser verflüchtigen und somit unter den Bedingungen dieser Prüfmethode nicht im Boden und/oder im Sickerwasser verbleiben, ist die Methode nicht geeignet.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

7. Zur Messung des Auswaschungsverhaltens in Bodensäulen können nicht markierte oder radioaktiv markierte Prüfchemikalien verwendet werden. Um die Auswaschung von Transformationsprodukten (gealterten Rückständen der Prüfchemikalie) zu untersuchen und um die Massenbilanz zu ermitteln, wird radioaktiv markiertes Material benötigt. Die Markierung mit ^{14}C wird empfohlen; es können aber auch andere Isotope (z. B. ^{13}C , ^{15}N , ^3H oder ^{32}P) verwendet werden. Nach Möglichkeit ist die Markierung im stabilsten Teil (in den stabilsten Teilen) des jeweiligen Moleküls zu setzen. Die Prüfchemikalie muss eine Reinheit von mindestens 95 % haben.
8. Bei den meisten Chemikalien erfolgt die Applikation in reiner Form. Nur bei Wirkstoffen von Pflanzenschutzmitteln können Fertigprodukte zur Untersuchung der Auswaschung des Ausgangsprüfstoffs verwendet werden. Diese Stoffe sind besonders dann zu untersuchen, wenn das jeweilige Gemisch geeignet ist, die Freisetzungsrate zu beeinflussen (z. B. Granulate oder Formulierungen zur kontrollierten Freisetzung). Bezüglich der für das betreffende Gemisch spezifischen Anforderungen an das jeweilige Prüfprotokoll kann es hilfreich sein, sich vor Durchführung eines Tests bei der zuständigen Behörde zu erkundigen. Bei Auswaschungstests mit gealterten Rückständen ist der Prüfstoff in reiner Form zu verwenden.
9. Vor der Durchführung von Auswaschungstests mit Bodensäulen sollten die folgenden Informationen zur Prüfchemikalie verfügbar sein:
 - (1) Löslichkeit in Wasser [Prüfmethode A.6] (13);
 - (2) Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln;
 - (3) Dampfdruck [Prüfmethode A.4] (13) und Henry-Konstante;
 - (4) n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient [Prüfmethoden A.8 und A.24] (13);
 - (5) Adsorptionskoeffizient (K_d , K_f oder K_{OC}) [Prüfmethoden C.18 und/oder C.19] (13);
 - (6) Hydrolyse [Prüfmethode C.7] (13);
 - (7) Dissoziationskonstante (pK_a) [OECD-Prüfrichtlinie 112] (25);

(8) aerobe und anaerobe Transformation im Boden [Prüfmethode C.23] (13).

Hinweis: Die Temperatur, bei der diese Messungen vorgenommen wurden, ist in den jeweiligen Prüfprotokollen zu vermerken.

10. Die Prüfchemikalie ist in hinreichender Menge in die Bodensäulen einzubringen, um in den einzelnen Segmenten mindestens 0,5 % der eingebrachten Dosierung nachweisen zu können. Bei Wirkstoffen in Pflanzenschutzmitteln kann die Menge der eingebrachten Prüfchemikalie der für die Verwendung des Produktes empfohlenen maximalen Dosierung entsprechen (einmalige Applikation).
11. Zur Quantifizierung der Prüfchemikalie sowie gegebenenfalls ihrer Transformationsprodukte im Boden und im Sickerwasser muss eine geeignete Analyseverfahren mit bekannter Genauigkeit, Präzision und Empfindlichkeit verfügbar sein. Die analytische Nachweisgrenze für die Prüfchemikalie und ihre wesentlichen Transformationsprodukte (im Allgemeinen mindestens sämtliche Transformationsprodukte im Umfang von $\geq 10\%$ der verwendeten Dosierung in Tests zur Untersuchung der Transformationspfade, vorzugsweise aber alle relevanten Transformationsprodukte) sollten bekannt sein (siehe Nummer 17).

REFERENZCHEMIKALIEN

12. Zur Bewertung der relativen Mobilität der Prüfchemikalie im Boden werden Referenzchemikalien mit bekanntem Auswaschungsverhalten (z. B. Atrazin oder Monuron) verwendet, von denen aus praktischen Erfahrungen bekannt ist, dass sie in mäßigem Umfang ausgewaschen werden (1)(8)(11). Eine nicht sorbierende und nicht abbaubare polare Referenzchemikalie (z. B. Tritium, Bromid, Fluoreszein oder Eosin) zur Verfolgung der Bewegung des Wassers in der Säule kann hilfreich sein, um die hydrodynamischen Eigenschaften der Bodensäule zu ermitteln.
13. Chemikalien in Analysequalität können verwendet werden, um durch Chromatographie, Spektroskopie oder sonstige geeignete Verfahren Transformationsprodukte zu beschreiben und/oder zu identifizieren, die in den Bodensegmenten und im Sickerwasser enthalten sind.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND EINHEITEN

14. siehe Anlage 1.

QUALITÄTSKRITERIEN

Wiederfindung

15. Im Auswaschungstest ist die Summe der Prozentanteile der Prüfchemikalie, die nach dem Auswaschen in den Bodensegmenten und im Sickerwasser der Säulen nachgewiesen wurden, als Wiederfindungsrate zu betrachten. Die Wiederfindungsraten müssen bei radioaktiv markierten Chemikalien bei 90-110 % (11) und bei nicht

markierten Chemikalien bei 70-110 % liegen (8).

Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit der Analysemethode

16. Die Wiederholbarkeit der Analysemethode zur Quantifizierung der Prüfchemikalie und der Transformationsprodukte kann durch erneute Analyse desselben Extrakts eines Bodensegments oder des betreffenden Sickerwassers geprüft werden (siehe Nummer 11).
17. Die Nachweisgrenze (LOD) der Methode zur Analyse der Prüfchemikalie und der Transformationsprodukte muss bei den einzelnen Bodensegmenten und im Sickerwasser (als Prüfchemikalie) jeweils mindestens $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ oder 0,5 % der in die einzelnen Segmente eingebrachten Dosis betragen; maßgeblich ist der jeweils niedrigere Wert. Der Quantifizierungsgrenze (LOQ) ist ebenfalls zu bestimmen.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Prüfsystem

18. Für den Test werden Auswaschungssäulen (teilbar und unteilbar) aus geeignetem inertem Material (Glas, Edelstahl, Aluminium, Teflon, PVC usw.) mit einem Innendurchmesser von mindestens 4 cm und einer Mindesthöhe von 35 cm verwendet. Das Säulenmaterial ist auf potenzielle Wechselwirkungen mit der Prüfchemikalie und/oder mit Transformationsprodukten der Prüfchemikalie zu testen. In Anlage 2 werden einige geeignete teilbare und nicht teilbare Säulen beschrieben.
19. Zum Füllen und Packen der Bodensäulen sind Löffel, Kolben und Vibrationsvorrichtungen zu verwenden.
20. Zur Einbringung des künstlichen Regens in die Bodensäulen können Kolbenpumpen, peristaltische Pumpen, Brauseköpfe, Mariottesche Flaschen oder einfache Tropftrichter verwendet werden.

Laboraüstung und Chemikalien

21. Es wird die übliche Laboroüstung insbesondere mit folgenden Bestandteilen benötigt:
 - (1) Analysegeräte (u. a. GLC-, HPLC- und TLC-Aüstung) einschließlich geeigneter Nachweissysteme zur Analyse markierter oder nicht markierter Chemikalien oder zur Analyse mit der inversen Isotopenverdünnungsmethode;
 - (2) Bestimmungsgeräte (MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR usw.);
 - (3) Flüssigszintillationszähler für nicht radioaktiv markierte Prüfchemikalien;
 - (4) Oxidationsmittel zur Verbrennung von markiertem Material;
 - (5) Extraktionsgerät (z. B. Zentrifugenröhrchen zur Kaltextraktion und Soxhlet-

Apparat zur kontinuierlichen Extraktion unter Rückfluss);

(6) Geräte zur Konzentration von Lösungen und Extrakten (z. B. Rotationsverdampfer).

22. Folgende Chemikalien werden verwendet: organische Lösungsmittel in Analysequalität (Aceton, Methanol usw.); Szintillationsflüssigkeit: 0,01 M CaCl₂-Lösung in destilliertem oder entionisiertem Wasser (= „künstlicher Regen“).

Prüfchemikalie

23. Um die Prüfchemikalie in die Bodensäule einzubringen, wird der Stoff in (destilliertem oder entionisiertem) Wasser gelöst. Wenn die Prüfchemikalie in Wasser schlecht löslich ist, kann sie entweder als Fertigprodukt (erforderlichenfalls nach Suspension oder Emulgierung in Wasser) aufgebracht werden, oder die Applikation kann in einem beliebigen organischen Lösungsmittel erfolgen. Soweit überhaupt verwendet, sind organische Lösungsmittel auf ein Minimum zu begrenzen und vor Beginn des Auswaschungsverfahrens von der Oberfläche des Bodenmaterials zu verdampfen. Feste Zubereitungen (z. B. Granulate) werden in fester Form ohne Wasser in die Säulen gegeben. Um die Verteilung der Materialien über die Oberfläche der Bodensäule zu unterstützen, können die Fertigprodukte vor der Applikation mit einem geringen Anteil an Quarzsand (z. B. 1 g) gemischt werden.

24. Die Prüfchemikalie ist in hinreichender Menge in die Bodensäulen einzubringen, um mindestens 0,5 % der vorgenommenen Dosierung in den einzelnen Segmenten nachweisen zu können. Bei Wirkstoffen von Pflanzenschutzprodukten kann hinsichtlich der einzubringenden Menge von der empfohlenen Höchstdosierung (Einzeldosis) ausgegangen werden. Bei Ausgangsstoffen und bei Auswaschungen gealterter Stoffe ist von der Oberfläche der verwendeten Bodensäule auszugehen.¹

Referenzchemikalie

25. In den Auswaschungstests ist eine Referenzchemikalie zu verwenden (siehe Nummer 12). Die Referenzchemikalien sind in ähnlicher Weise wie die Prüfchemikalie auf die Oberfläche der Bodensäule aufzubringen; die Applikation muss mit einer Geschwindigkeit erfolgen, die eine angemessene Nachweisgenauigkeit entweder als Einzelstandard mit der Prüfchemikalie in derselben Bodensäule oder isoliert in einer eigenen Bodensäule gewährleistet. Vorzugsweise werden beide Chemikalien in derselben Säule ausgewaschen, wenn nicht beide Chemikalien ähnlich

¹ Die zu verwendende Menge bei zylindrischen Bodensäulen kann mit der folgenden Formel berechnet werden:

$$M [\mu\text{g}] = \frac{A [\text{kg} / \text{ha}] \cdot 10^9 [\mu\text{g} / \text{kg}] \cdot d^2 [\text{cm}^2] \cdot \pi}{10^8 [\text{cm}^2 / \text{ha}] \cdot 4}$$

Dabei sind:

M = in die Säule eingebrachte Menge [μg]

A = Applikationsrate [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]

d = Durchmesser der Bodensäule [cm]

$\pi = 3,14$.

markiert wurden.

Böden

Auswahl der Böden

26. Für die Auswaschungsuntersuchungen mit der Ausgangsprüfchemikalie werden 3 bis 4 Böden mit unterschiedlichen pH-Werten, Anteilen an organischen Kohlenstoffen und Texturen verwendet (12). Die folgende Tabelle 1 enthält Leitlinien zur Auswahl von Böden für Auswaschungstests. Bei ionisierbaren Prüfchemikalien müssen die ausgewählten Böden ein breites Spektrum an pH-Werten abdecken, damit die Mobilität der Chemikalien in ionisierter und in nicht ionisierter Form beurteilt werden kann. Mindestens 3 Böden müssen einen pH-Wert aufweisen, bei dem die Prüfchemikalie in mobiler Form vorliegt.

Tabelle 1: Leitlinien zur Auswahl von Böden für Auswaschungstests

Boden Nr.	pH-Wert	Organischer Kohlenstoff %	Tonanteil %	Textur*
1	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	lehmiger Tonboden
2	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	lehmiger Schluff
3	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	Lehm
4	<4,0 - 6,0 §	<0,5 - 1,5 § ‡	<10 - 15 §	lehmiger Sand
5	<4,5	> 10#	<10	lehmiger Sand/Sand

* Nach dem FAO- und dem USDA-System (14).

§ Die Werte der entsprechenden Variablen sollten im genannten Bereich liegen. Wenn geeignetes Bodenmaterial schwer zu finden ist, können die genannten Mindestwerte unterschritten werden.

‡ Böden mit einem Anteil von weniger als 0,3 % organischem Kohlenstoff können die Korrelation zwischen dem Gehalt an organischen Bestandteilen und der Adsorptionsleistung beeinträchtigen. Daher sollten Böden mit mindestens 0,3 % organischem Kohlenstoff verwendet werden.

Böden mit sehr hohem Kohlenstoffanteil (z. B. >10 %) sind aus rechtlichen Gründen unter Umständen nicht annehmbar (z. B. bei der Registrierung von Pestiziden).

27. Manchmal sind andere Bodentypen erforderlich, wenn die Gegebenheiten in kühleren, gemäßigten oder tropischen Regionen nachgebildet werden sollen. Wenn andere Bodentypen bevorzugt werden, müssen diese daher denselben Parametern entsprechen und sollten sich in ihren Merkmalen in ähnlicher Weise unterscheiden wie die in den Leitlinien zur Auswahl von Böden für Auswaschungstests (siehe vorstehende Tabelle 1) beschriebenen Böden. Dies gilt auch dann, wenn die betreffenden Kriterien nicht genau erfüllt werden.
28. Bei Auswaschungstests mit „gealterten Rückständen“ ist eine Bodenprobe (12) mit einem Sandanteil von > 70 % und einem Anteil von 0,5-1,5 % an organischen Kohlenstoffen zu verwenden (z. B. Boden Nr. 4 in Tabelle 1). Wenn Daten zu den Transformationsprodukten hohe Bedeutung zukommt, müssen unter Umständen mehr Bodentypen verwendet werden.

29. Alle Böden sind mindestens hinsichtlich ihrer Textur (% Sand, % Schluff, % Ton nach FAO- und USDA-Klassifizierung (14)), des pH-Werts, der Kationenaustauschkapazität, des Anteils an organischen Kohlenstoffen, der Schüttdichte (bei gestörten Böden) und der Wasserrückhaltefähigkeit zu beschreiben. Die mikrobielle Biomasse muss nur für die Böden bestimmt werden, die während der Alterungs-/Inkubationsphase vor dem Auswaschungstest mit den gealterten Rückständen verwendet werden. Angaben zu weiteren Merkmalen der Böden (z. B. Klassifizierung, Tonmineralogie, spezifische Oberfläche) können bei der Interpretation der Testergebnisse hilfreich sein. Zur Bestimmung der Bodenbeschaffenheit können die in den Quellen (15)(16)(17)(18)(19) empfohlenen Methoden verwendet werden.

Entnahme und Lagerung der Böden

30. Die Böden sind aus der oberen Schicht (A-Horizont) bis zu einer Tiefe von höchstens 20 cm zu entnehmen. Pflanzenrückstände, Makrofauna und Steine sind zu entfernen. Die Böden (mit Ausnahme der zur Alterung der Prüfchemikalie verwendeten Böden) werden bei Raumtemperatur (vorzugsweise 20-25 °C) an der Luft getrocknet. Die Zerkleinerung des Materials ist unter möglichst geringem Kraftaufwand vorzunehmen, damit die ursprüngliche Textur des Bodens möglichst wenig verändert wird. Die Böden werden mit einem Sieb mit einer Maschenweite von ≤ 2 mm gesiebt. Eine sorgfältige Homogenisierung ist zu empfehlen, da dadurch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbessert wird. Vor der Verwendung können die Böden bei Raumtemperatur gelagert werden; der Feuchtigkeitsgehalt des luftgetrockneten Materials darf dabei nicht verändert werden (12). Zur Lagerfähigkeit werden keine Empfehlungen abgegeben; Böden, die aber länger als drei Jahre gelagert wurden, sollten vor der Verwendung nochmals auf ihren Gehalt an organischen Kohlenstoffen und auf ihren pH-Wert untersucht werden.
31. Zur Geschichte der Feldstandorte, an denen die Testböden entnommen wurden, sollten detaillierte Informationen verfügbar sein. Zu diesen Informationen zählen die genaue Lage (exakt definiert durch UTM (Universale Transversale Mercator-Projektion/European Horizontal Datum) oder geografische Koordinaten) sowie Bewuchs, Behandlungen mit Pestiziden, Behandlungen mit organischen und anorganischen Düngemitteln, biologische Anlagerungen oder unfallbedingte Verschmutzungen (12). Böden, die in den letzten vier Jahren mit der Prüfchemikalie oder mit strukturell analogen Stoffen behandelt wurden, dürfen für Auswaschungstests nicht verwendet werden.

Prüfbedingungen

32. Während des Tests werden die Auswaschungssäulen bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt; wichtig ist, dass eine konstante Raumtemperatur (± 2 °C) besteht. Zu empfehlen sind Temperaturen zwischen 18 und 25 °C.
33. Die Oberfläche der Bodensäulen ist kontinuierlich mit künstlichem Regen (0,01 M

CaCl₂, 200 mm innerhalb von 48 Stunden) zu beregnen;¹ diese Berechnungsmenge entspricht bei einer Wassersäule mit einem Innendurchmesser von 4 cm einem Niederschlag von 251 ml. Wenn für den Test benötigt, kann die künstliche Beregnung modifiziert und die Dauer der Beregnung erhöht werden.

Prüfverfahren

Auswaschen mit der Ausgangsprüfchemikalie

34. Mindestens zwei Auswaschungssäulen werden bis zu einer Höhe von etwa 30 cm mit unbehandeltem, luftgetrockneten und (mit einer Maschenweite von < 2 mm) gesiebttem Bodenmaterial gefüllt. Um eine einheitliche Packung herzustellen, wird der Boden in kleinen Anteilen mit einem Löffel in die Säulen gegeben und mit einem Kolben unter leichtem Vibrieren der Säule verdichtet, bis die Bodensäule nicht mehr weiter nachgibt. Diese einheitliche Packung wird benötigt, um mit den Auswaschungssäulen reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Nähere Informationen zu Verfahren zum Packen der Säulen sind den Quellen (20), (21) und (22) zu entnehmen. Um die Reproduzierbarkeit des Packungsvorgangs kontrollieren zu können, wird das Gesamtgewicht der in die Säulen gepackten Böden ermittelt.² Die beiden verwendeten Säulen müssen ein ähnliches Gewicht haben.
35. Nach dem Packen werden die Bodensäulen mit künstlichem Regen (0,01 M CaCl₂) von unten nach oben vorgetränkt, um in den Bodenporen vorhandene Luft durch Wasser zu verdrängen. Anschließend wird gewartet, bis sich die Säulen ausgeglichen haben und das überschüssige Wasser abgelaufen ist. Methoden zur Sättigung der Säulen werden in (23) erläutert.
36. Anschließend werden die Prüfchemikalie und/oder die Referenzchemikalie in die Bodensäulen gegeben (siehe auch Nummern 23-25). Um eine homogene Verteilung zu erreichen, werden die Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen der Prüfchemikalie und/oder der Referenzchemikalie gleichmäßig auf die Oberfläche der Bodensäulen aufgebracht. Wenn eine Einarbeitung in den Boden empfohlen wird, ist die Prüfchemikalie zunächst in eine geringe Menge (z. B. 20 g) des Bodens zu mischen und auf die Oberfläche der Bodensäule zu bringen.
37. Danach werden die Oberflächen der Bodensäulen mit einer Glassinterplatte, Glasperlen, Glasfaserfiltern oder einem runden Filterpapier bedeckt, damit der künstliche Regen gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilt und die Oberfläche des Bodens nicht durch die Beregnungstropfen gestört wird. Je größer der Durchmesser der Säule, desto sorgfältiger ist bei der künstlichen Beregnung der Bodensäulen vorzugehen, um eine gleichmäßige Verteilung des künstlichen Regens über die

¹ Dies entspricht einem äußerst starken Niederschlag. Der durchschnittliche jährliche Niederschlag beträgt beispielsweise in Mitteleuropa 800-1000 mm.

² Gestörte Böden haben etwa folgende Schüttdichten (Beispiele):

Sandboden 1,66 g • ml⁻¹ lehmiger Sandboden 1,58 g • ml⁻¹
Lehmboden 1,17 g • ml⁻¹ Schluffboden 1,11 g • ml⁻¹

gesamte Bodenfläche sicherzustellen. Der künstliche Regen wird danach mit einer Kolbenpumpe, einer peristaltischen Pumpe oder einem Tropftrichter auf die Bodensäulen getropft. Das Sickerwasser ist vorzugsweise in Fraktionen aufzufangen; die jeweiligen Mengen sind zu protokollieren.¹

38. Nach dem Auswaschen und dem Abtropfen der Säulen werden die Bodensäulen je nach den gemäß dem Test benötigten Informationen in eine geeignete Anzahl an Segmenten geteilt; die Segmente werden mit geeigneten Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen extrahiert und auf die Prüfchemikalie sowie ggf. auf Transformationsprodukte, die Gesamt-Radioaktivität und die Referenzchemikalie analysiert. Das Sickerwasser bzw. die Sickerwasserfraktionen werden unmittelbar nach der Extraktion auf die genannten Produkte untersucht. Wenn radioaktiv markierte Prüfchemikalien verwendet werden, sind alle Fraktionen mit $\geq 10\%$ der eingebrachten Radioaktivität zu ermitteln.

Auswaschen bei gealterten Rückständen

39. Frischer Boden (nicht zuvor luftgetrocknet) wird mit einer der Oberfläche der Bodensäulen angepassten Menge der radioaktiv markierten Prüfchemikalie (siehe Nummer 24) behandelt und unter aeroben Bedingungen gemäß Prüfmethode C.23 inkubiert (13). Die Inkubationsdauer (Alterungsdauer) muss so lang sein, dass erhebliche Mengen an Transformationsprodukten entstehen können; zu empfehlen ist eine Alterung über die Halbwertszeit der jeweiligen Prüfchemikalie;² eine Dauer von 120 Tagen sollte aber nicht überschritten werden. Vor dem Auswaschen wird der gealterte Boden auf die Prüfchemikalie und ihre Transformationsprodukte analysiert.
40. Die Auswaschungssäulen werden bis zu einer Höhe von 28 cm mit dem gleichen Boden (allerdings luftgetrocknet) wie im Alterungstest (siehe Nummer 34) gepackt; anschließend wird das Gesamtgewicht der gepackten Bodensäulen bestimmt. Danach werden die Bodensäulen vorgetränkt, wie in Nummer 35 erläutert.
41. Die Prüfchemikalie und ihre Transformationsprodukte werden in Form von gealterten Bodenrückständen (siehe Nummer 39) als 2 cm starkes Bodensegment auf die Oberfläche der Bodensäulen gebracht. Die Gesamthöhe der Bodensäulen (unbehandelter Boden + gealterter Boden) sollte nicht mehr als 30 cm betragen (siehe Nummer 34).
42. Die Auswaschung wird vorgenommen, wie in Nummer 37 beschrieben.
43. Nach dem Auswaschen werden die Bodensegmente und das Sickerwasser auf die Prüfchemikalie, ihre Transformationsprodukte und nicht extrahierte Radioaktivität

¹ Typische Mengen an Sickerwasser sind etwa 230-260 ml (entsprechend ca. 92-104 % der gesamten künstlichen Beregnung (251 ml)) bei Säulen mit einem Durchmesser von 4 cm und einer Höhe von 30 cm.

² Im Boden können mehrere wesentliche Transformationsprodukte zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf einer Transformationsuntersuchung entstehen. In diesen Fällen müssen unter Umständen Auswaschungstests mit gealterten Rückständen unterschiedlicher Altersstadien durchgeführt werden.

untersucht, wie in Nummer 38 erläutert. Um zu ermitteln, welcher Anteil der gealterten Rückstände in der obersten 2 cm starken Bodenschicht nach dem Auswaschen noch vorhanden ist, wird dieses Segment getrennt analysiert.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

44. Die Anteile der Prüfchemikalie, der Transformationsprodukte und der nicht extrahierbaren radioaktiven Bestandteile sowie – wenn vorhanden – der Referenzchemikalie werden im Prozent bezogen auf die Ausgangsdosis der einzelnen Bodensegmente und der Sickerwasserfraktion angegeben. Für jede Säule werden die ermittelten Prozentanteile bezogen auf die jeweilige Bodentiefe grafisch dargestellt.
45. Wenn bei den Auswaschungstests eine Referenzchemikalie verwendet wurde, kann die Auswaschung der Referenzchemikalie auf einer relativen Skala anhand von relativen Mobilitätsfaktoren (RMF; Begriffsbestimmung siehe Anlage 3) bestimmt werden (1)(11); die RMF ermöglichen einen Vergleich der Auswaschungsdaten verschiedener Chemikalien bei unterschiedlichen Bodentypen. Anlage 3 enthält Beispiele für RMF-Werte verschiedener Wirkstoffe in Pflanzenschutzmitteln.
46. Ungefähre Werte für K_{oc} (normalisierter Adsorptionskoeffizient für organischen Kohlenstoff) und K_{om} (normalisierter Verteilungskoeffizient für organische Bestandteile) können ebenfalls aus den Ergebnissen des Auswaschungstests abgeleitet werden; Ausgangsparameter sind die durchschnittliche Auswaschungshöhe oder festgestellte Korrelationen zwischen dem RMF und K_{om} bzw. K_{oc} (4); alternativ kann von allgemeinen theoretischen Prinzipien der Chromatographie ausgegangen werden (24). Der letztgenannte Ansatz ist jedoch mit Vorsicht zu bewerten, insbesondere wenn das verwendete System bei der Auswaschung eher nicht gesättigt war.

Interpretation der Ergebnisse

47. Die bei dieser Methode beschriebenen Auswaschungstests mit Bodensäulen ermöglichen die Ermittlung der Auswaschung oder des Mobilitätspotenzials der Prüfchemikalie (bei Auswaschungstests mit Ausgangsstoffen) und/oder bei ihren Transformationsprodukten (bei Auswaschungstests mit gealterten Rückständen) aus bzw. in Böden. Aufgrund dieser Tests können keine quantitativen Aussagen über das Auswaschungsverhalten in der Natur getroffen werden; die Tests können aber einen Maßstab für den Vergleich des „Auswaschungsverhaltens“ eines Stoffs mit anderen Stoffen bieten, deren Auswaschungsverhalten vielleicht bereits bekannt ist (24). Ebenso kann nicht ermittelt werden, welcher Prozentanteil des zugeführten Stoffs in das Grundwasser gelangen könnte (11). Die Ergebnisse der Auswaschungstests mit Bodensäulen können aber einen Anhaltspunkt dafür bieten, ob bei Chemikalien mit hohem Mobilitätspotenzial in Labortests weitere Halfreiland- und Freilandtests durchgeführt werden müssen.

Prüfbericht

48. Der Prüfbericht enthält die folgenden Angaben:

Prüfchemikalie und Referenzchemikalie (sofern verwendet):

- allgemeine Bezeichnung (Common name), chemische Bezeichnung (IUPAC- und CAS-Name), CAS-Nummer, chemische Struktur (Position der Markierung, wenn radioaktiv markiertes Material verwendet wurde) und maßgebliche physikalisch-chemische Merkmale;
- Reinheit (Verunreinigungen) der Prüfchemikalie;
- radiochemische Reinheit markierter Chemikalien und (ggf.) spezifische Aktivität.

Im Test verwendete Böden:

- Beschreibung des Entnahmestandorts;
- Merkmale des Bodens (pH-Wert, Gehalt an organischen Kohlenstoffen und an Ton, Textur und Schüttdichte (bei gestörten Böden));
- mikrobiologische Aktivität (nur bei für die Alterung der Prüfchemikalie verwendetem Boden);
- Dauer der Lagerung des Bodens und Lagerbedingungen.

Prüfbedingungen:

- Daten der Durchführung der Tests;
- Länge und Durchmesser der Auswaschungssäulen;
- Gesamtgewicht des Bodens in den Bodensäulen;
- Menge der Prüfchemikalie und ggf. der Referenzchemikalie;
- Umfang, Häufigkeit und Dauer der künstlichen Beregnung;
- Temperatur des Versuchsaufbaus;
- Anzahl der Replikate (mindestens zwei);
- Methoden zur Analyse der Prüfchemikalie, der Transformationsprodukte und ggf. der Referenzchemikalie in den verschiedenen Bodensegmenten und Sickerwasserproben;
- Methoden zur Beschreibung und Identifizierung von Transformationsprodukten in den Bodensegmenten und im Sickerwasser.

Prüfergebnisse:

- Tabellen mit den Testergebnissen, ausgedrückt als Konzentrationen und als Prozentanteile der zugeführten Dosis für Bodensegmente und Sickerwasser;
- Massenbilanz (ggf.);
- Sickerwasservolumen;
- Auswaschungshöhe und ggf. relative Mobilitätsfaktoren;
- grafische Darstellung der ermittelten Prozentanteile in den Bodensegmenten bezogen auf die Tiefe der Bodensegmente;
- Diskussion und Interpretation der Ergebnisse.

LITERATUR

- (1) Guth, J.A., Burkhard, N., und Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.
- (2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals – T.R. Roberts and P.C. Kearney, Hrsg.). J. Wiley & Sons.
- (3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, 1050-1059.
- (4) Chiou, C.T., Porter, P.E., und Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, 227-231.
- (5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.
- (6) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (8) Anhang I der Richtlinie 95/36/EG der Kommission vom 14. Juli 1995 zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln, ABl. L 172, 22.7.1995, S. 8.
- (9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.
- (11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (12) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italien, 18.-20. Januar 1995.
- (13) Die folgenden Kapitel in diesem Anhang:

Kapitel A.4, Dampfdruck
 Kapitel A.6, Wasserlöslichkeit
 Kapitel A.8, Verteilungskoeffizient, Schüttelmethode
 Kapitel A.24, Verteilungskoeffizient, HPLC-Methode
 Kapitel C.7, Abbaubarkeit – abiotischer Abbau: Hydrolyse in Abhängigkeit vom pH
 Kapitel C.18, Adsorption/Desorption nach einer Schüttelmethode
 Kapitel C.23, Aerobe und anaerobe Transformation im Boden

- (14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) und *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26, 305 (1962).
- (15) *Methods of Soil Analysis* (1982/1986). Part 2, Chemical, Physical and Microbiological Properties/Mineralogical Methods (A.L. Page, R.H. Miller und D.R. Kelney, Eds Klute, Ed.). *Agronomy Series No. 9*, 2nd Edition.
- (16) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller und D.R. Kelney, Hrsg.). *Agronomy Series No. 9*, 2nd Edition.
- (17) ISO Standard Compendium Environment (1994). *Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis*. First Edition.
- (18) Mückenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.
- (19) Scheffer, F., und Schachtschabel, P. (1998). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (20) Weber, J.B., und Peeper, T.F. (1977). In *Research Methods in Weed Science*, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). *Soc. Weed Sci.*, Auburn, Alabama, 73-78.
- (21) Weber, J.B., Swain, L.R., Streck, H.J., und Sartori, J.L. (1986). In *Research Methods in Weed Science*, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). *Soc. Weed Sci.*, Champaign, IL, 190-200.
- (22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 60(1): 49-53.
- (23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. – A review. *J. Contam. Hydrol.* 7, 177-217.
- (24) Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In *Environmental Dynamics of Pesticides* (R. Haque, V.H. Freed, Hrsg.), 115-133. Plenum Press, New York.

(25) OECD (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 4112, OECD, Paris

ANLAGE 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND EINHEITEN

Gealterte Bodenrückstände: Prüfchemikalie und Transformationsprodukte, die nach der Applikation und nach einem hinreichend langen Zeitraum für Transport-, Adsorptions-, Stoffwechsel- und Ableitungsprozesse zur Änderung der Verteilung und der chemischen Beschaffenheit eines Anteils des zugeführten Stoffs noch im Boden vorhanden sind (1).

Künstlicher Regen: 0,01 M CaCl₂-Lösung in destilliertem oder entionisiertem Wasser.

Durchschnittliche Auswaschungshöhe (*leaching distance*): [normaler Auswaschungstest] unterste Schicht des Bodensegments, in der die Summe des wiedergefundenen Stoffs 50 % der insgesamt wiedergefundenen Prüfchemikalie entspricht, oder:

[Auswaschungstest mit gealterten Rückständen] unterste Schicht des Bodensegments, in der die Summe des wiedergefundenen Stoffs 50 % der insgesamt wiedergefundenen Prüfchemikalie entspricht – (Höhe der Schicht mit den gealterten Rückständen) / 2).

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch

Sickerwasser: wässrige Phase, die durch ein Bodenprofil oder eine Bodensäule gesickert ist (1).

Auswaschen: Prozess, bei dem sich ein Stoff abwärts durch ein Bodenprofil oder eine Bodensäule bewegt (1).

Auswaschungshöhe: Unterstes Bodensegment, in dem nach dem Auswaschen eine Konzentration von $\geq 0,5$ % der zugeführten Prüfchemikalie oder der gealterten Rückstände ermittelt wurde (entspricht der Eindringtiefe).

Nachweisgrenze (LOD = *Limit of Detection*) und Quantifizierungsgrenze (LOQ = *Limit of Quantification*): Als Nachweisgrenze (LOD) wird die Konzentration eines Stoffs bezeichnet, unter der der Stoff nicht mehr von analytischen Artefakten unterschieden werden kann. Als Quantifizierungsgrenze (LOQ) gilt die Konzentration eines Stoffs, unter der die Konzentrationen nicht mehr mit annehmbarer Genauigkeit bestimmt werden kann.

RMF, relativer Mobilitätsfaktor: (Auswaschungshöhe der Prüfchemikalie (cm)) / (Auswaschungshöhe der Referenzchemikalie (cm))

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

Transformationsprodukt: alle aus biotischen und abiotischen Transformationsreaktionen der Prüfchemikalie entstandenen Chemikalien einschließlich CO₂ und der an Rückstände gebundenen Produkte.

Boden: ein Gemisch mineralischer und organisch-chemischer Bestandteile, wobei

Letztere Verbindungen mit hohem Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt sowie einem hohen Molekulargewicht enthalten und mit kleinen (zumeist Mikro-)Organismen belebt sind; Boden kann in zwei Zustandsformen vorliegen:

- nicht gestört, d. h. so, wie sie sich im Laufe der Zeit entwickelt haben, mit charakteristischen Schichten einer Vielzahl von Bodentypen;
- gestört, d. h. so, wie die Böden gewöhnlich in bewirtschafteten Flächen vorkommen oder wie sie zur Verwendung bei dieser Prüfmethode durch Graben entnommen werden (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, 1167-1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (angenommen am 12. Mai 1981).

ANLAGE 2

**Abbildung 1: Nicht teilbare Auswaschungssäulen aus Glas (Beispiel);
Länge 35 cm, Innendurchmesser 5 cm (1)**



← Tropftrichter für künstliche
Beregnung

← Glassinterplatte, um Störungen
der Bodenoberfläche zu vermeiden
und für eine gleichmäßige
Verteilung des künstlichen Regens
zu sorgen

← Glassäule mit Testboden (wenn
fotolabile Produkte getestet
werden, sind die Säulen mit
Alufolie zu umwickeln)

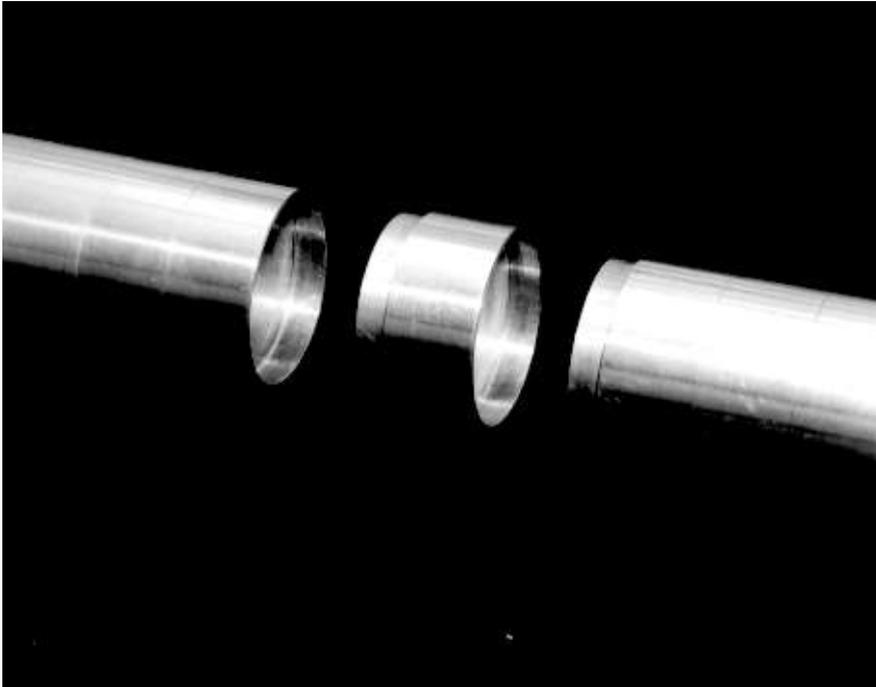
← Quarzsandschicht

← Glaswollestopfen, damit der
Boden nicht aus der Säule rutscht

← Flasche mit rundem Boden zum
Auffangen des Sickerwassers; in
Alufolie eingewickelt, um
Photolyseprozesse zu verhindern

- (1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden – 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Köln.

Abbildung 2: Teilbare Metallsäule mit 4 cm Innendurchmesser (Beispiel) (1)



- (1) Burkhard, N., Eberle D.O., und Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, 203-213

ANLAGE 3

Relative Mobilitätsfaktoren* (RMF) der Wirkstoffe einiger Pflanzenschutzmittel (Beispiele) (1)(2) und entsprechende Mobilitätsklassen⁺

RMF-Bereich	Chemikalie (RMF)	Mobilitätsklasse
≤ 0,15	Parathion (< 0,15), Flurodifen (0,15)	I immobil
0,15 - 0,8	Profenophos (0,18), Propiconazol (0,23), Diazinon (0,28), Diuron (0,38), Terbutylazin (0,52), Methidathion (0,56), Prometryn (0,59), Propazin (0,64), Alachlor (0,66), Metolachlor (0,68)	II leicht mobil
0,8 - 1,3	Monuron** (1,00), Atrazin (1,03), Simazin (1,04), Fluometuron (1,18)	III mäßig mobil
1,3 - 2,5	Prometon (1,67), Cyanazin (1,85), Bromacil (1,91), Karbutilat (1,98)	IV verhältnismäßig mobil
2,5 - 5,0	Carbofuran (3,00), Dioxacarb (4,33)	V mobil
> 5,0	Monocrotophos (> 5,0), Dicrotophos (> 5,0)	VI sehr mobil

* Der relative Mobilitätsfaktor wird wie folgt ermittelt (3):

$$\text{RMF} = \frac{\text{Auswaschungshöhe der Prüfchemikalie (cm)}}{\text{Auswaschungshöhe der Referenzchemikalie (cm)}}$$

** Referenzchemikalie

+ Andere Systeme zur Klassifizierung der Mobilität von Chemikalien im Boden beruhen auf R_f -Werten von Bodenanalysen durch Dünnschichtchromatographie (4) und auf K_{oc} -Werten (5)(6).

- (1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium „Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.“ Canterbury, UK, 1.-3. Juli 1985.
- (2) Guth, J.A., und Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.
- (3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, 214-216.

- (4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 35, 743-748.
- (5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L., und Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In *Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.*
- (6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. *BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water*, 165-174.

C.45. Abschätzung der Emissionen von mit Holzschutzmitteln behandeltem Holz in die Umwelt: Labormethode für unbeschichtete Holzprodukte, die mit Süßwasser oder mit Meerwasser in Berührung kommen

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 313 (2007). Die Emissionen aus mit Holzschutzmitteln behandeltem Holz in die Umwelt müssen quantifiziert werden, um das mit behandeltem Holz verbundene Umweltrisiko bewerten zu können. Diese Prüfmethode beschreibt eine Labormethode zur Abschätzung der Emissionen aus mit Holzschutzmitteln behandeltem Holz in zwei Situationen, bei denen Emissionen in die Umwelt gelangen könnten:
 - Emissionen aus behandeltem Holz, das mit Süßwasser in Berührung kommt, und Emissionen, die bei behandeltem Holz von der Oberfläche in Wasser gelangen könnten;
 - Emissionen aus behandeltem Holz, das mit Süßwasser in Berührung kommt, und Emissionen, die bei behandeltem Holz von der Oberfläche in Meerwasser gelangen könnten.
2. Diese Prüfmethode ist zur Ermittlung der Emissionen aus Hölzern und Holzprodukten vorgesehen, die nicht beschichtet sind und mit Süßwasser oder mit Meerwasser in Berührung kommen. International werden Gebrauchsklassen verwendet, um die biologische Gefährdung zu beschreiben, der behandelte Holzprodukte ausgesetzt sind. Außerdem beschreiben die Klassen die Verwendungssituation der behandelten Produkte und die Umweltbereiche (Luft, Wasser, Boden), die potenziell durch das mit Holzschutzmitteln behandelte Holz gefährdet sein könnten.
3. Die Prüfmethode besteht in einem Laborverfahren zur Gewinnung von Proben (Emissaten) aus dem Wasser, in dem sich das behandelte Holz befunden hat; die Probenahme erfolgt nach zunehmenden Expositionsintervallen. Die Menge der Emissionen im Emissat hängt von der Oberfläche des Holzes und von der Expositionsdauer ab; zu ermitteln ist die Emissionsrate in $\text{mg/m}^2/\text{Tag}$. Auf diese Weise kann die Emissionsrate (die Auswaschungsrate) bei zunehmender Expositionsdauer abgeschätzt werden.
4. Die Menge der Emissionen kann als Parameter in Bewertungen des Umweltrisikos von behandeltem Holz verwendet werden.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

5. Das Auswaschen der Holzoberfläche mit Süßwasser wird hinsichtlich der Art und des Umfangs der Auswaschung nicht als gleichwertig mit dem Auswaschen einer Holzoberfläche durch Meerwasser betrachtet. Für Holzschutzmittel oder entsprechende Gemische zur Behandlung von Holz, das mit Meerwasser in Berührung kommt, muss ein Auswaschungstest mit Meerwasser durchgeführt werden.
6. Mit einem Holzschutzmittel behandeltes Holz muss für das im Handel angebotene

Holz repräsentativ sein. Es muss entsprechend den Anweisungen des Holzschutzmittelherstellers sowie unter Berücksichtigung der geltenden Normen und Spezifikationen behandelt worden sein. Parameter einer Nachbehandlung des Holzes vor Testbeginn sind zu spezifizieren.

7. Die verwendeten Holzproben müssen für die verwendeten Waren repräsentativ sein (bezüglich der jeweiligen Art, der Dichte und sonstiger Merkmale).
8. Der Test kann in Verbindung mit einem Durchdringungsprozess oder einer oberflächlichen Applikation sowie mit Holz durchgeführt werden, das eine zusätzliche obligatorische Oberflächenbehandlung erhält (z. B. eine Lackierung als Voraussetzung für die wirtschaftliche Nutzung).
9. Zusammensetzung, Menge, pH-Wert und physikalische Beschaffenheit des Wassers sind für die Bestimmung des Umfangs, der Art und der Beschaffenheit der von dem Holz ausgehenden Emissionen von Bedeutung.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

10. Proben von mit Holzschutzmitteln behandeltem Holz werden in Wasser eingetaucht. Von dem Wasser (Emissat) werden im Laufe der Expositionsdauer hinreichend oft Proben entnommen und analysiert, um statistische Berechnungen vornehmen zu können. Aus den Ergebnissen der Analysen werden die Emissionsraten in $\text{mg/m}^2/\text{Tag}$ berechnet. Die Zeitintervalle der Probenahmen sind zu protokollieren. Tests mit unbehandelten Proben können abgebrochen werden, wenn für die ersten drei Datenpunkte keine Hintergrundkonzentration festgestellt wurde.
11. Die Berücksichtigung unbehandelter Holzproben ermöglicht die Bestimmung von Hintergrundkonzentrationen der Emissate aus dem Holz, die nicht auf das verwendete Holzschutzmittel zurückzuführen sind.

QUALITÄTSKRITERIEN

Genauigkeit

12. Die Genauigkeit der Prüfmethode zur Abschätzung der Emissionen hängt von der Repräsentativität der im Test verwendeten Proben für das handelsübliche Holz, der Repräsentativität des Wassers für natürliches Wasser und von der Repräsentativität des Expositionsprotokolls für die natürlichen Gegebenheiten ab.
13. Die Genauigkeit, die Präzision und die Wiederholbarkeit der Analysemethode sind vor Beginn des Tests zu ermitteln.

Reproduzierbarkeit

14. Drei Wasserproben werden entnommen und analysiert; der Mittelwert der Proben ist als Emissionswert anzunehmen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Labors und in verschiedenen Labors hängt vom Tauchprotokoll und von den verwendeten Holzproben ab.

Annehmbare Wertebereiche

15. Ein Ergebnisspektrum, bei dem die oberen und die unteren Werte um weniger als eine Größenordnung voneinander entfernt sind, ist bei diesem Test annehmbar.

PRÜFBEDINGUNGEN

Wasser

16. Szenarios für die Auswaschung in Süßwasser: Für den Auswaschungstest wird entionisiertes Wasser (z. B. ASTM D 1193 Typ II) empfohlen, wenn das zu bewertende Holz Süßwasser ausgesetzt wird. Die Wassertemperatur muss bei 20 +/- 2 °C liegen; der gemessene pH-Wert und die Wassertemperatur sind im Prüfbericht zu vermerken. Aufgrund der Analysen der Wasserproben, die vor dem Tauchen der behandelten Proben entnommen wurden, kann der Anteil der zu untersuchenden Stoffe im Wasser abgeschätzt werden. Auf diese Weise können die Hintergrundkonzentrationen von Chemikalien ermittelt werden, welche anschließend einer chemischen Analyse unterzogen werden.
17. Szenarios für die Auswaschung in Meerwasser: Für den Auswaschungstest wird künstliches Meerwasser (z. B. ASTM D 1141, künstliches Meerwasser ohne Schwermetalle) empfohlen, wenn das zu bewertende Holz Meerwasser ausgesetzt wird. Die Wassertemperatur muss bei 20 +/- 2 °C liegen; der gemessene pH-Wert und die Wassertemperatur sind im Prüfbericht zu vermerken. Aufgrund der Analysen der Wasserproben, die vor dem Tauchen der behandelten Proben entnommen wurden, kann der Anteil der zu untersuchenden Stoffe im Wasser abgeschätzt werden. Diese Kontrolle ist für die Analyse der Hintergrundkonzentrationen relevanter Chemikalien von Bedeutung.

Im Test zu verwendende Holzproben

18. Die Holzproben müssen typisch für die tatsächlich zur Prüfung der Wirksamkeit von Holzschutzmitteln verwendete Holzart sein. Empfohlene Arten sind *Pinus sylvestris* L. (Waldkiefer), *Pinus resinosa* Ait. (Rotkiefer) und *Pinus spp* (Südkiefer). Mit anderen Arten können weitere Tests durchgeführt werden.
19. Für die Tests ist geradfaseriges astfreies Holz zu verwenden. Harziges Material ist zu vermeiden. Das Holz muss von typischer handelsüblicher Beschaffenheit sein. Herkunft, Dichte und Anzahl der Jahresringe sind jeweils bezogen auf eine Breite von 10 mm zu protokollieren.
20. Zu empfehlen sind immer jeweils fünf Holzproben in Form von Klötzen gemäß EN 113 (25 mm x 50 mm x 15 mm), deren Längsseiten parallel zur Faser verlaufen; es können aber auch andere Abmessungen (z. B. 50 mm x 150 mm x 10 mm) verwendet werden. Die Holzproben sollten vollständig von Wasser bedeckt sein. Sie müssen vollständig aus Splintholz bestehen. Die Proben werden jeweils individuell gekennzeichnet, damit sie während des gesamten Tests identifiziert werden können.
21. Alle Proben werden gehobelt oder flach gesägt; die Oberflächen dürfen nicht

geschmirgelt werden.

22. Für jede Analyse sind mindestens fünf Gruppen von Holzproben zu verwenden: Drei Gruppen werden mit einem Holzschutzmittel behandelt, eine Gruppe wird nicht behandelt und eine Gruppe wird zur Ermittlung des Feuchtegehalts der unbehandelten Proben nach der Ofentrocknung verwendet. Es werden hinreichend viele Proben hergestellt, damit drei Probengruppen ausgewählt werden können, bei denen die Werte für die Aufnahme des Holzschutzmittels im Bereich von +/- 5 % um die mittleren Aufnahmewerte aller Proben liegen.
23. Alle Proben werden auf der Stirnseite mit einer Chemikalie versiegelt, die das Eindringen des Holzschutzmittels in die Stirnseite und die Auswaschung über die Stirnseite verhindert. Beim Aufbringen der Versiegelung ist zwischen Proben zur Prüfung einer oberflächlichen Applikation und Proben zur Prüfung einer Tiefenimprägnierung zu unterscheiden. Die Aufbringung der Versiegelung auf der Stirnseite muss nur bei der oberflächlichen Applikation vor der Behandlung erfolgen.
24. Bei einer Tiefenimprägnierung muss die Stirnseite für die Holzschutzmittel durchlässig sein. Daher müssen die Proben am Ende der Vorbehandlung versiegelt werden. Die Emissionen sind ausschließlich für die Fläche auf der Längsseite zu bestimmen. Die Versiegelungen sind zu prüfen und gegebenenfalls zu erneuern, bevor mit der Auswaschung begonnen wird. Nach Beginn der Auswaschung darf die Versiegelung nicht noch einmal aufgetragen werden.

Tauchbehältnis

25. Das Behältnis besteht aus inertem Material und ist groß genug zur Aufnahme von fünf Holzproben nach EN113 in 500 ml Wasser bei einem Oberflächen-Wasservolumen-Verhältnis von 0,4 cm²/ml.

Versuchsaufbau (Proben)

26. Die Proben werden so aufgebaut, dass alle exponierten Flächen der Proben mit Wasser in Berührung kommen.

SCHUTZBEHANDLUNG

Vorbereitung der behandelten Proben

27. Die Holzproben, die mit dem zu untersuchenden Holzschutzmittel behandelt werden sollen, werden nach dem für das jeweilige Holzschutzmittel beschriebenen Verfahren behandelt; in Betracht kommen eine Tiefenimprägnierung sowie eine oberflächliche Applikation (etwa durch Tauchen, Sprühen oder Streichen).

In einem Verfahren zur Tiefenimprägnierung aufzubringende Holzschutzmittel

28. Von dem zu prüfenden Holzschutzmittel wird eine Lösung so hergestellt, dass die spezifizierte Aufnahme oder Retention erreicht wird, wenn das Mittel mit einem Verfahren zur Tiefenimprägnierung aufgebracht wird. Die Holzprobe wird gewogen und gemessen. Das Verfahren zur Tiefenimprägnierung ist durchzuführen, wie für die

Applikation des Holzschutzmittels für Holz zur Verwendung gemäß den Gebrauchsklassen 4 oder 5 vorgesehen. Nach der Behandlung wird die Probe nochmals gewogen und mit der folgenden Gleichung die Retention des Holzschutzmittels (kg/m^3) berechnet:

$$\frac{\text{Masse nach Behandlung (kg)} - \text{Masse vor Behandlung (kg)}}{\text{Volumen der Probe (m}^3\text{)}} \times \frac{\text{Konzentration der Lösung (\% Masse / Masse)}}{100}$$

29. Für diesen Test kann in einer Industrieanlage (z. B. durch Vakuumdruckimprägnierung) behandeltes Holz verwendet werden. Die Aufnahmewerte des auf diese Weise behandelten Materials werden ermittelt und sind ebenso wie die verwendeten Verfahren zu protokollieren.

Durch oberflächliche Applikation aufzubringende Holzschutzmittel

30. Die oberflächliche Applikation kann u. a. durch Tauchen, Sprühen oder Streichen der Holzproben erfolgen. Das Verfahren und die Dosis des Holzschutzmittels (z. B. in l/m^2) richten sich nach den Spezifikationen für die oberflächliche Aufbringung des jeweiligen Mittels.
31. Auch in diesem Fall kann in einer Industrieanlage behandeltes Holz für den Test verwendet werden. Die Retentionswerte des auf diese Weise behandelten Materials werden ermittelt und sind ebenso wie die verwendeten Verfahren zu protokollieren.

Weitere Konditionierung der Proben nach der Behandlung

32. Nach der Behandlung werden die behandelten Proben gemäß den Empfehlungen des Holzschutzmittelherstellers auf dem Etikett des Holzschutzmittels bzw. gemäß den bei gewerblicher Verwendung üblichen Verfahren oder nach der Norm EN 252 weiter konditioniert.

Konditionierung und Auswahl der Proben

33. Im Anschluss an die Nachbehandlung wird die mittlere Retention der jeweiligen Probengruppe berechnet, und drei repräsentative Probengruppen mit Retentionswerten im Bereich von $\pm 5\%$ um den Mittelwert der Gruppe werden zufällig für die Auswaschungsmessungen ausgewählt.

MESSUNG DER VON DEN HOLZSCHUTZMITTELN AUSGEHENDEN EMISSIONEN

Tauchverfahren

34. Die Proben werden gewogen und anschließend vollständig in Wasser getaucht; Datum und Uhrzeit werden protokolliert. Um die Verdunstung zu reduzieren, werden die Behältnisse abgedeckt.
35. Das Wasser wird in folgenden Intervallen gewechselt: nach 6 Stunden, 1 Tag, 2 Tagen, 4 Tagen, 8 Tagen, 15 Tagen, 22 Tagen, 29 Tagen. (Hinweis: Dies sind Zeiträume und keine Zeitpunkte.) Zeitpunkt und Datum der Wasserwechsel und die Masse des aus

den Behältnissen entnommenen Wassers sind zu protokollieren.

36. Nach jedem Wasserwechsel wird eine Probe des Wassers, in das die Holzproben eingetaucht waren, zur anschließenden chemischen Analyse aufbewahrt.
37. Das Probenahmeverfahren ermöglicht die zeitbezogene Berechnung des Profils der Emissionsmengen. Die Proben sind unter Bedingungen aufzubewahren, bei denen der Analyt nicht beeinträchtigt wird (z. B. in einem Kühlschrank und vor Lichteinfall geschützt, um die Entwicklung von Mikroorganismen in der Probe vor der Analyse zu reduzieren).

EMISSIONSMESSUNGEN

Behandelte Proben

38. Das entnommene Wasser wird chemisch auf den Wirkstoff und/oder – so weit von Bedeutung – auf relevante Abbau-/Transformationsprodukte untersucht.

Unbehandelte Proben

39. Die Entnahme des Wassers (Emissat) bei diesem System und die anschließende Analyse der aus den unbehandelten Holzproben ausgewaschenen Chemikalien ermöglichen die Abschätzung der potenziellen Emissionsrate des Holzschutzmittels bei dem unbehandelten Holz. Wenn das Emissat nach jeweils längeren Expositionszeiträumen entnommen und analysiert wird, kann die Geschwindigkeit abgeschätzt werden, mit der sich die Emissionsrate im Laufe der Zeit ändert. Dieses Kontrollverfahren dient zur Ermittlung von Hintergrundkonzentrationen der Prüfchemikalie bei unbehandeltem Holz und soll sicherstellen, dass die verwendeten Holzproben tatsächlich nicht vorher mit dem Holzschutzmittel behandelt wurden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Chemische Analysen

40. Das entnommene Wasser wird chemisch analysiert, und die Ergebnisse der Analyse werden in geeigneten Einheiten angegeben (z. B. in $\mu\text{g/l}$).

Datenerfassung

41. Alle Ergebnisse werden protokolliert. In der Anlage sind ein Berichtsformular für eine Gruppe behandelter Proben und die Übersichtstabelle zur Berechnung der mittleren Emissionswerte für die jeweiligen Expositionszeiträume dargestellt.
42. Die tägliche Emissionsrate in $\text{mg/m}^2/\text{Tag}$ wird berechnet, indem der Mittelwert der drei Messungen der drei Replikate durch die Anzahl der Tage im Tauchbad geteilt wird.

Prüfbericht

43. Der Testbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

- Name des Herstellers des zu untersuchenden Holzschutzmittels;
- spezifischer und individueller Name oder Code des zu untersuchenden Holzschutzmittels;
- Handelsname oder allgemeine Bezeichnung (Common name) der Wirkstoffe mit einer allgemeinen Beschreibung der Beistoffe (z. B. zweites Lösungsmittel, Harz) und Angabe der Anteile der verschiedenen Inhaltsstoffe in % m/m;
- für Holz mit Wasserkontakt angegebene relevante Retention oder Aufnahmemasse (in kg/m^3 bzw. l/m^2);
- verwendete Holzart mit Angabe der Dichte und der Wachstumsrate in Ringen je 10 mm;
- Aufnahmemasse oder Retention des getesteten Holzschutzmittels und verwendete Formel zur Berechnung der Retention (in l/m^2 bzw. kg/m^3);
- das Verfahren zur Applikation des Holzschutzmittels unter Angabe des Behandlungsprotokolls bei Tiefenimprägnierung bzw. des Applikationsverfahrens bei oberflächlicher Behandlung;
- Datum der Applikation des Holzschutzmittels und Schätzung des Feuchtegehalts der Proben in Prozent;
- durchgeführte Vorbehandlung (Typ, Bedingungen und Dauer);
- Angaben zur verwendeten Versiegelung der Stirnseite und Anzahl der Behandlungen;
- Angaben zu anschließenden Behandlungen des Holzes (z. B. Hersteller, Typ, Merkmale und Schichtdicke einer Lackierung);
- Zeitpunkt und Datum der Tauchvorgänge, jeweils verwendete Wassermenge beim Eintauchen der Proben und Volumen des im Tauchbad vom Holz aufgenommenen Wassers;
- jegliche Abweichungen von dem beschriebenen Verfahren und sämtliche Faktoren, die sich auf die Ergebnisse ausgewirkt haben könnten.

LITERATUR

- (1) Europäische Norm, EN 84 – 1997. Holzschutzmittel – Beschleunigte Alterung von behandeltem Holz vor biologischen Prüfungen – Auswaschbeanspruchung.
- (2) Europäische Norm, EN 113/A1 – 2004. Holzschutzmittel – Prüfverfahren zur Bestimmung der vorbeugenden Wirksamkeit gegen holzzerstörende Basidiomyceten – Bestimmung der Grenze der Wirksamkeit.
- (3) Europäische Norm, EN 252 – 1989; Holzschutzmittel; Freiland-Prüfverfahren zur Bestimmung der relativen Schutzwirkung eines Holzschutzmittels im Erdkontakt.
- (4) Europäische Norm, EN 335 – Teil 1: 2006. Dauerhaftigkeit von Holz und Holzprodukten – Definition der Gebrauchsklassen – Teil 1: Allgemeines.
- (5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 – 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.
- (6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II – 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

Anlage 1

BERICHTSFORMULAR FÜR DAS PRÜFVERFAHREN

**Abschätzung der Emissionen von mit Holzschutzmitteln behandeltem Holz in die Umwelt:
Labormethode für unbeschichtete Holzprodukte,
die mit Süßwasser oder mit Meerwasser in Berührung kommen**

Testinstitut	
Holzschutzmittel	
Hersteller des Holzschutzmittels	
spezifischer und individueller Name oder Code des Holzschutzmittels	
Handelsname oder allgemeine Bezeichnung (Common name) des Holzschutzmittels	
Beistoffe	
Relevante Retention des Holzes, das mit Wasser in Berührung kommt	
Anwendung	
Applikationsverfahren	
Datum der Applikation	
Formel zur Berechnung der Retention:	
Vorbehandlungsverfahren	
Dauer der Vorbehandlung	
Mittel zur Versiegelung der Stirnseite / Anzahl der Behandlungen	
Folgebehandlung	(gegebenenfalls)
Proben	
Holzart	
Dichte des Holzes	(Mindestwert ... Mittelwert ... Höchstwert)
Wachstumsrate (Ringe je 10 mm)	(Mindestwert ... Mittelwert ... Höchstwert)
Feuchtegehalt	
Versuchsaufbau*	Retention (z. B. kg/m³)
Behandelt: ‚x‘	Mittelwert und Standardabweichung oder Bereich bei 5 Proben
Behandelt: ‚y‘	Mittelwert und Standardabweichung oder Bereich bei 5 Proben
Behandelt: ‚z‘	Mittelwert und Standardabweichung oder Bereich bei 5 Proben
Unbehandelt	
Variable Testparameter	(z. B. Wasserqualität oder Abmessungen der Proben)

* x, y und z bezeichnen die drei Replikate.

Zeit	Wasseraustausch	Probenmasse		Wasseraufnahme		Wasserprobe				
		Behandelt (Mittelwert)	Unbehandelt	Behandelt (Mittelwert)	Unbehandelt		Testwasser	X	y	Z
	Datum	g	g	g	g	Nr.	pH-Wert	pH-Wert	pH-Wert	pH-Wert
Start										
6 h						1				
24 h						2				
2 d						3				
4 d						4				
8 d						5				
15 d						6				
22 d						7				
29 d						8				

Für jeden Wirkstoff sind eigene Tabellen zu erstellen.

Zeit	Wasseraustausch	Analyseergebnisse														
		Unbehandelte Proben			Behandelte Proben											
		Wirkstoffkonzentration in Wasser mg/l	Abgegebene Menge mg/m ²	Emissionsrate mg/m ² /d	Wirkstoffkonzentration in Wasser				Abgegebene Menge				Emissionsrate			
					x	y	z	Mittelwert	x	y	z	Mittelwert	x	y	z	Mittelwert
Datum	mg/l	mg/m ²	mg/m ² /d	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d					
6 h																
24 h																
2 d																
4 d																
8 d																

15 d																	
22 d																	
29 d																	

Hinweis: Da die Emissionsraten behandelter Proben unter Umständen anhand der Ergebnisse unbehauelter Proben korrigiert werden müssen, sind zunächst die Ergebnisse der unbehauelten Proben anzugeben; alle Werte der behandelten Proben sind dann „berichtigte Werte“. Außerdem muss unter Umständen eine Berichtigung der ursprünglichen Wasseranalyse vorgenommen werden.

Anlage 2

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

C.46. Bioakkumulation in sedimentbewohnenden benthischen Oligochaeten

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 315 (2008). Sedimentfressende endobenthische Tiere können den in den Sedimenten gebundenen Stoffen ausgesetzt sein (1). Unter diesen sedimentfressenden Tieren kommt den aquatischen Oligochaeten große Bedeutung für die Sedimente aquatischer Systeme zu. Aquatische Oligochaeten leben in den Sedimenten und sind häufig die am meisten verbreitete Art, insbesondere in Lebensräumen mit für andere Tiere ungünstigen Umweltbedingungen. Durch Bioturbation der Sedimente und als Beutetiere haben sie erheblichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit dieser Chemikalien für andere Organismen (z. B. benthivore Fischarten). Im Gegensatz zu epibenthischen Organismen graben sich endobenthische aquatische Oligochaeten in die Sedimente ein und nehmen unter der Oberfläche der Sedimente befindliche Partikel auf. Daher sind diese Organismen über viele Expositionspfade vorhandenen Stoffen ausgesetzt (u. a. durch direkten Kontakt und durch Aufnahme von kontaminierten Sedimentpartikeln, Porenwasser und Überstandswasser). In Anlage 6 sind einige Arten benthischer Oligochaeten beschrieben, die gegenwärtig in ökotoxikologischen Untersuchungen verwendet werden.
2. Zu den charakteristischen Parametern der Bioakkumulation eines Stoffs gehören an erster Stelle der Bioakkumulationsfaktor (BAF), die Konstante der Sedimentaufnahme (k_s) und die Eliminationskonstante (k_e). Ausführliche Definitionen dieser Parameter sind Anlage 1 zu entnehmen.
3. Um das Bioakkumulationspotenzial von Stoffen im Allgemeinen zu beurteilen und um die Bioakkumulation von Stoffen zu untersuchen, die leicht in oder auf Sedimente gelangen, wird eine für diesen Umweltbereich spezifische Prüfmethode benötigt (1)(2)(3)(4).
4. Mit dieser Prüfmethode soll die Bioakkumulation sedimentgebundener Stoffe in endobenthischen Oligochaeten ermittelt werden. Der Prüfstoff wird in das Sediment dotiert. Durch die Verwendung eines dotierten Sediments soll ein kontaminiertes Sediment simuliert werden.
5. Diese Prüfmethode beruht auf bestehenden Methoden zur Prüfung der Toxizität von Sedimenten und zur Ermittlung der Bioakkumulation (1)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Ebenfalls hilfreich sind die in einem internationalen Workshop (11) geführten Diskussionen und die dort erzielten Ergebnisse sowie das Ergebnis eines internationalen Ringtests (12).
6. Dieser Test bezieht sich auf stabile, neutrale organische Stoffe, die sich leicht an Sedimente binden. Die Bioakkumulation sedimentgebundener, stabiler metallorganischer Verbindungen kann mit dieser Methode ebenfalls gemessen werden (12). Für Metalle und sonstige Spurenelemente ist diese Methode nicht geeignet (11), wenn nicht vorher das Prüfprotokoll hinsichtlich des Substrats und der Wasservolumina sowie möglicherweise der Größe der Gewebeproben modifiziert wird.

VORAUSSETZUNGEN UND INFORMATIONEN ZUM PRÜFSTOFF

7. Zurzeit gibt es nur wenige allgemein anerkannte QSARs (*Quantitative Structure-Activity Relationships* = quantitative Struktur-Aktivitätsbeziehungen) für Bioakkumulationsprozesse (14). Die am weitesten verbreitete Beziehung ist die Korrelation zwischen der Bioakkumulation und der Biokonzentration stabiler organischer Stoffe und ihrer jeweiligen Lipophilie (ausgedrückt als Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{ow}$); Begriffsbestimmung siehe Anlage 1); diese Korrelation wurde entwickelt, um die Verteilung eines Stoffes zwischen Fischen und dem umgebenden Wasser zu beschreiben. Aufgrund dieser Beziehung wurden Korrelationen auch für den Sedimentbereich ermittelt (15)(16)(17)(18). Die Korrelation zwischen $\log K_{ow}$ und $\log BCF$ als wichtiger QSAR kann für eine erste vorläufige Abschätzung des Bioakkumulationspotenzials sedimentgebundener Stoffe hilfreich sein. Der BAF (Bioakkumulationsfaktor) kann jedoch vom Lipidgehalt der Testorganismen und vom Anteil an organischen Kohlenstoffen im Sediment abhängen. Daher kann auch der Koeffizient für die Verteilung organischer Kohlenstoff/Wasser (K_{oc}) als wichtige Determinante der Bioakkumulation sedimentgebundener organischer Stoffe dienen.
8. Dieser Test ist geeignet für:
- stabile organische Stoffe mit $\log K_{ow}$ -Werten zwischen 3,0 und 6,0 (5)(19) und für superlipophile Stoffe mit einem $\log K_{ow}$ -Wert von über 6,0 (5);
 - Stoffe, die zu einer Klasse organischer Stoffe gehören, die für ihr Bioakkumulationspotenzial in lebenden Organismen bekannt sind (z. B. Tenside oder hoch adsorptive Stoffe (z. B. mit hohen K_{oc} -Werten)).
9. Vor der Untersuchung sind Informationen zum Prüfstoff (z. B. Sicherheitsvorkehrungen, geeignete Lagerbedingungen/Stabilität und Analysemethoden) zu beschaffen. Weitere Hinweise zu Prüfstoffen mit physikalisch-chemischen Merkmalen, welche die Durchführung des Tests erschweren, sind den Quellen (20) und (21) zu entnehmen. Vor der Durchführung eines Bioakkumulationstests bei aquatischen Oligochaeten sollte Folgendes über den Prüfstoff bekannt sein:
- Common Name, chemische Bezeichnung (vorzugsweise IUPAC-Name), Strukturformel, CAS-Registernummer, Reinheit;
 - Löslichkeit in Wasser (Prüfmethode A.6 (22));
 - Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, K_{ow} (Prüfmethoden A.8, A.24 (22));
 - Sediment-Wasser-Verteilungskoeffizient, ausgedrückt als K_d oder K_{oc} (Prüfmethode C.19 (22));
 - Hydrolyse (Prüfmethode C.7 (22));
 - Fototransformation in Wasser (23);
 - Dampfdruck (Prüfmethode A.4 (22));
 - leichte biologische Abbaubarkeit (Prüfmethoden C.4 und C.29 (22));
 - Oberflächenspannung (Prüfmethode A.5 (22));
 - kritische Micellenkonzentration (24).
- Außerdem sind – soweit verfügbar – folgende Informationen von Interesse:
- biologischer Abbau in aquatischer Umgebung (Prüfmethoden C.24 und C.25 (22));
 - Henry-Konstante.

10. Radioaktiv markierte Prüfstoffe können die Analyse von Wasser, Sedimenten und biologischen Proben erleichtern; außerdem kann anhand radioaktiv markierter Prüfstoffe festgestellt werden, ob Abbauprodukte identifiziert und quantifiziert werden müssen. Die hier beschriebene Methode wurde in einem internationalen Ringtest (12) mit Stoffen validiert, die mit ^{14}C markiert wurden. Wenn die Summe radioaktiver Rückstände gemessen wird, beruht der BAF (Bioakkumulationsfaktor) auf dem Ausgangsstoff einschließlich gebundener Abbauprodukte. Außerdem kann eine Untersuchung des Stoffwechsels mit einem Bioakkumulationstest kombiniert werden, indem der Prozentanteil des Ausgangsstoffs und seiner Abbauprodukte in Proben ermittelt wird, die am Ende der Aufnahme-Phase oder zum Zeitpunkt der maximalen Bioakkumulation entnommen wurden. In jedem Fall wird empfohlen, bei der Berechnung des BAF von der Konzentration des Ausgangsstoffs in den Organismen und nicht allein von der Summe der radioaktiven Rückstände auszugehen.
11. Zusätzlich zu den Merkmalen des Prüfstoffs werden Informationen über die Toxizität für die im Test zu verwendende Oligochaetenart benötigt (z. B. der Medianwert der letalen Konzentration (LC_{50}) in der Aufnahme-Phase, um sicherzustellen, dass die ausgewählten Expositionskonzentrationen deutlich unter den toxischen Konzentrationen liegen. Nach Möglichkeit sind Toxizitätswerte zu verwenden, die in Langzeituntersuchungen subletaler Endpunkte (EC_{50}) ermittelt wurden. Wenn derartige Daten nicht verfügbar sind, können Daten aus einem Test zur akuten Toxizität unter den Bedingungen des Bioakkumulationstests oder Toxizitätsdaten zu stellvertretenden Arten hilfreich sein.
12. Eine geeignete Analyse-Methoden von bekannter Genauigkeit, Präzision und Empfindlichkeit sollte für die Quantifizierung des Prüfstoffs in den Testlösungen, im Sediment und im biologischen Material ebenso verfügbar sein wie Einzelheiten zur Probenvorbereitung und -aufbewahrung und Sicherheitsdatenblätter. Auch die analytischen Nachweisgrenzen des Prüfstoffs in Wasser, Sedimenten und Wurmgewebe sollten bekannt sein. Wenn ein radioaktiv markierter Prüfstoff verwendet wird, müssen auch die spezifische Radioaktivität (in Bq mol^{-1}), die Position des radioaktiv markierten Atoms und der Prozentanteil der an Verunreinigungen gebundenen Radioaktivität bekannt sein. Die spezifische Radioaktivität des Prüfstoffs sollte möglichst hoch sein, damit möglichst niedrige Testkonzentrationen nachgewiesen werden können (11).
13. Informationen zu Merkmalen des zu verwendenden Sediments (Herkunft oder Bestandteile des Sediments, pH-Wert und Ammoniakkonzentration des Porenwassers (Feldsedimente), Gehalt an organischen Kohlenstoffen (TOC), Partikelgrößenverteilung (Prozentanteile an Sand, Schluff und Ton), Trockenmasse in Prozent usw.) sollten verfügbar sein (6).

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

14. Der Test besteht aus zwei Phasen: der Aufnahme-(Expositions-)Phase und der Eliminations-(Post-Expositions-)Phase. In der Aufnahme-Phase werden die Würmer dem mit dem Prüfstoff dotierten Sediment ausgesetzt; das Sediment ist mit rekonstituiertem Wasser bedeckt, gegebenenfalls muss abgewartet werden, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat (11). Gruppen mit Kontrollwürmern werden unter identischen Bedingungen, aber ohne den Prüfstoff kultiviert.

15. Für die Eliminationsphase werden die Würmer in ein prüfstofffreies Sediment-Wasser-System umgesetzt. Um Informationen über die Geschwindigkeit zu erhalten, mit der der Prüfstoff durch die Testorganismen ausgeschieden wird, ist eine Eliminationsphase grundsätzlich erforderlich (19)(25). Die Eliminationsphase ist nur dann verzichtbar, wenn der Prüfstoff in der Expositionsphase nur in unerheblichem Umfang aufgenommen wurde (d. h., wenn beispielsweise kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Konzentration des Prüfstoffs im Test und in den Kontrollwürmern besteht). Wenn in der Aufnahme-Phase kein Gleichgewichtszustand erreicht wurde, kann aufgrund der Ergebnisse in der Eliminationsphase die Kinetik – BAF_k , Konstante(n) der Aufnahme- und der Eliminationsrate – bestimmt werden. Die Konzentration des Prüfstoffs in/an den Würmern wird während der beiden Phasen durchgehend auf Veränderungen überwacht.
16. In der Aufnahme-Phase werden Messungen vorgenommen, bis der BAF ein Plateau oder einen Gleichgewichtszustand erreicht hat. Die Aufnahme-Phase beträgt in der Regel 28 Tage. Praktische Erfahrungen haben gezeigt, dass bei verschiedenen stabilen, neutralen organischen Stoffen bereits in einer Aufnahme-Phase von 12-14 Tagen ein Gleichgewichtszustand erreicht wird (6)(8)(9).
17. Wenn auch nach 28 Tagen kein Gleichgewichtszustand erreicht wird, beginnt die Eliminationsphase, indem die exponierten Oligochaeten in Gefäße mit demselben Medium, aber ohne den Prüfstoff umgesetzt werden. Die Eliminationsphase wird beendet, wenn entweder 10 % der an Tag 28 der Aufnahme-Phase in den Würmern gemessenen Konzentration erreicht ist oder nachdem maximal 10 Tage vergangen sind. Die Rückstandskonzentrationen in den Würmern am Ende der Eliminationsphase werden als zusätzlicher Endpunkt protokolliert (z. B. als NER (nicht eliminierte Rückstände)). Der Bioakkumulationsfaktor (BAF_{ss}) wird vorzugsweise sowohl als Verhältnis der Konzentration in den Würmern (C_a) und im Sediment (C_s) nach Erreichen eines offensichtlichen Gleichgewichtszustands als auch als kinetischer Bioakkumulationsfaktor (BAF_k), ausgedrückt als Verhältnis der Konstante der Aufnahme-Phase (Aufnahme aus dem Sediment) (k_s) zur Konstante der Eliminationsrate (k_e) bei angenommener Kinetik erster Ordnung, berechnet. Wenn in 28 Tagen kein Gleichgewichtszustand erreicht wird, ist BAF_k aus den Konstanten der Aufnahme-Phase und der Eliminationsrate zu ermitteln. Das Berechnungsverfahren wird in Anlage 2 erläutert. Wenn nicht von einer Kinetik erster Ordnung ausgegangen werden kann, sind komplexere Modelle zu verwenden (Anlage 2 und Quelle (25)).
18. Wenn in 28 Tagen kein Gleichgewichtszustand erreicht wird, kann die Aufnahme-Phase auch verlängert werden, indem Gruppen exponierter Würmer – soweit verfügbar – weiteren Messungen unterzogen werden, bis der Gleichgewichtszustand gegeben ist. Die Eliminationsphase beginnt jedoch trotzdem parallel an Tag 28 der Aufnahme-Phase.
19. Die Aufnahmekonstante, die Eliminationskonstante (oder Konstanten, wenn komplexere Modelle verwendet werden), der kinetische Bioakkumulationsfaktor (BAF_k) und, wenn möglich, die Konfidenzgrenzen eines jeden dieser Parameter werden anhand computergestützter Modellgleichungen berechnet (Modelle siehe Anlage 2). Die Anpassungsgüte eines Modells lässt sich z. B. anhand des Korrelationskoeffizienten oder des Bestimmungskoeffizienten feststellen. (Koeffizienten nahe an 1 deuten auf eine gute Anpassung hin.)

20. Um Schwankungen der Testergebnisse bei organischen Stoffen mit hoher Lipophilie zu reduzieren, sind die Bioakkumulationsfaktoren außerdem bezogen auf den Lipidgehalt der Testorganismen und auf den Gehalt des Sediments an organischen Kohlenstoffen (TOC) (Biota-Sediment-Akkumulationsfaktor oder BSAF in $\text{kg TOC Sediment kg}^{-1}$ Lipidgehalt der Würmer) auszudrücken. Dieser Ansatz beruht auf Erfahrungen und theoretischen Korrelationen des aquatischen Kompartiments, wenn – bei einigen Chemikalienklassen – eine eindeutige Beziehung zwischen dem Bioakkumulationspotenzial eines Stoffes und seiner Lipophilie besteht, die für Fische als Modellorganismen gut dokumentiert wurde (14)(25)(27). Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen dem Lipidgehalt der Testfische und der festgestellten Bioakkumulation solcher Stoffe. Für benthische Organismen wurden ähnliche Korrelationen festgestellt (15)(16)(17)(18). Wenn genügend Wurmgewebe zur Verfügung steht, kann der Lipidgehalt der Testtiere mit dem biologischen Material bestimmt werden, das auch für die Bestimmung der Prüfstoffkonzentration verwendet wurde. Aus praktischen Gründen sollten akklimatisierte Kontrolltiere zumindest zu Beginn oder – vorzugsweise – am Ende der Aufnahmeperiode verwendet werden, um den Lipidgehalt zu messen; dieser kann dann zur Normalisierung der BAF-Werte verwendet werden.

VALIDITÄT DES TESTS

21. Der Test ist gültig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:
- Die kumulative Mortalität der Würmer (Kontrollen und Behandlungen) bis Ende des Tests darf sich höchstens auf 20 % der ursprünglichen Anzahl belaufen.
 - Außerdem ist nachzuweisen, dass sich die Würmer in das Sediment eingraben, damit eine größtmögliche Exposition gegeben ist (siehe Nummer 28).

BESCHREIBUNG DER METHODE

Testspezies

22. Für den Test können verschiedene Arten aquatischer Oligochaeten verwendet werden. In Anlage 6 werden die gebräuchlichsten Arten genannt.
23. In regelmäßigen Intervallen (z. B. einmal monatlich) werden Toxizitätstests (96 h, nur in Wasser) mit einem Referenzgiftstoff wie z. B. Kaliumchlorid (KCl) oder Kupfersulfat (CuSO_4) durchgeführt (1), um Aufschluss über den Gesundheitszustand der Testtiere zu erhalten (1)(6). Wenn nicht regelmäßig Referenz-Toxizitätstests durchgeführt werden, ist die Charge der in einem Sediment-Bioakkumulationstest zu verwendenden Organismen anhand eines Referenzgiftstoffs zu prüfen. Auch aufgrund von Messungen des Lipidgehalts können Rückschlüsse auf den Zustand der Tiere gezogen werden.

Kultivierung der Testorganismen

24. Damit eine ausreichende Anzahl an Würmern für die Sediment-Bioakkumulationstests verfügbar ist, müssen die Würmer unter Umständen in einer Dauerkultur mit einer einzigen Art vorrätig gehalten werden. Labormethoden zur Kultivierung der für den Test ausgewählten Arten werden in Anlage 6 beschrieben. Nähere Informationen sind

den folgenden Quellen zu entnehmen: (8)(9)(10)(18)(28)(29)(30)(31)(32).

Apparatur

25. Die Verwendung von Materialien, die sich auflösen können, die Prüfstoffe absorbieren oder andere chemische Stoffe auslaugen bzw. schädigende Auswirkungen auf die Testtiere haben können, sollte für alle verwendeten Teile unbedingt vermieden werden. Es können rechteckige oder zylindrische Standardkammern aus chemisch inertem Material, die ein der Besatzdichte (Anzahl der Testwürmer) entsprechendes Fassungsvermögen haben, verwendet werden. Die Verwendung weicher Kunststoffschläuche zur Zuführung von Wasser oder Luft ist zu vermeiden. Geräte, die mit dem Prüfmedium in Berührung kommen, können aus Polytetrafluorethylen, rostfreiem Stahl und/oder Glas bestehen. Bei Stoffen mit hohen Adsorptionskoeffizienten, wie z. B. synthetischen Pyrethroiden, kann die Verwendung von silanisiertem Glas nötig sein. In solchen Fällen muss die Apparatur/Anlage nach der Benutzung entsorgt werden (5). Bei radioaktiv markierten Prüfstoffen und bei flüchtigen Stoffen ist darauf zu achten, dass es nicht zu einem Stripping und zum Austreten des gestrippten Prüfstoffs kommt. Dazu sind Abscheider (z. B. Gaswaschflaschen aus Glas) mit geeigneten Adsorberstoffen zu verwenden, um etwaige Rückstände aufzufangen, die aus den Prüfgefäßen verdunsten könnten (11).

Wasser

26. Die Qualität des Überstandswassers sollte so beschaffen sein, dass die im Test verwendete Art während der Akklimatisierungs- und Testphasen überleben kann, ohne ein abnormales Aussehen oder Verhalten zu entwickeln. Als Überstandswasser für die Tests und für die Laborkulturen der Würmer wird rekonstituiertes Wasser gemäß der Prüfmethode C.1 (25) empfohlen. Es wurde nachgewiesen, dass mehrere für den Test geeignete Arten in diesem Wassertyp überleben, wachsen und sich vermehren (8); außerdem ist eine größtmögliche Standardisierung der Testbedingungen und der Kulturbedingungen gewährleistet. Das Wasser ist mindestens unter Angabe des pH-Werts, der Leitfähigkeit und der Härte zu beschreiben. Mit Wasseranalysen auf Mikroverunreinigungen vor der Verwendung können hilfreiche Informationen ermittelt werden (Anlage 4).
27. Während der gesamten Testdauer muss eine konstante Wasserqualität aufrechterhalten werden. Der pH-Wert des Überstandswassers muss zwischen 6 und 9 liegen. Die Gesamthärte liegt zu Beginn des Tests bei 90-400 mg CaCO₃ pro Liter (7). In der Prüfmethode C.1 (25) werden die pH- und Härtebereiche des genannten rekonstituierten Wassers genannt. Wenn eine Wechselwirkung zwischen den Härte-Ionen und dem Prüfstoff zu erwarten ist, muss Wasser geringerer Härte verwendet werden. Anlage 4 gibt einen Überblick über die zusätzlichen Kriterien für annehmbares Verdünnungswasser entsprechend der OECD-Prüfrichtlinie 210 (34).

Sediment

28. Die Qualität des Sediments sollte so beschaffen sein, dass die Testorganismen während der Akklimatisierungs- und Testphasen überleben und sich möglichst vermehren können, ohne ein abnormales Aussehen oder Verhalten zu zeigen. Die Würmer sollten sich in das Sediment eingraben. Ob sich die Würmer eingraben, kann Einfluss auf die Exposition und entsprechend auf den BAF haben. Daher ist – soweit

die Trübheit des Überstandswassers dies zulässt – zu protokollieren, ob die Testorganismen das Sediment verlassen oder sich in das Sediment eingraben. Die Würmer (Kontrollen und Proben mit den Prüfstoffen) müssen sich innerhalb von 24 h nach dem Einsetzen in die Prüfgefäße in das Sediment eingegraben haben. Wenn beobachtet wird, dass die Würmer sich nicht eingraben oder ständig (z. B. mehr als 20 % über mehr als die Hälfte der Aufnahmephase) das Sediment verlassen, deutet dies darauf hin, dass entweder die Prüfbedingungen nicht angemessen sind oder dass die Testorganismen nicht gesund sind oder dass dieses Verhalten auf die Konzentration des Prüfstoffs zurückzuführen ist. In diesem Fall muss der Test gestoppt und unter günstigeren Bedingungen wiederholt werden. Weitere Informationen über die Sedimentaufnahme sind mit den in (35) und (36) beschriebenen Methoden zu beschaffen, mit denen die Sedimentaufnahme und die Partikelauswahl durch die Testorganismen bestimmt werden können. So weit feststellbar ist zumindest das Vorkommen bzw. Fehlen von Kotbällchen auf der Oberfläche des Sediments als Maßstab für die Sedimentaufnahme durch die Würmer zu protokollieren; dieser Parameter kann für die Interpretation der Testergebnisse im Hinblick auf die Expositionspfade von Bedeutung sein.

29. Sowohl für die Tests als auch für die Laborkulturen der Würmer (Anlage 5) wird ein auf dem im Zusammenhang mit Prüfmethode C.8 (40) beschriebenen künstlichen Boden beruhendes künstliches Sediment empfohlen, da natürliche Sedimente geeigneter Qualität unter Umständen nicht ganzjährig verfügbar sind. Außerdem können in natürlichen Sedimenten vorkommende einheimische Organismen sowie eventuell vorhandene Mikroverunreinigungen die Testergebnisse beeinflussen. Mehrere in den Tests zu verwendende Arten überleben, wachsen und vermehren sich in künstlichem Sediment (8).
30. Das künstliche Sediment muss mindestens durch die Herkunft seiner Bestandteile, die Korngrößenverteilung (Prozent Sand, Schluff und Ton), den organisch gebundenen Kohlenstoff (TOC), den Wassergehalt und den pH-Wert beschrieben werden. Außerdem kann das Redoxpotenzial gemessen werden. Natürliche Sedimente von nicht kontaminierten Standorten können ebenfalls als Prüf- und/oder Anzuchtsedimente dienen (1). Zur Charakterisierung von natürlichen Sedimenten sind zumindest die Herkunft (Entnahmestandort), der pH-Wert und der Ammoniakgehalt des Porenwassers, der Gehalt an organischem Kohlenstoff, die Korngrößenverteilung (Anteil an Sand, Schluff und Lehm) und der prozentuale Wassergehalt anzugeben (6). Ferner wird empfohlen, natürliches Sediment vor dem Spiken mit dem Prüfstoff für sieben Tage unter denselben Bedingungen wie im anschließenden Test zu konditionieren, wenn die Bildung von Ammoniak zu erwarten ist. Nach dieser Konditionierung ist das Überstandswasser zu entfernen und zu entsorgen. Eine vor Gebrauch durchgeführte Analyse des Sediments oder seiner Bestandteile auf Mikroschadstoffe könnte nützliche Informationen liefern.

Zubereitung

31. Die Handhabung natürlicher Sedimente vor der Verwendung im Labor wird in den Quellen (1)(6)(44) beschrieben. Wie das künstliche Sediment vorzubereiten ist, wird in Anlage 5 erläutert.

Lagerung

32. Natürliche Sedimente sollten im Labor so kurz wie möglich gelagert werden. Nach Empfehlungen der US-amerikanischen EPA (6) beträgt die Haltbarkeit bei Lagerung im Dunkeln bei einer Temperatur von 4 ± 2 °C maximal 8 Wochen. Über dem Sediment darf sich in den Vorratsbehältnissen kein Kopfraum mehr befinden. Empfehlungen für die Lagerung künstlicher Sedimente sind Anlage 5 zu entnehmen.

Applikation des Prüfstoffs:

33. Der Prüfstoff wird in das Sediment dotiert. Zur Dotierung werden ein oder mehrere Bestandteile des Sediments mit dem Prüfstoff behandelt. So kann z. B. der Quarzsand (oder ein Teil davon, beispielsweise 10 g je Prüfgefäß) mit einer Lösung des Prüfstoffs in einem geeigneten Lösungsmittel durchtränkt werden; das Lösungsmittel wird anschließend durch Trocknen abgedampft. Die beschichtete Quarzsandfraktion wird sodann mit dem befeuchteten Sediment vermischt. Bei der Zubereitung des Sediments ist die im Gemisch aus Prüfstoff und Sand enthaltene Sandmenge zu berücksichtigen (d. h. das Sediment sollte mit weniger Sand zubereitet werden) (6).
34. Bei natürlichen Sedimenten kann der Prüfstoff, wie oben für das künstliche Sediment beschrieben, durch Dotieren eines luftgetrockneten Teils des Bodens oder durch Einrühren des Prüfstoffs in den feuchten Boden mit anschließendem Abdampfen im Falle der Verwendung eines Lösungsmittels hinzugefügt werden. Geeignete Lösungsmittel zum Dotieren feuchter Sedimente sind Ethanol, Methanol, Ethylenglycolmonomethylether, Ethylenglycoldimethylether, Dimethylformamid und Triethylenglycol (5)(34). Hauptkriterien für die Wahl eines geeigneten Lösungsvermittlers sollten die Toxizität und Flüchtigkeit des Lösungsmittels und die Löslichkeit des Prüfstoffs in dem gewählten Lösungsmittel sein. Weitere Hinweise zu Dotierungsverfahren sind *Environment Canada (1995)* zu entnehmen (41). Es ist darauf zu achten, dass der Prüfstoff gut mit dem Sediment gemischt wird, damit sie in dem Sediment homogen verteilt ist. Unterproben (Replikate) des dotierten Sediments werden analysiert, um die Konzentrationen des Prüfstoffs im Sediment und die Homogenität der Verteilung des Prüfstoffs zu ermitteln.
35. Nach Fertigstellung des dotierten Sediments mit dem überschichteten Wasser ist abzuwarten, bis sich der Prüfstoff zwischen dem Sediment und der wässrigen Phase verteilt hat. Dies sollte bevorzugt unter denselben Temperatur- und Belüftungsbedingungen wie im Versuch erfolgen. Die erforderliche Zeit für die Einstellung des Gleichgewichts hängt vom Sediment und der Chemikalie ab. In einigen Fällen reichen ein paar Stunden oder Tage, in seltenen Fällen können sogar mehrere Wochen (4-5 Wochen) erforderlich sein (28)(42)). Bei diesem Test wird eine Gleichgewichtseinstellung nicht abgewartet; es wird jedoch eine Wartezeit von 48 Stunden bis 7 Tagen empfohlen. Je nach Zweck der Untersuchung (z. B. Nachbildung von Umweltbedingungen) kann ein Gleichgewicht des dotierten Sediments bewirkt oder das Sediment auch über einen längeren Zeitraum stehen gelassen werden (11).

DURCHFÜHRUNG DER PRÜFUNG

Vorversuch

36. Die Durchführung eines Vorversuchs kann hilfreich sein, um die Prüfbedingungen des

definitiven Tests zu optimieren (beispielsweise hinsichtlich der Festlegung der Prüfstoffkonzentration(en) und der Dauer der Aufnahme- und der Eliminationsphase). Verhaltensweisen der Würmer (z. B. das Hervorkommen aus dem Sediment), die auf den Prüfstoff und/oder das Sediment an sich zurückzuführen sein könnten, sind in einem Vorversuch zu erfassen und zu protokollieren. Das Verlassen des Sediments kann in einem Vorversuch zur Abschätzung der Prüfstoffkonzentration(en) für einen Bioakkumulationstest auch als subletaler Parameter verwendet werden.

Expositionsbedingungen

Dauer der Aufnahmephase

37. Die Testorganismen werden während der Aufnahmephase gegenüber dem Prüfstoff exponiert. Die erste Probe wird 4-24 h nach Beginn der Eliminationsphase genommen. Die Aufnahmephase kann bis zu 28 Tage dauern (1)(6)(11), wenn nicht nachgewiesen wurde, dass ein Gleichgewicht bereits vorher erreicht ist. Der Gleichgewichtszustand ist gegeben, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind: (i) Die Kurve der Bioakkumulationsfaktoren zu den verschiedenen Zeitpunkten der Probenahme verläuft parallel zur Zeitachse, (ii) drei aufeinanderfolgende Analysen der BAF an Proben, die im Abstand von mindestens zwei Tagen genommen wurden, unterscheiden sich um höchstens $\pm 20\%$, und (iii) es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeiträumen der drei Probenahmen (statistischen Vergleichen beispielsweise anhand von Varianz- und Regressionsanalysen zufolge). Wenn in 28 Tagen kein Gleichgewichtszustand erreicht wurde, kann die Aufnahmephase durch Einleitung der Eliminationsphase beendet werden; danach kann aus den Konstanten der Aufnahme- und der Eliminationsrate der BAF_K berechnet werden (siehe auch Nummern 16-18).

Dauer der Eliminationsphase

38. Die erste Probe ist 4-24 h nach Beginn der Eliminationsphase zu nehmen, da in der Anfangsphase rasche Änderungen hinsichtlich der Rückstände in Geweben auftreten können. Die Eliminationsphase ist entweder wenn die Konzentration des Prüfstoffs weniger als 10 % der Gleichgewichtskonzentration beträgt oder spätestens nach 10 Tagen zu beenden. Die Rückstandswerte der Würmer am Ende der Eliminationsphase werden als ein zweiter Endpunkt protokolliert. Die Dauer der Phase kann jedoch von dem Zeitraum abhängen, über den die Konzentration des Prüfstoffs in den Würmern oberhalb der analytischen Nachweisgrenze bleibt.

Testorganismen

Anzahl der Testwürmer

39. Die in einer Probe enthaltenen Würmer müssen so viel Wurmgewebe ergeben, dass die Masse des Prüfstoffs pro Probe zu Beginn der Aufnahmephase und am Ende der Eliminationsphase erheblich über der Nachweisgrenze des Prüfstoffs in biologischem Material liegt. In den genannten Stadien der Aufnahme- und der Eliminationsphase ist die Konzentration in den Testtieren gewöhnlich verhältnismäßig gering (6)(8)(18). Da das individuelle Gewicht bei vielen Arten aquatischer Oligochaeten sehr gering ist (5-10 mg Feuchtmasse pro Tier bei *Lumbriculus variegatus* und *Tubifex tubifex*), können die Würmer einer Replikatkammer zum Wiegen und zur Analyse auf die Prüfchemikalie gepoolt werden. Bei Arten mit höherem individuellem Gewicht (z. B.

Branchiura sowerbyi) können Replikate mit jeweils einem Tier verwendet werden; in diesen Fällen ist jedoch die Anzahl der Replikate auf fünf pro Zeitpunkt der Probenahme zu erhöhen (11). Es ist jedoch zu beachten, dass *B. sowerbyi* im Ringtest nicht berücksichtigt wurde (12); dementsprechend wird diese Art für diese Methode nicht ausdrücklich empfohlen.

40. Im Test sind Würmer ähnlicher Größe zu verwenden (zu *L. variegatus* siehe Anlage 6). Es sollten adulte oder große Tiere identischer Herkunft und derselben Altersklasse sein (siehe Anlage 6). Das Gewicht und das Alter eines Tieres kann entscheidenden Einfluss auf die BAF-Werte haben (beispielsweise aufgrund unterschiedlicher Lipidgehalte und/oder weil Eier vorhanden sind). Diese Parameter sind genau zu protokollieren. Zur Feststellung der mittleren Feucht- und Trockenmasse wird vor Beginn des Tests eine Unterprobe der Würmer gewogen.
41. Bei *Tubifex tubifex* und *Lumbriculus variegatus* ist während der Dauer des Tests eine Vermehrung zu erwarten. Eine fehlende Reproduktion bei einem Bioakkumulationstest ist zu protokollieren und bei der Interpretation der Testergebnisse zu berücksichtigen.

Besatz

42. Um die Verringerung der Prüfstoffkonzentration im Sediment während der Aufnahmephase und einen Rückgang der Konzentration an gelöstem Sauerstoff zu verhindern, ist ein hohes Verhältnis von Sedimenten zu Würmern und von Wasser zu Würmern erforderlich. Die gewählte Besatzrate sollte auch den in der Natur gegebenen Populationsdichten der ausgewählten Art entsprechen (43). Bei *Tubifex tubifex* beispielsweise ist eine Besatzrate von 1-4 mg Wurmgewebe (Feuchtmasse) pro Gramm feuchtes Sediment zu empfehlen (8)(11). In den Quellen (1) und (6) wird für *L. variegatus* eine Besatzrate von ≤ 1 g Wurmgewebe (Trockenmasse) je 50 g organischer Kohlenstoff im Sediment empfohlen.
43. Die in einem Test zu verwendenden Würmer werden durch Aussieben des Kultursediments aus der Kultur gewonnen. Die Tiere (adulte oder große Tiere, die keine Anzeichen einer kürzlich erfolgten Teilung aufweisen) werden in Glasgefäße (z. B. Petrischalen) mit sauberem Wasser gesetzt. Wenn sich die Testbedingungen von den Kulturbedingungen unterscheiden, ist eine Akklimatisierung vorzunehmen; eine Akklimatisierungsphase von 24 Stunden dürfte ausreichend sein. Vor dem Wiegen ist überschüssiges Wasser aus den Würmern zu entfernen. Dazu können die Würmer vorsichtig auf ein befeuchtetes Papiertuch gelegt werden. Es wird nicht empfohlen, die Würmer mit saugendem Papier zu trocknen, da die Würmer dadurch eine Stressbelastung erfahren oder beschädigt werden könnten. Brunson et al. (1998) empfehlen die Verwendung nicht trockengetupfter Würmer mit etwa dem 1,33-Fachen der gewünschten endgültigen Biomasse. Die Zugabe von 33 % entspricht dem Unterschied zwischen der Masse trockengetupfter und nicht abgetrockneter Würmer (28).
44. Zu Beginn der Aufnahmephase (Tag 0 des Tests) werden die Testorganismen aus der Akklimatisierungskammer genommen und randomisiert auf die Gefäße (z. B. Petrischalen) mit rekonstituiertem Wasser verteilt, indem jeweils zwei Würmer in die Gefäße gegeben werden, bis sich in jedem Gefäß zehn Würmer befinden. Die Gruppen werden dann zufällig auf getrennte Prüfgefäße verteilt (z. B. mit einer weichen Stahlpinzette). Danach werden die Prüfgefäße unter Testbedingungen inkubiert.

Fütterung

45. Angesichts des niedrigen Nährstoffgehalts des künstlichen Sediments ist das Sediment mit Futter anzureichern. Damit die Exposition der Testorganismen nicht unterschätzt wird (indem beispielsweise selektiv nicht kontaminiertes Futter bereitgestellt wird), muss das zum Wachstum und zur Vermehrung der Testorganismen benötigte Futter mit einem Mal vor oder während der Applikation des Prüfstoffs bereitgestellt werden (siehe Anlage 5).

Sediment-Wasser-Verhältnis

46. Das empfohlene Sediment-Wasser-Verhältnis beträgt 1:4 (45). Dieses Verhältnis wird als geeignet betrachtet, um geeignete Sauerstoffkonzentrationen aufrechtzuerhalten und um die Ammoniakbildung im Überstandswasser zu vermeiden. Im Überstandswasser muss ein Sauerstoffgehalt von $\geq 40\%$ aufrechterhalten werden. Das Überstandswasser der Prüfgefäße ist vorsichtig zu belüften (z. B. mit 2-4 Blasen pro Sekunde); die dazu verwendete Pasteur-Pipette wird etwa 2 cm über der Oberfläche des Sediments angesetzt, um Trübungen des Sediments zu minimieren.

Licht und Temperatur

47. Die Fotoperiode für die Kultur und für den Versuch beträgt 16 Stunden (1)(6). Die Lichtintensität im Testbereich beträgt etwa 500-1000 lx. Die Testtemperatur liegt während des gesamten Tests bei 20 ± 2 °C.

Prüfkonzentrationen

48. Die Bestimmung der Aufnahmekinetik erfolgt bei einer einzigen (möglichst niedrigen) Testkonzentration; es kann aber auch eine zweite (höhere) Konzentration verwendet werden (siehe z. B. (46)). In diesem Fall werden im Gleichgewichtszustand oder nach 28 Tagen Proben entnommen, um die bei der niedrigeren Konzentration gemessenen BAF-Werte zu verifizieren (11). Die höhere Konzentration ist so zu wählen, dass Beeinträchtigungen ausgeschlossen werden können (beispielsweise indem eine Konzentration in Höhe von etwa 1 % der in maßgeblichen Untersuchungen der chronischen Toxizität ermittelten niedrigsten Konzentration mit bekannter chronischer Wirkung EC_x verwendet wird). Die niedrigere Testkonzentration muss erheblich über der Nachweisgrenze der verwendeten Methode zur Analyse von Sedimenten und biologischen Proben liegen). Liegt die Wirkungskonzentration des Prüfstoffs in der Nähe der analytischen Nachweisgrenze, wird empfohlen, radioaktiv markierte Prüfstoffe mit hoher spezifischer Radioaktivität zu verwenden.

Replikate mit dem Prüfstoff und Kontrollreplikate

49. Für die kinetischen Messungen in der Aufnahme- und der Eliminationsphase sind pro Messpunkt (11) mindestens drei behandelte Replikate vorzusehen. Zusätzliche Replikate sind beispielsweise zu verwenden, wenn (optional) weitere Probendaten ermittelt werden sollen. Für die Eliminationsphase wird eine entsprechende Anzahl an Replikaten mit nicht dotiertem Sediment und mit Überstandswasser hergestellt, damit die dem Prüfstoff ausgesetzten Würmer aus den betreffenden Gefäßen mit dem Prüfstoff am Ende der Aufnahmephase in Gefäße ohne Prüfstoff gegeben werden können. Die Gesamtzahl der behandelten Replikate mit dem Prüfstoff muss für die

Aufnahme- und die Eliminationsphase hinreichend sein.

50. Alternativ können die für die Probenahme vorgesehenen Würmer während der Eliminationsphase in einem großen Behälter mit dotiertem Sediment aus derselben Charge wie bei der Ermittlung der Aufnahmekinetik des Prüfstoffs ausgesetzt werden. Es muss nachgewiesen werden, dass die Testbedingungen (Sedimenttiefe, Sediment-Wasser-Verhältnis, Besatz, Temperatur, Wasserqualität usw.) den entsprechenden Parametern der für die Aufnahmephase vorgesehenen Replikate vergleichbar sind. Am Ende der Aufnahmephase sind Wasser-, Sediment- und Wurmproben aus diesem Behälter zur Analyse zu entnehmen; außerdem muss eine hinreichende Anzahl großer Würmer, die keine Anzeichen einer kürzlich erfolgten Teilung aufweisen, vorsichtig entnommen und in die für die Eliminationsphase vorgesehenen Replikate gesetzt werden (z. B. zehn Organismen pro Replikatgefäß).
51. Wenn ausschließlich Wasser als Lösungsmittel eingesetzt wird, sind mindestens 9 Replikate einer negativen Kontrolle (mindestens 3 Probenahmen zu Beginn, 3 am Ende der Aufnahmephase und 3 am Ende der Eliminationsphase) für biologische Analysen und für Analysen der Hintergrundkonzentrationen vorzusehen. Wenn zur Applikation des Prüfstoffs ein Lösungsmittel verwendet wird, ist eine Lösungsmittelkontrolle herzustellen (Probenahmen bei mindestens 3 Replikate zu Beginn, 3 am Ende der Aufnahmephase und 3 am Ende der Expositionsphase). In diesem Fall sind 4 Replikate einer negativen Kontrolle (ohne Lösungsmittel) zur Probenahme am Ende der Aufnahmephase vorzusehen. Diese Replikate können biologisch mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen werden, um Informationen über einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels auf den Testorganismus zu erhalten. Nähere Informationen sind Anlage 3 zu entnehmen.

Häufigkeit der Messungen der Wasserqualität

52. Während der Aufnahmephase und der Eliminationsphase müssen mindestens folgende Parameter des Überstandswassers gemessen werden:
- Temperatur Messung in jeweils einem Gefäß pro Testkonzentration und Datum der Probenahme und in einem Kontrollgefäß einmal wöchentlich sowie zu Beginn und am Ende der Aufnahmephase und der Eliminationsphase; außerdem kann die Temperatur des umgebenden Mediums (Umgebungsluft oder Wasserbad) oder in einem repräsentativen Prüfgefäß protokolliert werden (beispielsweise kontinuierlich oder stündlich);
 - Gehalt an gelöstem Sauerstoff je Testkonzentration in einem Gefäß sowie in einem Kontrollgefäß pro Datum der Probenahme; ausgedrückt in mg/l und % Luftsauerstoff-Sättigungswert;
 - Luftzufuhr mindestens einmal täglich (an Werktagen) zu kontrollieren und erforderlichenfalls anzupassen;

- pH-Wert in jeweils einem Gefäß mit dem Prüfstoff pro Datum der Probenahme und in einem Kontrollgefäß einmal wöchentlich sowie zu Beginn und am Ende der Aufnahmephase und der Eliminationsphase;
- Gesamt-Wasserhärte in mindestens einem Gefäß mit dem Prüfstoff und in einem Kontrollprüfgefäß zu Beginn und am Ende der Aufnahmephase und der Eliminationsphase, ausgedrückt in mg/l CaCO₃;
- Gesamt-Ammoniakgehalt in mindestens einem Gefäß mit dem Prüfstoff und in einem Kontrollprüfgefäß am Anfang und am Ende der Aufnahmephase und der Eliminationsphase; ausgedrückt in mg/l NH₄⁺ oder NH₃ oder Ammoniak-N gesamt.

Probenahme und Analyse der Wurm-, Sediment- und Wasserproben

Probenahmeplan

53. Anlage 3 enthält Beispiele von Probenahmeplänen für eine Aufnahmephase von 28 und eine Eliminationsphase von 10 Tagen.
54. Vor dem Einsetzen der Würmer sowie in der Aufnahmephase und in der Eliminationsphase werden von dem Wasser und dem Sediment in den Becken Proben zur Bestimmung der Prüfstoffkonzentration entnommen. Während des Tests werden die Konzentrationen des Prüfstoffs in den Würmern, im Sediment und im Wasser ermittelt, um die Verteilung des Prüfstoffs in die verschiedenen Kompartimente des Testsystems zu überwachen.
55. Wurm-, Sediment- und Wasserproben werden in der Aufnahmephase und in der Eliminationsphase mindestens sechsmal entnommen.
56. Die Probenahmen werden fortgesetzt, bis ein Plateau (Gleichgewichtszustand) erreicht wird (siehe Anlage 1) bzw. bis 28 Tage vergangen sind. Auch wenn sich binnen 28 Tagen kein Plateau einstellt, wird mit der Eliminationsphase begonnen. Zu Beginn der Eliminationsphase werden die vorgesehenen Würmer in die Replikatkammern mit unbehandeltem Sediment und Wasser gesetzt (siehe auch Nummern 17 und 18).

Probenahme und Probenvorbereitung

57. Die Entnahme der Wasserproben erfolgt durch Dekantieren, Absaugen oder Pipettieren eines hinreichenden Volumens zur Quantifizierung des Prüfstoffs in den Proben.
58. Das verbleibende Überstandswasser wird vorsichtig aus den Becken dekantiert oder abgesaugt. Sedimentproben sind vorsichtig zu entnehmen, damit die Würmer möglichst wenig gestört werden.
59. Bei der Probenahme werden alle Würmer aus dem Replikat entnommen

(beispielsweise indem das Sediment mit dem Überstandswasser suspendiert und der Inhalt der einzelnen Replikate auf einer flachen Schale verteilt wird, um die Würmer mit einer weichen Stahlpinzette aufnehmen zu können). Anschließend werden die Würmer kurz in einer flachen Schale aus Glas oder Stahl mit Wasser gespült. Anhaftendes Wasser entfernen. Die Würmer vorsichtig in ein vorgewogenes Gefäß geben und wiegen. Anschließend werden die Würmer durch Frieren (z. B. bei $\leq -18\text{ °C}$) getötet. Das Vorhandensein und die Anzahl von Kokons und/oder juvenilen Tieren sind zu protokollieren.

60. Im Allgemeinen sind die Würmer unmittelbar nach der Probenahme ohne eine Phase der Darmentleerung zu wiegen und zu töten, um die BAF-Werte konservativ zu ermitteln und um Verluste von Rückständen im Gewebe während der Entleerung des Darminhalts nur in Wasser zu vermeiden. Bei $\log\text{-}K_{ow}$ -Werten über 5 wird davon ausgegangen, dass die betreffenden Stoffe bei Entleerung des Darminhalts nur in Wasser nicht in erheblichem Umfang eliminiert werden; bei Stoffen mit $\log\text{-}K_{ow}$ -Werten unter 4 hingegen können erhebliche Anteile verlorengehen (47).
61. In der Eliminationsphase entleeren die Würmer ihren Darm in sauberes Sediment, Messungen unmittelbar vor der Eliminationsphase werden entsprechend an Sedimenten mit kontaminiertem Darminhalt vorgenommen. Nach den ersten 4-24 h der Eliminationsphase kann dagegen davon ausgegangen werden, dass der kontaminierte Darminhalt weitgehend durch sauberes Sediment ersetzt wurde (11)(47). Die Konzentration in den Würmern der betreffenden Probe kann dann als Konzentration im Gewebe nach der Entleerung des Darminhalts betrachtet werden. Um der Verdünnung der Prüfstoffkonzentration durch unkontaminiertes Sediment während der Eliminationsphase Rechnung zu tragen, kann das Gewicht des Darminhalts auf Basis des Verhältnisses Nassgewicht/Aschegewicht des Wurms oder des Verhältnisses Trockenmasse/Aschegewicht des Wurms geschätzt werden.
62. Wenn bei einer Untersuchung die Bioverfügbarkeit und die tatsächlichen Rückstände im Gewebe der Testorganismen ermittelt werden sollen, muss mindestens eine Unterprobe exponierter Tiere (z. B. aus drei zusätzlichen Replikatgefäßen), die vorzugsweise im Gleichgewichtszustand entnommen wurde, gewogen, 6 Stunden mit sauberem Wasser gereinigt (47) und danach vor der Analyse nochmals gewogen werden. Daten zum Gewicht der Würmer und zur Konzentration im Körpergewebe der betreffenden Unterprobe können dann mit Werten von Würmern ohne Darminhalt verglichen werden. Um die Tiere nicht einer zusätzlichen Stressbelastung auszusetzen, darf der Darm der für die Messung der Elimination vorgesehenen Würmer vor der Umsetzung in sauberes Sediment nicht geleert werden.
63. Die Analyse der Wasser-, Sediment- und Wurmproben sollte vorzugsweise direkt nach der Probenahme (d. h. innerhalb von 1 bis 2 Tagen) erfolgen, um einen Abbau oder sonstige Verluste zu vermeiden und um bei laufendem Versuch die ungefähren Aufnahme- und Eliminationsraten zu ermitteln. Durch eine umgehende Analyse werden auch Verzögerungen bei der Ermittlung des Zeitpunkts vermieden, bei dem ein Plateau einsetzt.
64. Wenn die Analyse nicht umgehend vorgenommen wird, sind die Proben unter geeigneten Bedingungen zu lagern. Vor Beginn der Untersuchung sind Informationen über die Stabilität des betreffenden Prüfstoffs und über geeignete Lagerbedingungen einzuholen (z. B. Haltbarkeit und Lagertemperatur oder Entnahmeverfahren). Wenn

diese Informationen nicht verfügbar sind, kann erforderlichenfalls gleichzeitig anhand dotierter Kontrollgewebe die Lagerfähigkeit ermittelt werden.

Qualität der Analysemethode

65. Da Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit entscheidend für das gesamte Verfahren sind, muss experimentell sichergestellt werden, dass die Präzision und die Reproduzierbarkeit der chemischen Analysen sowie die Wiederfindung des Prüfstoffs aus Wasser-, Sediment- und Wurmproben für die jeweilige Methode mindestens bei der geringsten und bei der höchsten Testkonzentration hinreichend sind. Außerdem muss gewährleistet werden, dass der Prüfstoff in den Becken nicht in Konzentrationen oberhalb der Hintergrundkonzentration nachweisbar ist. Erforderlichenfalls werden die C_w -, C_s - und C_a -Werte entsprechend den Wiederfindungsraten und den Hintergrundkonzentrationen der Kontrollen korrigiert. Alle Proben müssen während des Tests stets so behandelt werden, dass Verunreinigungen und Verluste (z. B. infolge von Adsorption des Prüfstoffs durch das Probenahmegerät) auf ein Minimum beschränkt werden.
66. Die Gesamtwiederfindungsrate und die Wiederfindung des Prüfstoffs in Würmern, Sedimenten, Wasser und (gegebenenfalls) verwendeten Abscheidern mit Adsorberstoffen zum Auffangen des verdampfenden Prüfstoffs müssen ermittelt und im Protokoll erfasst werden.
67. Da die Verwendung radioaktiv markierter Stoffe empfohlen wird, kann die Gesamt-Radioaktivität (d. h. die Radioaktivität in Ausgangsstoffen und in Abbauprodukten) ermittelt werden. Wenn analysetechnisch möglich, können aus der Quantifizierung des Ausgangsstoffs und der Abbauprodukte im Gleichgewichtszustand oder am Ende der Aufnahmephase wichtige Informationen gewonnen werden. Sind derartige Messungen beabsichtigt, müssen die Proben anschließend geeigneten Extraktionsverfahren unterzogen werden, damit der Ausgangsstoff separat quantifiziert werden kann. Wenn ein wesentlicher Prozentanteil (z. B. > 10 %) der in den Testorganismen im Gleichgewichtszustand oder am Ende der Aufnahmephase gemessenen Radioaktivität auf ein nachgewiesenes Abbauprodukt entfällt, sollten die betreffenden Abbauprodukte bestimmt werden (5).
68. Wegen der geringen individuellen Biomasse kann die Konzentration des Prüfstoffs bei den einzelnen Würmern häufig nicht ermittelt werden, wenn der Test nicht mit *Branchiura sowerbyi* (40-50 mg Feuchtmasse pro Wurm) durchgeführt wird (11). Daher können die aus einem Prüfgefäß entnommenen Würmer gepoolt werden; die Daten können dann allerdings nur für gewisse statistische Verfahren verwendet werden. Wird auf ein spezielles statistisches Verfahren bzw. eine bestimmte statistische Aussagekraft Wert gelegt, muss der Test unter Berücksichtigung des Poolings, des Verfahrens und der gewünschten Aussagekraft eine angemessene Anzahl an Testtieren und/oder Replikatkammern umfassen.
69. Der BAF sollte im Verhältnis zur gesamten Feuchtmasse und zur Trockenmasse sowie, falls erforderlich (z. B. bei hochlipophilen Stoffen), im Verhältnis zum Lipidgehalt und zum TOC des Sediments ausgedrückt werden. Zur Bestimmung des Lipidgehalts sind geeignete Methoden zu verwenden (48)(49). Als Standardmethode wird die Extraktion mit Chloroform/Methanol (50) empfohlen (48). Um die Verwendung von gechlorten Lösungsmitteln zu vermeiden, kann jedoch eine in einem

Ringtest geprüfte angepasste Version der Methode von Bligh and Dyer (50), wie in (51) beschrieben, verwendet werden. Da die verschiedenen Methoden möglicherweise zu unterschiedlichen Werten führen (48), ist es wichtig, die verwendete Methode anzugeben. Nach Möglichkeit, d. h., wenn genügend Wurmgewebe verfügbar ist, wird der Lipidgehalt an der Probe bzw. dem Extrakt gemessen, die bzw. der auch für die Ermittlung der Konzentration des Prüfstoffs verwendet wurde. Die Lipide müssen nämlich häufig aus dem Extrakt entfernt werden, bevor eine chromatographische Analyse durchgeführt werden kann (5). Aus praktischen Gründen empfiehlt sich allerdings, zumindest zu Beginn oder – vorzugsweise – am Ende der Aufnahmephase akklimatisierte Kontrolltiere zu verwenden, um den Lipidgehalt beispielsweise an drei Proben zu messen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

70. Die Aufnahmekurve des Prüfstoffs ergibt sich, indem ihre Konzentration in/auf den Würmern in der Aufnahmephase gegen die Zeit auf einer arithmetischen Skala aufgetragen wird. Wenn die Kurve ein Plateau erreicht hat, wird der BAF_{ss} im Gleichgewichtszustand berechnet:

$$\frac{C_a \text{ im Gleichgewichtszustand bzw. an Tag 28 (Mittelwert)}}{C_s \text{ im Gleichgewichtszustand bzw. an Tag 28 (Mittelwert)}}$$

71. Bestimmung des kinetischen Bioakkumulationsfaktors (BAFK) als Quotient k_s/k_e . Die Eliminationskonstante (k_e) wird in der Regel aus der Eliminationskurve abgeleitet (d. h. einer grafischen Darstellung der Prüfstoffkonzentration in den Würmern während der Eliminationsphase). Die Aufnahmekonstante k_s wird dann anhand der Kinetik der Aufnahmekurve berechnet. Die bevorzugte Methode zur Berechnung des BAFK und der Konstanten k_s und k_e ist eine computergestützte nichtlineare Parameterschätzung (siehe Anlage 2). Wenn die Ausscheidungskurve offensichtlich nicht erster Ordnung ist, sollten komplexere Modelle herangezogen werden (25)(27)(52).
72. Der Biota-Sediment-Akkumulationsfaktor (BSAF) wird durch Normalisierung des BAFK für den Lipidgehalt der Würmer und für den Gesamtgehalt des Sediments an organischem Kohlenstoff ermittelt.

Interpretation der Ergebnisse

73. Die Testergebnisse sind mit Vorsicht zu bewerten, wenn die gemessenen Konzentrationen des Prüfstoffs in Testlösungen in der Nähe der Nachweisgrenze der jeweiligen Analysemethoden liegen.
74. Klar definierte Aufnahme- und Eliminationskurven sind ein Anzeichen für die Qualität der Bioakkumulationsdaten. Im Allgemeinen dürfen die Konfidenzintervalle der BAF-Werte bei gut konzeptionierten Untersuchungen höchstens bei 25 % liegen (5).

Prüfbericht

75. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfstoff

- physikalischer Zustand und physikalisch-chemische Eigenschaften, z. B. $\log K_{ow}$, Wasserlöslichkeit;
- chemische Kenndaten; Herkunft des Prüfstoffs, Bezeichnung und Konzentration der verwendeten Lösungsmittel;
- bei radioaktiv markierten Prüfstoffen: die genaue Position der markierten Atome, die spezifische Radioaktivität und der Prozentanteil der mit Verunreinigungen verbundenen Radioaktivität.

Versuchstierart

- wissenschaftlicher Name, Stamm, Bezugsquelle, eventuelle Vorbehandlungen, Akklimatisation, Alter, Größenbereich usw.

Prüfbedingungen

- verwendetes Testverfahren (z. B. statisch, semistatisch oder Durchfluss);
- Art und Eigenschaften der verwendeten Beleuchtung und Photoperiode(n);
- Versuchsaufbau (z. B. Anzahl, Material und Größe der Becken, Wasservolumen, Sedimentmasse und -volumen, Wasseraustausch (Volumen) (bei Durchflusssystemen und bei semistatischer Erneuerung), ggf. Belüftung vor und während des Tests, Anzahl der Replikate, Anzahl der Würmer pro Replikat, Anzahl der Testkonzentrationen, Dauer der Aufnahme- und Eliminationsphasen, Häufigkeit der Probenahme);
- Methode für die Vorbereitung des Prüfstoffs und Applikationsmethode sowie Begründung der Wahl einer bestimmten Methode;
- die nominale Testkonzentrationen;
- Herkunft der Bestandteile des künstlichen oder natürlichen Wassers und des künstlichen oder natürlichen Sediments, Beschreibung etwaiger Vorbehandlungen, Nachweise dafür, dass die Testtiere in den verwendeten Medien leben und/oder sich vermehren, Merkmale des Sediments (pH-Wert und Ammoniakgehalt des Porenwassers (natürliche Sedimente), Gehalt an organischem Kohlenstoff (TOC), Partikelgrößenverteilung (Prozent Sand, Schluff und Ton), prozentualer Wasseranteil und sonstige vorgenommene Messungen) sowie Merkmale des Wassers (pH-Wert, Härte, Leitfähigkeit, Temperatur, Konzentration des gelösten Sauerstoffs, Restchlorgehalt (wenn gemessen) und sonstige vorgenommene Messungen);
- nominelle und gemessene Trockenmasse in Prozent der Feuchtmasse (oder Verhältnis Trockenmasse/Feuchtmasse) des künstlichen Sediments; gemessene Trockenmasse in Prozent der Feuchtmasse (oder Verhältnis Trockenmasse/Feuchtmasse) bei Feldsedimenten;
- Wasserqualität in den Becken (Temperatur, pH-Wert, Ammoniakgehalt, Gesamthärte und Konzentration des gelösten Sauerstoffs);
- genaue Angaben zur Behandlung der Wasser-, Sediment- und Wurmproben, einschließlich aller Einzelheiten über Vorbereitung, Lagerung, Dotierungsverfahren und Extraktion, sowie zu Analyseverfahren (und -genauigkeit) in Bezug auf den Prüfstoff und den Lipidgehalt und Wiederauffindungsraten des Prüfstoffs.

Ergebnisse

- Mortalität der Kontrollwürmer und der Würmer in den einzelnen Becken sowie festgestellte subletale Wirkungen einschließlich anomalen Verhaltens (z. B. Verlassen des Sediments, Vorhandensein oder Fehlen von Kotbällchen, fehlende Reproduktion);
- gemessene Trockenmasse in Prozent der Feuchtmasse (oder Verhältnis

- Trockenmasse/Feuchtmass) des Sediments und der Testorganismen (hilfreich für die Normalisierung);
- Lipidgehalt der Würmer;
 - Kurven der Aufnahme- und Eliminationskinetiken des Prüfstoffs in den Würmern und die Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustands;
 - C_a , C_s und C_w (gegebenenfalls mit Standardabweichung und Abweichungsbereich) für alle Probenahmen (wobei C_a in $g\ kg^{-1}$ Feucht- und Trockenmasse des Ganzkörpers und C_s in $g\ kg^{-1}$ Feucht- und Trockenmasse des Sediments und C_w in $mg\ l^{-1}$ ausgedrückt wird). Wird der Biota-Boden-Akkumulationsfaktor (BSAF, Begriffsbestimmung siehe Anlage 1) benötigt (z. B. für den Vergleich der Ergebnisse von zwei oder mehreren Tests, die mit Tieren mit unterschiedlichem Lipidgehalt durchgeführt wurden), so kann C_a zusätzlich als $g\ kg^{-1}$ Lipidgehalt des Organismus und C_s als $g\ kg^{-1}$ organischer Kohlenstoff (OC) des Sediments ausgedrückt werden;
 - BAF (ausgedrückt in $kg\ Sediment \cdot kg^{-1}\ Wurm$ (Feuchtmass)), Sediment-Aufnahmekonstante k_s (ausgedrückt in $g\ Sediment\ kg^{-1}\ Wurm$ (Feuchtmass) d^{-1}) und Eliminationskonstante k_e (ausgedrückt in d^{-1}); außerdem kann zusätzlich der BSAF (ausgedrückt in $kg\ Sediment\ organischer\ Kohlenstoff\ kg^{-1}\ Lipidgehalt\ des\ Wurms$) angegeben werden;
 - nicht eliminierte Rückstände (NER) am Ende der Eliminationsphase;
 - falls gemessen: Prozentanteile des Ausgangsstoffs, Abbauprodukte und gebundenen Rückstände (d. h. Gehalt an Prüfstoff, die sich nicht mit gewöhnlichen Extraktionsmethoden extrahieren lässt) im Boden und in den Testtieren;
 - Methoden zur statistischen Datenanalyse.

Auswertung der Ergebnisse

- Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Validitätskriterien gemäß Nummer 21;
- unerwartete oder ungewöhnliche Ergebnisse, z. B. unvollständige Elimination des Prüfstoffs durch die Testtiere; in diesen Fällen können Ergebnisse aus Vorversuchen hilfreiche Informationen beinhalten.

ANLAGE 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND EINHEITEN

Künstliches Sediment oder formuliertes, rekonstituiertes oder synthetisches Sediment: ein Gemisch aus Stoffen, mit denen die physikalischen Bestandteile eines natürlichen Sediments nachgeahmt werden sollen.

Bioakkumulation: Konzentrationszunahme (Anreicherung) des Prüfstoffs in oder an einem Organismus gegenüber der Prüfstoffkonzentration im umgebenden Medium; die Bioakkumulation ergibt sich aus Biokonzentrations- und Biomagnifikationsvorgängen (siehe unten).

Bioakkumulationsfaktor (BAF): zu jedem beliebigen Zeitpunkt während der Aufnahmephase dieses Bioakkumulationstests der Quotient aus der Konzentration des Prüfstoffs in/auf dem Testorganismus (C_a in $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Feucht- oder Trockenmasse) und der Konzentration des Prüfstoffs im umgebenden Medium (C_s in $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Feucht- oder Trockenmasse des Sediments); entsprechend den Einheiten von C_a und C_s wird der BAF in $\text{kg Sediment kg}^{-1}$ Wurm angegeben (15).

Bioakkumulationsfaktoren: werden direkt anhand des Verhältnisses der Sediment-Aufnahmekonstante zu den Eliminationskonstanten (k_s und k_e , siehe unten) berechnet; auch als kinetischer Bioakkumulationsfaktor (BAF_K) bezeichnet.

Biokonzentration: Konzentrationszunahme (Anreicherung) des Prüfstoffs in oder an einem Organismus, ausschließlich aufgrund der Aufnahme über die Körperoberfläche, gegenüber der Prüfstoffkonzentration im umgebenden Medium.

Biomagnifikation: die Konzentrationszunahme (Anreicherung) des Prüfstoffs in oder an einem Organismus, die hauptsächlich aus der Aufnahme des Prüfstoffs über kontaminiertes Futter oder kontaminierte Beute resultiert, bezogen auf die Prüfstoffkonzentration im Futter bzw. in der Beute; Biomagnifikation kann zum Transfer oder zur Bioakkumulation des Prüfstoffs in Nahrungsketten oder -netzen führen.

Biota-Sediment-Akkumulationsfaktor (BSAF): Quotient aus der auf den Lipidgehalt normierten Prüfstoffkonzentration in/an dem Testorganismus (C_a in $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Lipidgehalt des Organismus) und der auf den organischen Kohlenstoffgehalt normierten Prüfstoffkonzentration im Sediment im Gleichgewichtszustand; C_a wird ausgedrückt in g kg^{-1} Lipidgehalt des Organismus; C_s wird in g kg^{-1} Gehalt des Sediments an organischen Bestandteilen angegeben.

Konditionierungsdauer: Zeitraum zur Stabilisierung der im Sediment vorhandenen Mikroorganismen und zur Abtrennung z. B. von Ammoniak, das aus Bestandteilen des Sediments erzeugt wurde; die Konditionierung erfolgt vor dem Dotieren des Sediments mit dem Prüfstoff. Gewöhnlich wird das Überstandswasser nach dem Konditionieren entsorgt.

Elimination eines Prüfstoffs: Ausscheidung des angereicherten Prüfstoffs aus dem Testorganismus durch aktive oder passive Prozesse, die unabhängig von An- oder

Abwesenheit des Prüfstoffs im umgebenden Medium erfolgt.

Eliminationsphase: der Zeitraum, in dem nach Umsetzung der Testorganismen von kontaminiertem Medium in Prüfstofffreies Medium die Ausscheidung (oder der Nettoverlust) des Prüfstoffs durch die Testorganismen beobachtet wird.

Eliminationskonstante (k_e): der numerische Wert, der die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme des Prüfstoffs in/an dem Testorganismus nach Umsetzung der Testorganismen aus einem mit dem Prüfstoff belasteten Medium in Prüfstofffreies Medium definiert; k_e wird in Tag^{-1} (d^{-1}) angegeben.

Ausgleichszeit: Zeit zur Verteilung des Prüfstoffs zwischen Festphase, Porenwasser und Überstandswasser; der Ausgleich erfolgt nach dem Dotieren des Sediments mit dem Prüfstoff und vor der Zugabe der Testorganismen.

Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{ow}): Verhältnis zwischen der Konzentration eines Stoffs in n-Oktanol und in Wasser im Gleichgewicht, auch als P_{ow} -Wert ausgedrückt; der Logarithmus von K_{ow} ($\log K_{ow}$) gilt als Maß für das Anreicherungspotenzial eines Stoffs in aquatischen Organismen.

Koeffizient für die Verteilung organischer Kohlenstoff/Wasser (K_{oc}): Verhältnis der Gleichgewichtskonzentration der Chemikalie im/am organischen Kohlenstoffanteil im Sediment zu derjenigen im Wasser.

Überstandswasser: das im Prüfgefäß auf dem Sediment stehende Wasser.

Plateau oder **Gleichgewichtszustand** (*steady state*): Gleichgewicht zwischen den während der Aufnahmephase simultan auftretenden Aufnahme- und Eliminationsvorgängen; der Gleichgewichtszustand in der grafischen Darstellung einer Probenahme des zeitbezogenen BAF ist erreicht, wenn die Kurve parallel zur Zeitachse verläuft und wenn drei aufeinander folgende BAF-Analysen, die an im Abstand von mindestens zwei Tagen genommenen Proben durchgeführt werden, um höchstens $\pm 20\%$ voneinander abweichen, bzw. wenn es keine statistisch bedeutenden Unterschiede zwischen den drei Probenahmephase gibt. Für Prüfstoffe, die nur langsam aufgenommen werden, ist ein zeitlicher Abstand zwischen den Probenahmen von sieben Tagen geeigneter (5).

Porenwasser oder Interstitialwasser: das Wasser in den Zwischenräumen zwischen Sediment- oder Bodenpartikeln.

Sediment-Aufnahmekonstante (k_s): numerischer Wert, der die Geschwindigkeitsrate der Zunahme der Prüfstoffkonzentration im/am Testorganismus bei Anreicherung des Stoffs aus dem Sediment definiert. k_s wird in $\text{g Sediment kg}^{-1} \text{Wurm d}^{-1}$ ausgedrückt.

Dotiertes Sediment: Sediment, zu dem der Prüfstoff hinzugegeben wurde.

Bioakkumulationsfaktor im Gleichgewichtszustand (*steady state*) (BAF_{ss}): BAF im Gleichgewichtszustand; ändert sich über einen längeren Zeitraum nicht wesentlich; die Konzentration des Prüfstoffs im umgebenden Medium (C_s ausgedrückt als g kg^{-1} Feucht- oder Trockenmasse des Sediments) ist während dieser Zeit konstant.

Aufnahme- oder Expositionsphase: Zeitraum, in dem die Testorganismen dem

Prüfstoff ausgesetzt sind.

ANLAGE 2

BERECHNUNG DER AUFNAHME- UND ELIMINATIONSPARAMETER

Hauptendpunkt eines Bioakkumulationstests ist der Bioakkumulationsfaktor (BAF). Zur Berechnung des gemessenen BAF bildet man den Quotienten aus der Konzentration des Prüfstoffs im Testorganismus (C_a) und der Konzentration des Prüfstoffs im Sediment (C_s) im Gleichgewichtszustand. Wenn der Gleichgewichtszustand in der Aufnahmephase nicht erreicht wird, ist der BAF auf die gleiche Weise für Tag 28 zu berechnen. Es ist allerdings anzugeben, ob der BAF auf Konzentrationen im *steady state* beruht.

Der kinetische Bioakkumulationsfaktor (BAF_K), die Konstante der Sedimentaufnahme (k_s) und die Eliminationskonstante (k_e) sollten vorzugsweise mit Methoden zur nicht linearen Parameterabschätzung per Computer ermittelt werden. Ausgehend von den zeitbezogenen durchschnittlichen Akkumulationsfaktoren (C_a , Mittelwerte zu den einzelnen Zeitpunkten der Probenahme/ C_s , Mittelwerte zu den einzelnen Zeitpunkten der Probenahme = AF) der Aufnahmephase bezogen auf die Feuchtmasse der Würmer und des Sediments und der Modellgleichung

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{-k_e t}) \quad | \quad \text{[Gleichung 1]}$$

wobei $AF(t)$ = Verhältnis der Konzentration des Prüfstoffs in den Würmern und der Konzentration im Sediment zu einem beliebigen Zeitpunkt (t) während der Aufnahmephase ist, werden mit entsprechender Software die Werte für BAF_K , k_s und k_e berechnet.

Wird während der Aufnahmephase ein Gleichgewichtszustand erreicht (d. h. $t = \infty$), kann Gleichung 1 reduziert werden auf:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \quad \text{[Gleichung 2]}$$

Dabei sind:

k_s = Aufnahmekonstante im Gewebe [$\text{g Sediment kg}^{-1} \text{Wurm d}^{-1}$]

k_e = Eliminationskonstante [d^{-1}]

Damit stellt $k_s/k_e \times C_s$ eine Annäherung an die Konzentration des Prüfstoffs im Wurmgewebe im Gleichgewichtszustand ($C_{a,ss}$) dar.

Der Biota-Boden-Akkumulationsfaktor (BSAF) ist wie folgt zu berechnen:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{tip}}$$

Dabei sind:

foc = Fraktion des organischen Kohlenstoffs im Sediment;

flip = Lipidfraktion in den Würmern wahlweise bezogen auf die Trocken- oder die Feuchtmasse.

Ausgehend von einer Zeitreihe von Konzentrationswerten kann die Eliminationskinetik mit folgenden Gleichungen und einer Computer-Berechnung nach einer nicht linearen Methode zur Parameterabschätzung modelliert werden.

Als Standard-Ausgangspunkt wird der Mittelwert der gemessenen Rückstände im Gewebe am Ende der Aufnahmeperiode empfohlen. Der aus der Aufnahmeperiode modellierte/geschätzte Wert sollte nur dann verwendet werden, wenn beispielsweise der gemessene Wert signifikant von dem im Modell bestimmten Rückstand im Gewebe abweicht. Zur alternativen Vorexposition von zur Elimination vorgesehenen Würmern siehe auch Nummer 50. Bei diesem Ansatz wird davon ausgegangen, dass Proben der vorexponierten Würmer an Tag 0 der Eliminationsperiode ein realistisches Bild von den Rückständen im Körper bieten, das als Grundlage für die Ermittlung der Eliminationskinetik dienen kann.

Weisen die gegen die Zeit aufgetragenen Messwerte auf eine konstante exponentielle Abnahme der Prüfstoffkonzentration in den Tieren hin, so lässt sich der Eliminationsverlauf mit einem Ein-Kompartiment-Modell (Gleichung 4) beschreiben.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad \text{[Gleichung 3]}$$

Die Elimination kann zuweilen biphasisch verlaufen, mit einer raschen Abnahme von C_a in den Anfangsphasen und einem langsameren Verlust an Prüfstoff in den letzten Phasen der Elimination, z. B. (8)(19)(25). Erklären lassen sich die beiden Phasen mit der Annahme, dass es im Organismus zwei verschiedene Kompartimente gibt, aus denen der Prüfstoff mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten eliminiert wird. Für diese Fälle wird auf die einschlägige Literatur verwiesen (15)(16)(17)(25).

Eine Elimination in zwei Kompartimenten wird z. B. mit der folgenden Gleichung beschrieben (25):

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{-k_b \times t} \quad \text{[Gleichung 4]}$$

A und B bezeichnen die Größe der Kompartimente (in Prozent der Summe der Rückstände im Gewebe), wobei sich der Stoffverlust in Kompartiment A rasch vollzieht und der Prüfstoff in Kompartiment B nur in geringem Umfang verloren geht. Die Summe von A und B ergibt 100 % des Volumens sämtlicher tierischer Kompartimente im Gleichgewichtszustand. k_a und k_b stehen für die entsprechenden Eliminationskonstanten [d^{-1}]. Wenn das Modell mit den beiden Kompartimenten auf die Ausscheidungsdaten übertragen wird, kann die Aufnahme konstante k_s wie folgt bestimmt werden (53)(54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \quad \text{[Gleichung 5]}$$

Trotzdem sind diese Modellgleichungen mit Vorsicht zu verwenden, insbesondere wenn sich die Bioverfügbarkeit des Prüfstoffs während des Tests ändert (42).

Alternativ zu den oben beschriebenen Modellgleichungen können die Kinetikparameter (k_s und k_e) auch in einem Durchlauf berechnet werden, indem die Kinetikmodellgleichung erster Ordnung auf alle Daten aus der Aufnahme- und der Eliminationsphase gemeinsam angewendet wird. Für die Beschreibung einer Methode, die eine solche kombinierte Berechnung der Aufnahme- und Eliminationskonstanten ermöglicht, wird auf (55), (56) und (57) verwiesen.

Die nicht eliminierten Rückstände (NER) sind als ein sekundärer Endpunkt zu berechnen, indem das Verhältnis der durchschnittlichen Konzentration in den Würmern (C_a) an Tag 10 der Eliminationsphase zur durchschnittlichen Konzentration in den Würmern (C_a) im Gleichgewichtszustand (bzw. an Tag 28 der Aufnahme- und Eliminationsphase) mit 100 multipliziert wird:

$$\mathbf{NER}_{10d}[\%] = \frac{\mathbf{C}_a \text{ am Ende der Eliminationsphase (Durchschnitt)} \times 100}{\mathbf{C}_a \text{ im Gleichgewichtszustand (Durchschnitt)}}$$

ANLAGE 3

BEISPIEL EINES PROBENAHPMEPLANS BEI EINEM 28-TÄGIGEN BIOAKKUMULATIONSTEST

a) Aufnahmephase (einschließlich einer 4-tägigen Equilibrierungsphase)

Tag	Schritte
-6	Herstellung einer Torfsuspension für das Sediment; Konditionieren der Suspension für 48 h;
-4	Dotieren des Sediments oder der Sedimentfraktion; Mischen aller Bestandteile des Sediments; Entnahme von Proben des Sediments mit dem Prüfstoff und des Sediments aus der Lösungsmittelkontrolle zur Bestimmung der Konzentration des Prüfstoffs; Zugabe von Überstandswasser; Inkubation unter Prüfbedingungen (Equilibrierungsphase);
-3/-2	Entnahme der Testorganismen aus der Anzuchtkultur zwecks Akklimatisierung;
0	Messung der Wasserqualität (siehe Nummer 52); Entnahme der Replikate zur Entnahme von Wasser- und Sedimentproben zur Ermittlung der Konzentration des Prüfstoffs; randomisierte Verteilung der Würmer auf die Becken; Aufbewahrung einer hinreichenden Anzahl an Unterproben der Würmer zur Bestimmung des analytischen Hintergrunds; Kontrolle der Luftzufuhr bei Verwendung eines geschlossenen Prüfsystems;
1	Entnahme von Replikaten zur Probenahme; Kontrolle der Luftzufuhr, des Verhaltens der Würmer und der Wasserqualität (siehe Nummer 56); Entnahme von Wasser, Sediment- und Wurmproben zur Bestimmung der Prüfstoffkonzentration;
2	Kontrolle von Luftzufuhr, Wurmverhalten und Temperatur;
3	wie Tag 1;
4 - 6	wie Tag 2;
7	wie Tag 1; gegebenenfalls Nachfüllen von verdunstetem Wasser;
8 - 13	wie Tag 2;
14	wie Tag 1; gegebenenfalls Nachfüllen von verdunstetem Wasser;
15 - 20	wie Tag 2;
21	wie Tag 1; gegebenenfalls Nachfüllen von verdunstetem Wasser;
22 - 27	wie Tag 2;
28	wie Tag 1; Messung der Wasserqualität (siehe Nummer 52); Ende der Aufnahmephase; Reservieren einer ausreichenden Anzahl von Teilproben von Würmern zur Bestimmung von analytischen Hintergrundwerten, Feucht- und Trockenmasse sowie Lipidgehalt; Umsetzen der Würmer aus den verbleibenden exponierten Replikaten in Gefäße mit sauberem Sediment für die Eliminationsphase (ohne Entleerung des Darminhalts); Entnahme von Wasser-, Sediment- und Wurmproben aus den Lösungsmittelkontrollen; Entnahme von Abscheidelösungen (wenn Abscheider vorhanden).

Die Arbeitsschritte vor der Exponierung (Equilibrierungsphase) sind unter Berücksichtigung der Eigenschaften des Prüfstoffs zu planen. Wenn erforderlich, wird das hergestellte Sediment unter dem Überstandswasser 7 Tage bei 20 ± 2 °C vorbehandelt. Das Sediment ist dann entsprechend früher herzustellen!

Die für Tag 2 beschriebenen Arbeitsschritte sind täglich durchzuführen (mindestens an Werktagen).

b) Eliminationsphase

Tag	Schritte
-6	Herstellung einer Torfsuspension für das Sediment; Konditionieren der Suspension für 48 h;
-4	Mischen aller Bestandteile des Sediments; Entnahme von Proben des Sediments mit dem Prüfstoff und des Sediments aus der Lösungsmittelkontrolle zur Bestimmung der Konzentration des Prüfstoffs; Zugabe von Überstandswasser; Inkubation unter Prüfbedingungen;
0 (Tag 28 der Aufnahme-phase)	Messung der Wasserqualität (siehe Nummer 52); Umsetzen der Würmer aus den verbleibenden exponierten Replikaten in Gefäße mit sauberem Sediment; nach 4-6 h Entnahme der Replikate zur Entnahme von Wasser-, Sediment- und Wurmproben zur Ermittlung der Konzentration des Prüfstoffs; randomisierte Verteilung der Würmer auf die Becken;
1	Entnahme von Replikaten zur Probenahme; Kontrolle der Luftzufuhr, des Verhaltens der Würmer und der Wasserqualität (siehe Nummer 52); Entnahme von Wasser, Sediment- und Wurmproben zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration;
2	Kontrolle von Luftzufuhr, Wurmverhalten und Temperatur;
3	wie Tag 1;
4	wie Tag 2;
5	wie Tag 1;
6	wie Tag 2;
7	wie Tag 1; gegebenenfalls Nachfüllen von verdunstetem Wasser;
8 - 9	wie Tag 2;
10	wie Tag 1; Ende der Eliminationsphase; Messung der Wasserqualität (siehe Nummer 52); Entnahme von Wasser-, Sediment- und Wurmproben aus den Lösungsmittelkontrollen; Entnahme von Abscheidelösungen (wenn Abscheider vorhanden).

Das Sediment wird vor Beginn der Eliminationsphase auf dieselbe Weise zubereitet wie vor der Aufnahme-phase.

Die für Tag 2 beschriebenen Arbeitsschritte sind täglich durchzuführen (mindestens an Werktagen).

Anlage 4

EINIGE PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS

BESTANDTEILE	KONZENTRATION
Partikelmaterial	< 20 mg/l
Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffen	< 2 µg/l
Nichtionisiertes Ammonium	< 1 µg/l
Restchlor	< 10 µg/l
Gesamtanteil an organophosphorhaltigen Pestiziden	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden und polychlorierten Biphenylen	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	< 25 ng/l

ZUSAMMENSETZUNG DES EMPFOHLENE REKONSTITUIERTEN WASSERS

(a) Calciumchloridlösung

11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ werden in entionisiertem Wasser gelöst; anschließend wird entionisiertes Wasser bis zu einem Volumen von 1 ml hinzugegeben.

(b) Magnesiumsulfatlösung

4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ werden in entionisiertem Wasser gelöst; anschließend wird entionisiertes Wasser bis zu einem Volumen von 1 ml hinzugegeben.

(c) Natriumbicarbonatlösung

2,59 g NaHCO_3 werden in entionisiertem Wasser gelöst; anschließend wird entionisiertes Wasser bis zu einem Volumen von 1 ml hinzugegeben.

(d) Kaliumchloridlösung

0,23 g KCl werden in entionisiertem Wasser gelöst; anschließend wird entionisiertes Wasser bis zu einem Volumen von 1 ml hinzugegeben.

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) werden jeweils 25 ml gemischt; das Gesamtvolumen wird mit entionisiertem Wasser bis auf 1 l aufgefüllt. Die Summe der Calcium- und der Magnesiumionen in dieser Lösung beträgt 2,5 mmol/l.

Der Anteil von Ca- zu Mg-Ionen liegt bei 4:1 und der Anteil der Na- zu K-Ionen bei 10:1. Die Säurekapazität $K_{S4,3}$ dieser Lösung beträgt 0,8 mmol/l.

Das Verdünnungswasser wird bis zur Sauerstoffsättigung belüftet und anschließend ohne weitere Belüftung bis zur Verwendung zwei Tage gelagert.

Ein annehmbares Verdünnungswasser sollte einen pH-Wert von 6-9 aufweisen.

ANLAGE 5

**KÜNSTLICHES SEDIMENT – EMPFEHLUNGEN
FÜR DIE HERSTELLUNG UND LAGERUNG**

Anders als bei den Anforderungen der Prüfmethode C.8 (40) wird für das künstliche Sediment ein Torfgehalt von 2 % (statt 10 %) Trockenmasse empfohlen, damit ähnlich wie in natürlichen Sedimenten ein niedriger bis mäßiger Gehalt an organischen Bestandteilen gegeben ist (58).

Prozentanteil trockener Bestandteile des künstlichen Sediments:

Bestandteile	Charakterisierung	% trockenes Sediment
Torf	Torfmoos, Zersetzungsgrad: „mittel“, luftgetrocknet, ohne sichtbare Pflanzenreste, fein gemahlen (Partikelgröße $\leq 0,5$ mm).	$2 \pm 0,5$
Quarzsand	Partikelgröße: ≤ 2 mm, aber > 50 % der Partikel sollten eine Größe im Bereich 50-200 μm haben.	76
Kaolin-Ton	Kaolinitgehalt ≥ 30 %	22 ± 1
Futter	<i>Folia urticae</i> , gemahlene Blätter von <i>Urtica sp.</i> (Brennnessel), fein gemahlen (Partikelgröße $\leq 0,5$ mm) oder ein Gemisch aus gemahlenden Blättern von <i>Urtica sp.</i> mit Alpha-Cellulose (1:1); nach Arzneimittelstandard, zum menschlichen Verzehr; zusätzlich zum trockenen Sediment	0,4 - 0,5%
Calcium-carbonat	CaCO_3 , in Pulverform, chemisch rein, zusätzlich zum trockenen Sediment	0,05 - 1
Entionisiertes Wasser	Leitfähigkeit ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$, zusätzlich zum trockenen Sediment	30 - 50

Wenn erhöhte Ammoniakkonzentrationen erwartet werden (beispielsweise wenn bekannt ist, dass der Prüfstoff die Nitrifikation hemmt), kann es hilfreich sein, 50 % des

stickstoffreichen Brennesselpulvers durch Cellulose (z. B. α -Cellulosepulver, chemisch rein, Partikelgröße $\leq 0,5$ mm) zu ersetzen.

Zubereitung

Der Torf wird luftgetrocknet und zu einem feinen Pulver (Partikelgröße $\leq 0,5$ mm, keine sichtbaren Pflanzenrückstände) gemahlen. Mit einem Teil des zum trockenen Sediment hinzuzufügenden entionisierten Wassers wird mit einer Hochleistungs-Homogenisierereinrichtung eine Suspension aus der benötigten Menge des Torfpulvers hergestellt. Zur Herstellung eines rührfähigen Torfschlammes hat sich ein Wasservolumen von $11,5 \times$ Trockenmasse des Torfs bewährt (8).

Der pH-Wert dieser Suspension wird mit CaCO_3 auf $5,5 \pm 0,5$ eingestellt. Die Suspension wird mindestens zwei Tage unter sanftem Rühren bei 20 ± 2 °C vorbereitet, damit sich der pH-Wert stabilisieren und ein stabiler Gehalt an Mikroorganismen entwickeln kann. Danach wird der pH-Wert nochmals gemessen und erforderlichenfalls mit CaCO_3 auf $6,0 \pm 0,5$ eingestellt. Anschließend wird die gesamte Suspension mit den übrigen trockenen Bestandteilen gemischt; dabei sind die Dotierungsanteile zu beachten. Unter Zugabe des übrigen entionisierten Wassers wird ein homogenes Sediment hergestellt. Danach wird erneut der pH-Wert gemessen und erforderlichenfalls mit CaCO_3 auf $6,5$ - $7,5$ eingestellt. Wenn davon ausgegangen wird, dass sich Ammoniak bildet, kann es hilfreich sein, den pH-Wert des Sediments unter $7,0$ zu halten (z. B. zwischen $6,0$ und $6,5$). Anhand von Sedimentproben werden die Trockenmasse und der Gehalt an organischem Kohlenstoff bestimmt. Wenn eine Ammoniakbildung erwartet wird, kann das künstliche Sediment sieben Tage unter den Bedingungen des anschließenden Versuchs (z. B. Verhältnis Sediment:Wasser $1:4$, Höhe der Sedimentschicht wie in den Prüfgefäßen) gelagert werden, bevor es mit dem Prüfstoff dotiert wird, d. h., das Sediment ist mit belüftetem Wasser aufzufüllen. Nach dieser Konditionierung ist das Überstandswasser zu entfernen und zu entsorgen. Anhand von Sedimentproben werden die Trockenmasse und der Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff bestimmt (z. B. anhand von drei Proben).

Anschließend wird der dotierte Quarzsand mit dem Sediment in den verschiedenen Konzentrationen gemischt; das Sediment wird auf die als Replikate zu verwendenden Prüfgefäße verteilt und mit dem Testwasser aufgefüllt (z. B. in einem Sediment-Wasser-Verhältnis von $1:4$, Höhe der Sedimentschicht wie in den Prüfgefäßen). Danach werden die Gefäße unter den Bedingungen des durchzuführenden Versuchs konditioniert. Nun beginnt die Ausgleichszeit. Das Überstandswasser ist zu belüften.

Das ausgewählte Futter wird hinzugegeben, bevor oder während das Sediment mit dem Prüfstoff dotiert wird. Es kann anfänglich mit der Torfsuspension gemischt werden (s. o.). Eine übermäßige Beeinträchtigung des Futters vor der Zugabe der Testorganismen (z. B. bei langer Equilibrierungszeit) kann vermieden werden, indem der Zeitraum zwischen der Zugabe des Futters und dem Beginn der Exposition möglichst verkürzt wird. Um sicherzustellen, dass das Futter ausreichend mit dem Prüfstoff in Berührung kommt, ist das Futter spätestens am Tag der Dotierung des Prüfstoffs in das Sediment mit dem Sediment zu mischen. Ausnahmen sind möglich, wenn es aufgrund der Dauer der Equilibrierungsphase zu einem übermäßigen Abbau des Futters durch Mikroorganismen kommt, bevor die Testorganismen eingesetzt werden. Anhand von Sedimentproben werden die Trockenmasse und der Gesamtgehalt

an organischem Kohlenstoff bestimmt (z. B. anhand von drei Proben des dotierten Sediments oder des Kontrollsediments).

Die Trockenmasse der Bestandteile (Torf, Sand und Kaolin) ist in g sowie als Prozentanteil der gesamten Trockenmasse anzugeben.

Das Volumen des bei der Herstellung des Sediments hinzuzugebenden Wassers ist ebenfalls in Prozent der gesamten Trockenmasse zu protokollieren. (Die Angabe 100 % Trockenmasse + 46 % Wasser beispielsweise bedeutet, dass auf 1000 g (Trockenmasse) insgesamt 460 ml Wasser kommen; entsprechend ergibt sich eine Feuchtmasse des Sediments von 1460 g.)

Lagerung

Die trockenen Bestandteile des künstlichen Sediments können an einem trockenen und kühlen Ort bei Raumtemperatur gelagert werden. Das hergestellte feuchte Sediment kann (zur späteren Verwendung ausschließlich in der Kultur) bei 4 ± 2 °C im Dunkeln über einen Zeitraum von 2-4 Wochen ab dem Tag der Herstellung aufbewahrt werden (8).

Das Sediment ist unmittelbar nach dem Auftragen des Prüfstoffs zu gebrauchen, sofern keine Informationen darüber vorliegen, dass das betreffende Sediment gelagert werden kann, ohne dass die Toxizität und Bioverfügbarkeit des Prüfstoffs beeinflusst wird. In diesem Fall können Proben des dotierten Sediments bis zur Analyse unter den für den betreffenden Prüfstoff empfohlenen Bedingungen gelagert werden.

ANLAGE 6

EMPFOHLENE OLIGOCHAETEN-ARTEN FÜR BIOAKKUMULATIONSTESTS

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

Der Schlammröhrenwurm (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) bewohnt mit Schleim ausgekleidete Röhren in Süßwassersedimenten. In diesen Röhren leben die Würmer mit dem Kopf nach unten und nehmen Sedimentpartikel auf; verwertet werden die mit den Partikeln verbundenen Mikroorganismen sowie organische Abfälle. Der hintere Teil der Würmer treibt gewöhnlich im Überstandswasser, um die Tiere mit Sauerstoff zu versorgen. *Tubifex tubifex* bewohnt zwar vielfältige Segmenttypen auf der gesamten nördlichen Halbkugel, bevorzugt aber verhältnismäßig feine Partikelgrößen (59). Die Eignung dieser Art für Ökotoxizitätsprüfungen wird beispielsweise in (8)(29)(31)(39)(60)(62)(63) bestätigt.

Kulturmethoden

Damit eine ausreichende Anzahl an Würmern (*Tubifex tubifex*) für die Bioakkumulationstests verfügbar ist, müssen die Würmer in einer Dauerkultur vorrätig gehalten werden. Für eine *T.-tubifex*-Kultur wird ein System mit einem künstlichen Sediment auf der Grundlage des künstlichen Bodens gemäß Prüfmethode C.8 (40) und mit rekonstituiertem Wasser nach Prüfmethode C.1 empfohlen (8).

Als Kulturgefäße können Glas- oder Edelstahlbehältnisse mit einer Höhe von 12-20 cm verwendet werden. In die Kulturgefäße wird jeweils eine Schicht des feuchten künstlichen Sediments gefüllt, das wie in Anlage 5 beschrieben hergestellt wurde. Die Sedimentschicht muss so tief sein, dass die Würmer sich in natürlicher Weise eingraben können (bei *T. tubifex* mindestens 2 cm tief). Zum System wird rekonstituiertes Wasser hinzugegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass das Sediment möglichst wenig gestört wird. Der Wasserkörper ist mit einer Pasteur-Pipette, die etwa 2 cm über der Sedimentoberfläche angesetzt wird, schwach zu belüften (z. B. mit 2 Blasen auf 0,45µm gefilterte Luft pro Sekunde). Die Testtemperatur sollte 20 ±2 °C betragen.

Die Würmer werden bis zu einer Besatzdichte von maximal 20 000 Tieren/m² Sedimentoberfläche eingesetzt. Eine höhere Besatzdichte kann das Wachstum und die Vermehrung der Tiere beeinträchtigen (43).

In Kulturen mit künstlichen Sedimenten müssen die Würmer gefüttert werden. Als Zusatzfutter kann fein gemahlene Fischfutter (z. B. TetraMin[®]) angeboten werden (8); Klerks 1994, persönliche Auskunft. Das Fütterungsprotokoll muss ein ausreichendes Wachstum und eine ausreichende Vermehrung ermöglichen und in der Kultur mindestens für die Entstehung von Ammoniak und für das Wachstum von Pilzen sorgen. Das Futter kann zweimal wöchentlich bereitgestellt werden (z. B. 0,6-0,8 mg/cm² Sedimentoberfläche). Praktische Erfahrungen haben gezeigt, dass die Bereitstellung von in entionisiertem Wasser suspendiertem und homogenisiertem Futter eine homogene Verteilung des Futters auf der Sedimentoberfläche in den Kulturbehältnissen erleichtert.

Um eine Akkumulation von Ammoniak zu vermeiden, ist das Überstandswasser mit einem Durchflusssystem oder mindestens zweimal wöchentlich manuell auszutauschen. In den Stammkulturen ist das Sediment alle drei Monate zu wechseln.

Wenn ausschließlich adulte Würmer benötigt werden, kann die Entnahme aus der Kultur erfolgen, indem das Kultursediment durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm gesiebt wird. Wenn Kokons ausgesiebt werden sollen, ist eine Maschenweite von 0,5 mm zu empfehlen; für juvenile Würmer ist eine Maschenweite von 0,25 mm geeignet. Die Siebe können nach dem Aussieben des Sediments in rekonstituiertes Wasser gestellt werden. Die Würmer verlassen dann das Sieb und können mit einer weichen Stahlpinzette oder mit einer feuerpolierten Pipette aus dem Wasser aufgenommen werden.

Zur Durchführung eines Tests und zur Anlage neuer Kulturen dürfen ausschließlich unversehrte und eindeutig identifizierte Exemplare der Art *Tubifex tubifex* (z. B. (64)) verwendet werden. Tote oder verletzte Würmer sowie von Pilzhyphen befallene Kokons sind zu entsorgen.

Aus einer synchronisierten Kultur können nach Bedarf in geeigneten Zeitabständen Würmer einer bestimmten Altersstufe entnommen werden. In den ausgewählten Intervallen (z. B. alle zwei Wochen) werden neue Kulturgefäße mit Tieren einer bestimmten Altersstufe (z. B. in Kokons) angesetzt. Bei den hier beschriebenen Kulturbedingungen haben die Würmer das adulte Stadium nach 8-10 Wochen erreicht. Die Kulturen können entnommen werden, wenn die Würmer neue Kokons hergestellt haben (etwa nach 10 Wochen). Die entnommenen adulten Tiere können für Tests verwendet werden, und mit den Kokons können neue Kulturen angelegt werden.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

Lumbriculus variegatus, Lumbriculidae, Oligochaeta, lebt ebenfalls weltweit in Süßwassersedimenten und wird häufig in Ökotoxizitätsprüfungen verwendet. Informationen zur Biologie, zu Kulturbedingungen und zur Empfindlichkeit dieser Art sind den Quellen (1)(6)(9)(36) zu entnehmen. *Lumbriculus variegatus* kann in dem auch für *T. tubifex* empfohlenen künstlichen Sediment kultiviert werden; dabei sind allerdings gewisse Einschränkungen zu beachten (8). Da *L. variegatus* in der Natur gröbere Sedimente bevorzugt als *T. tubifex* (59), können Laborkulturen mit dem für *T. tubifex* verwendeten künstlichen Sediment nach 4-6 Monaten zum Erliegen kommen. Erfahrungsgemäß kann *L. variegatus* in einem sandigen Substrat (z. B. Quarzsand oder feiner Kies) in einem Durchflusssystem mit Fischfutter über mehrere Jahre gehalten werden, ohne dass das Substrat erneuert werden muss. Ein wichtiger Vorzug von *L. variegatus* gegenüber anderen aquatischen Oligochaeten ist die rasche Vermehrung mit entsprechend rascher Zunahme der Biomasse bei in Labors gezogenen Populationen ((1), (6), (9) und (10)).

Kulturmethoden

Die Kulturbedingungen für *Lumbriculus variegatus* werden eingehend in Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1) und U.S. EPA (2000) (6) beschrieben. Im Folgenden werden diese Bedingungen kurz zusammengefasst.

Die Würmer können in großen Aquarien (57-80 l) bei 23°C mit einer Photoperiode von

16 L:8 D (100-1000 lx) und täglichem Austausch des natürlichen Wassers (45 - 50 l pro Aquarium) gezogen werden. Das Substrat wird hergestellt, indem ungebleichte braune Papiertücher in Streifen geschnitten und einige Sekunden mit Kulturwasser befeuchtet werden, damit ein Substrat aus kleinen Papierteilchen entsteht. Dieses Substrat kann dann umgehend im Aquarium zur Zucht von *Lumbriculus* verwendet werden, indem der Boden des Aquariums bedeckt wird; es kann aber auch in entionisiertem Wasser bis zur Verwendung zu einem späteren Zeitpunkt gelagert werden. In einem Becken hält das frische Substrat etwa zwei Monate.

Jede Wurmkultur wird mit 500-1000 Würmern begonnen; die Würmer werden dreimal wöchentlich mit 10 ml einer Suspension mit 6 g Forellen-Starterfutter (erneuert oder Durchfluss) gefüttert. Um der Ausbreitung von Bakterien und Pilzen entgegenzuwirken, werden statische und semistatische Kulturen seltener gefüttert. Das Futter und das Papiersubstrat werden auf die in Bioakkumulationstests zu verwendenden Stoffe untersucht.

Unter diesen Bedingungen verdoppelt sich die Anzahl der Tiere in der Kultur gewöhnlich in 10-14 Tagen.

Lumbriculus variegatus kann aus den Kulturen entnommen werden, z. B. indem das Substrat durch ein feinmaschiges Sieb gegeben wird oder indem die Organismen mit einer feuerpolierten Glaspipette mit weiter Öffnung (ca. 5 mm Durchmesser) in ein separates Becherglas gegeben werden. Wenn auch das Substrat in das Becherglas gegeben wird, ist das Glas mit den Würmern und dem Substrat über Nacht unter kontinuierlichem Durchfluss zu spülen; dabei wird das Substrat aus dem Glas abgetrennt, und die Würmer bleiben am Boden des Gefäßes zurück. Anschließend können die Würmer in die neuen Kulturbehältnisse gesetzt oder weiter im Test verwendet werden, wie in (1) und (6) beschrieben. Verletzungen und die Provokation von Autotomieverhalten sind zu vermeiden, beispielsweise durch Handhabung der Würmer mit Pipetten mit feuerpolierten Kanten oder mit Edelstahl-Zahnstochern.

Als kritisch ist zu bewerten, wenn sich *L. variegatus* in Tests zur Bioakkumulation in Sedimenten in der Reproduktionsphase befindet (Architomie nach Morphallaxis). Diese geschlechtslose Vermehrung führt zur Entstehung von zwei Fragmenten, die eine bestimmte Zeit keine Nahrung mehr aufnehmen, bis sich das Kopf- bzw. Schwanzende regeneriert hat (z. B. (36), (37)). Anders als bei Tubificiden, die sich nicht durch Teilung vermehren, kann bei *L. variegatus* keine kontinuierliche Aufnahme von Sedimenten und Verunreinigungen durch Ingestion erfolgen.

Daher sollte eine Synchronisierung vorgenommen werden, um die unkontrollierte Reproduktion und Regeneration und anschließend entsprechend große Unterschiede in den Testergebnissen zu minimieren. Diese Unterschiede können auftreten, wenn bei einigen einzelnen Tiere eine Fragmentierung stattgefunden hat und diese daher über einen bestimmten Zeitraum keine Nahrung aufnehmen und entsprechend weniger als andere Exemplare, die sich im Versuch nicht geteilt haben, durch den Prüfstoff belastet sind (38). 10-14 Tage vor Beginn der Exposition werden die Würmer manuell zerteilt (Synchronisierung) (65). Für den Test sind große Würmer zu verwenden, die keine Anzeichen einer kürzlich erfolgten Teilung aufweisen sollten. Diese Würmer können auf einen Glasträger in einen Tropfen Kulturwasser gesetzt und in der Mitte des Körpers mit einem Skalpell durchgeschnitten werden. Dabei ist allerdings darauf zu achten, dass die hinteren Enden ähnlich groß sind. Danach wird abgewartet, bis die hinteren Enden in

einem Kulturgefäß, das das auch in der Testkultur verwendete Substrat sowie rekonstituiertes Wasser enthält, neue Kopfteile ausgebildet haben. Erst dann kann mit der Exposition begonnen werden. Die Kopfteile haben sich dann regeneriert, wenn die synchronisierten Würmer sich im Substrat eingraben. (Dass sich Kopfteile regeneriert haben, kann zusätzlich durch Sichtprüfung einer repräsentativen Teilprobe unter einem binokularen Mikroskop festgestellt werden.) Danach kann davon ausgegangen werden, dass sich die Testorganismen in einem ähnlichen physiologischen Zustand befinden. Wenn bei synchronisierten Würmern während des Versuchs eine Reproduktion durch Morphallaxis erfolgt, ist also anzunehmen, dass praktisch alle Tiere in gleichem Umfang dem dotierten Sediment ausgesetzt wurden. Die synchronisierten Würmer werden gefüttert: wenn die Würmer beginnen, sich in das Substrat einzugraben, oder 7 Tage nach dem Zerteilen. Die Fütterung sollte etwa der Fütterung der regulären Kulturen vergleichbar sein; es kann sich jedoch empfehlen, die synchronisierten Würmer mit Futter derselben Herkunft wie im eigentlichen Versuch zu versorgen. Die Würmer sind bei der vorgesehenen Versuchstemperatur zu halten (d. h. bei 20 ± 2 °C). Nach der Regeneration werden unversehrte vollständige Würmer ähnlicher Größe, die nach einem leichten mechanischen Reiz aktiv schwimmen oder zu kriechen beginnen, für den Versuch verwendet. Verletzungen und die Provokation von Autotomieverhalten sind zu vermeiden, beispielsweise durch Handhabung der Würmer mit Pipetten mit feuerpolierten Kanten oder mit Edelstahl-Zahnstochern.

Wenn *Lumbriculus variegatus* verwendet wird, ist während des Tests unter angemessenen Bedingungen wegen der spezifischen Reproduktionsform bei dieser Art eine Erhöhung der Anzahl der Würmer zu erwarten (6). Eine fehlende Reproduktion bei einem Bioakkumulationstest mit *L. variegatus* ist zu protokollieren und bei der Interpretation der Testergebnisse zu berücksichtigen.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (im Ringtest nicht validiert)**

Branchiura sowerbyi lebt in verschiedenen Sedimenttypen (in Stauseen, Seen, Teichen und Flüssen), ursprünglich in tropischen Regionen. Die Art ist aber auch in warmen Wasserkörpern in der nördlichen Hemisphäre anzutreffen. Häufiger kommt *Branchiura sowerbyi* allerdings in Schlamm-Ton-Sedimenten mit hohem Gehalt an organischen Bestandteilen vor. Die Würmer leben in der Sedimentschicht. Selbst das hintere Ende der Würmer ist gewöhnlich eingegraben. Diese Art ist an den Kiemenfilamenten am hinteren Teil leicht zu erkennen. Die adulten Tiere werden bei einer Feuchtmasse von 40-50 mg 9-11 cm lang. Sie haben eine hohe Reproduktionsrate; die Populationen verdoppeln sich unter den im Folgenden beschriebenen Temperatur- und Fütterungsbedingungen in weniger als 2 Wochen (Aston et al., 1982, (65)). *B. sowerbyi* wurde bereits sowohl in Toxizitätstests als auch in Untersuchungen zur Bioakkumulation verwendet (Marchese und Brinkhurst 1996 (31) bzw. Roghair et al. 1996, (67)).

Kulturmethoden

Im Folgenden werden die Kulturbedingungen für *Branchiura sowerbyi* beschrieben (Angaben von Mercedes R. Marchese, INALI, Argentinien, und Carla J. Roghair, RIVM, Niederlande).

Die Testorganismen müssen nicht nach einem bestimmten Verfahren kultiviert werden.

Die Kultivierung kann in nicht kontaminiertem, natürlichem Sediment erfolgen (31). Erfahrungsgemäß bietet ein aus natürlichem Sediment und Sand bestehendes Medium noch günstigere Lebensbedingungen für die Würmer als reines natürliches Sediment (32)(67). Für die Kultur können 3-l-Bechergläser mit einem aus 1500 ml Sediment und Wasser bestehenden Medium mit 375 ml natürlichem nicht kontaminiertem Sediment (ca. 10 % TOC, ca. 17 % Partikel $\leq 63 \mu\text{m}$), 375 ml sauberem Sand (M32) und 750 ml rekonstituiertem oder entchlortem Leitungswasser verwendet werden (31)(32)(67). Papiertücher sind ebenfalls als Kultursubstrat geeignet; die Vermehrung erfolgt dann allerdings langsamer als in natürlichem Sediment. In semistatischen Systemen wird die Wasserschicht im Becherglas langsam belüftet, und das Überstandswasser ist wöchentlich zu erneuern.

In jedes Becherglas werden zunächst 25 juvenile Würmer eingesetzt. Nach zwei Monaten werden die großen Würmer mit einer Pinzette aus dem Sediment genommen und in ein neues Becherglas mit frisch hergestelltem Sediment-Wasser-Medium eingesetzt. Das erste Becherglas enthält auch Kokons und juvenile Würmer. Auf diese Weise können bis zu 400 juvenile Würmer pro Becherglas gewonnen werden. Adulte Würmer können mindestens ein Jahr lang zur Vermehrung verwendet werden.

Die Kulturen sind bei einer Temperatur von 21-25 °C zu halten. Die Temperatur darf maximal um ± 2 °C schwanken. Die Entwicklung eines Embryos von der Eiablage bis zum Verlassen des Kokons dauert bei 25 °C gewöhnlich drei Wochen. Bei *B. sowerbyi* wurden bei einer Temperatur von 25 °C für jeden überlebenden Wurm im Schlamm 6,36 (31) bis 11,2 (30) Eier gezählt. Die Anzahl der Eier pro Kokon schwankt von 1,8-2,8 (66)(69) bis zu 8 (68).

Der Anteil des gelösten Sauerstoffs sowie die Temperatur und der pH-Wert sind wöchentlich zu messen. Fischfutter (z. B. TetraMin[®]) kann nach Ermessen zwei- bis dreimal wöchentlich als Suspension angeboten werden. Alternativ können die Würmer auch mit aufgetautem Salat gefüttert werden.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Art ist die hohe individuelle Biomasse (bis zu 40-50 mg Feuchtmasse pro Tier). Daher kann diese Art für Bioakkumulationstests mit nicht radioaktiv markierten Prüfstoffen verwendet werden. Die Exposition kann in den auch für *T. tubifex* oder *L. variegatus* verwendeten Systemen mit jeweils einem Tier pro Replikat erfolgen (11). Wenn keine größeren Becken verwendet werden, ist die Anzahl der Replikate jedoch zu erhöhen (11). Außerdem ist bei dieser Art eine Anpassung in Bezug auf das als Validitätskriterium berücksichtigte Eingrabbungsverhalten vorzunehmen.

LITERATUR

- (1) 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.
- (2) Europäische Kommission (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I - IV. Amt für Veröffentlichungen der Europäischen Gemeinschaften), Luxemburg.
- (3) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- (4) 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.
- (5) Kapitel C.13 dieses Anhangs, Biokonzentration: Durchfluss-Fischttest.
- (6) 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, March 2000.
- (7) Kapitel C.27 dieses Anhangs, Chironomiden-Toxizitätstest in Sediment-Wasser-Systemen mit dotiertem Sediment
- (8) 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.
- (9) 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 nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.
- (10) 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.

- (11) 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, Deutschland. Abschlussbericht zum F + E-Vorhaben 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J., und Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. (Validierung einer Methode zur standardisierten Bioakkumulation mit endobenthischen aquatischen Oligochaeten) Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), UBA-FB 202 67 437.
- (13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttell, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T., und (1990). Effects of tributyltin within a *Thalassia* seagrass ecosystem. Estuaries 13, 301-310.
- (14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. In: R. Nagel und R. Loskill (Hrsg.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Zusammenfassung des internationalen Workshop, Berlin 1990. VCH, Weinheim
- (15) Landrum, P.F., Lee II, H., und Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709-1725.
- (16) Markwell, R.D., Connell, D.W., und Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, 1443-1450.
- (17) Gabric, A.J., Connell, D.W., und Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24, 1225-1231.
- (18) Kukkonen, J., und Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.
- (19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D., und Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, 1501-1514.
- (20) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological effects test guidelines. OPPTS

- (22) Die folgenden Kapitel in diesem Anhang:
Kapitel A.4, Dampfdruck
Kapitel A.5, Oberflächenspannung
Kapitel A.6, Wasserlöslichkeit
Kapitel A.8, Verteilungskoeffizient, Schüttelmethode
Kapitel A.24, Verteilungskoeffizient, HPLC-Methode
Kapitel C.7, Abbaubarkeit, Abiotischer Abbau: Hydrolyse in Abhängigkeit vom pH-Wert
Kapitel C.4 A-F, Bestimmung leichter biologischer Abbaubarkeit
Kapitel C.19, Schätzung des Adsorptionskoeffizienten (K_{OC}) im Boden und in Klärschlamm mittels der Hochdruck-Flüssigchromatografie (HPLC).
Kapitel C.29, Leichte biologische Abbaubarkeit – Bestimmung von CO_2 in geschlossenen Flaschen (Headspace-Test)
- (23) OECD (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. OECD-Veröffentlichungen zu Gesundheit und Arbeitsschutz, Reihe „*Testing and Assessment*“, Nr. 3, OECD, Paris.
- (24) Antoine, M.D., Dewanathan, S., und Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. *Microchem. J.* 43, 165-172.
- (25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke & G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (Hrsg.), *The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J* (Vol. editor: B. Beek): *Bioaccumulation - New Aspects and Developments*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (26) Spacie, A., und Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (27) Hawker, D.W., und Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22, 701-707.
- (28) 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.
- (29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P., und Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1061-1072.

- (30) Aston, R.J., und Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. *Aquaculture* 26, 155-160.
- (31) Marchese, M.R., und Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. *Hydrobiologia* 334, 163-168.
- (32) Roghair, C.J., und Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719102027.
- (33) Kapitel C.1 dieses Anhangs, Akute Toxizität für Fische.
- (34) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
- (35) 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.
- (36) Leppänen, M.T. und Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (37) Leppänen, M.T., und Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
- (38) 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.
- (39) 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.
- (40) Kapitel C.8 dieses Anhangs: Toxizität bei Regenwürmern.
- (41) 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.
- (42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23, 588-595.

- (43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). *In*: R.O. Brinkhurst und D.G. Cook (Hrsg.): Aquatic Oligochaeta Biology, 175-184. Plenum Press, New York.
- (44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.
- (45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K., und Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.
- (46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32, 1897-1905.
- (47) 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.
- (48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L., und Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 1431-1436.
- (49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A., und Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography*, 30, 1099-1105.
- (50) Bligh, E.G., und Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- (51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D., und Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Institut für Wasserqualität, Dänemark.
- (53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W., und Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environment* 109/110, 411-421
- (54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische - Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany.

- (55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries und Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (56) Van Brummelen, T.C., und Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M., und Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (58) 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.
- (59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. *Arch. Hydr.* 63, 310-386.
- (60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. *Environ. Sci. Technol.* 21, 785-790.
- (61) Chapman, P.M., Farrell, M.A., und Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 47-67.
- (62) Chapman, P.M., Farrell, M.A., und Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology* 2, 69-78.
- (63) Rodriguez, P., und Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. *In: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (Hrsg.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality.* Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No.* 22.
- (65) 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 für das Umweltbundesamt Berlin, FKZ 202 67 429.
- (66) Aston, R.J., Sadler, K., und Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. *Aquaculture* 29, 137-145.

- (67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E., und Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge *Chironomus riparius* and the tubificid oligochaete worm *Branchiura sowerbyi*. RIVM Report 719101026.
- (68) Aston, R.J., (1984). The culture of *Branchiura sowerbyi* (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. *Aquaculture* 40, 89-94.
- (69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G., und Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Tubificidae). *Hydrobiologia*, 278, 267-274“