

Amtsblatt der Europäischen Union

L 54



Ausgabe
in deutscher Sprache

Rechtsvorschriften

59. Jahrgang

1. März 2016

Inhalt

II *Rechtsakte ohne Gesetzescharakter*

VERORDNUNGEN

- ★ **Verordnung (EU) 2016/266 der Kommission vom 7. Dezember 2015 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt ⁽¹⁾** 1

⁽¹⁾ Text von Bedeutung für den EWR

DE

Bei Rechtsakten, deren Titel in magerer Schrift gedruckt sind, handelt es sich um Rechtsakte der laufenden Verwaltung im Bereich der Agrarpolitik, die normalerweise nur eine begrenzte Geltungsdauer haben.

Rechtsakte, deren Titel in fetter Schrift gedruckt sind und denen ein Sternchen vorangestellt ist, sind sonstige Rechtsakte.

II

(Rechtsakte ohne Gesetzescharakter)

VERORDNUNGEN

VERORDNUNG (EU) 2016/266 DER KOMMISSION

vom 7. Dezember 2015

zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethode n gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt

(Text von Bedeutung für den EWR)

DIE EUROPÄISCHE KOMMISSION —

gestützt auf den Vertrag über die Arbeitsweise der Europäischen Union,

gestützt auf die Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission ⁽¹⁾, insbesondere auf Artikel 13 Absatz 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) In der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission ⁽²⁾ sind die in der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 vorgesehenen Prüfmethode n zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften, der Toxizität und der Ökotoxizität von Stoffen festgelegt.
- (2) Es ist angezeigt, die Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zu aktualisieren und um neue und aktualisierte Prüfmethode n zu ergänzen, die die OECD kürzlich angenommen hat, um dem technischen Fortschritt Rechnung zu tragen und sicherzustellen, dass die Zahl der verwendeten Versuchstiere im Einklang mit der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates ⁽³⁾ reduziert wird. Interessenträger wurden zu dem vorliegenden Entwurf konsultiert.
- (3) Diese Anpassung betrifft 20 neue Prüfmethode n — eine neue Methode zur Bestimmung einer physikalisch-chemischen Eigenschaft, elf neue Prüfmethode n und drei aktualisierte Prüfmethode n zur Bewertung der Ökotoxizität sowie fünf neue Prüfmethode n zur Bewertung des Verbleibs und des Verhaltens in der Umwelt.
- (4) Die Verordnung (EG) Nr. 440/2008 sollte daher entsprechend geändert werden.
- (5) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des mit Artikel 133 der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 eingesetzten Ausschusses —

⁽¹⁾ ABl. L 396 vom 30.12.2006, S. 1.

⁽²⁾ Verordnung (EG) Nr. 440/2008 der Kommission vom 30. Mai 2008 zur Festlegung von Prüfmethode n gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) (ABl. L 142 vom 31.5.2008, S. 1).

⁽³⁾ 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).

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Der Anhang der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 wird nach Maßgabe des Anhangs der vorliegenden Verordnung geändert.

Artikel 2

Diese Verordnung tritt am dritten Tag nach ihrer Veröffentlichung im *Amtsblatt der Europäischen Union* in Kraft.

Diese Verordnung ist in allen ihren Teilen verbindlich und gilt unmittelbar in jedem Mitgliedstaat.

Brüssel, den 7. Dezember 2015

Für die Kommission
Der Präsident
Jean-Claude JUNCKER

ANHANG

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

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

„Hinweis:

Bevor eine der folgenden Methoden zur Prüfung eines mehrkomponentigen Stoffes (*multi-constituent substance*, MCS), eines Stoffes mit unbekannter oder variabler Zusammensetzung, komplexer Reaktionsprodukte oder biologischer Materialien (UVCB-Stoffe) oder eines Gemischs angewendet wird und soweit in der jeweiligen Methode deren Anwendbarkeit zur Prüfung von MCS, UVCB oder Gemischen nicht vorgesehen ist, sollte überlegt werden, ob die Prüfmethode für den vorgesehenen aufsichtsrechtlichen Zweck geeignet ist.

Wenn die Methode zur Prüfung eines MCS, UVCB oder Gemischs verwendet wird, sind in größtmöglichem Umfang hinreichende Informationen zur Zusammensetzung des Gemischs bereitzustellen (z. B. durch Angabe der chemischen Zusammensetzung, zu den jeweiligen Mengenanteilen und zu ihren relevanten Merkmalen der Komponenten).“

- (2) Kapitel A.24 wird angefügt:

„A.24. VERTEILUNGSKOEFFIZIENT (N-OCTANOL/WASSER), HOCHLEISTUNGS-FLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE (HPLC-METHODE)

EINLEITUNG

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

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

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

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

2. Der P_{ow} -Wert ist ein Schlüsselparameter in Studien zur Persistenz chemischer Stoffe in der Umwelt. Eine hoch signifikante Beziehung zwischen dem P_{ow} -Wert nicht ionisierter Stoffe und ihrer Bioakkumulation in Fischen wurde nachgewiesen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass der P_{ow} -Wert ein hilfreicher Parameter zur Prognose der Adsorption im Boden und in Sedimenten und zur Feststellung quantitativer Struktur-Wirkungs-Beziehungen bei vielfältigen biologischen Wirkungen ist.
3. Der ursprüngliche Vorschlag für diese Prüfmethode beruhte auf einem Artikel von C. V. Eadsforth und P. Moser (1). 1986 hat das deutsche Umweltbundesamt die Entwicklung der Prüfmethode und einen OECD-Ringversuch koordiniert (2).

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

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

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

PRINZIP DER METHODE

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

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

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

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

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

Dabei sind:

a, b = lineare Regressionskoeffizienten.

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

9. Durch Umkehrphasen-HPLC können Verteilungskoeffizienten im $\log P_{ow}$ -Bereich von 0 bis 6 bestimmt werden; in Ausnahmefällen sind Berechnungen aber auch im $\log P_{ow}$ -Bereich von 6 bis 10 möglich. Dazu muss unter Umständen allerdings die mobile Phase modifiziert werden (3). Für starke Säuren und Basen sowie für Metallkomplexe, Stoffe, die mit dem Elutionsmittel reagieren, und für grenzflächenaktive Stoffe ist diese Methode nicht geeignet. Messungen an ionisierbaren Stoffen können nur an deren nicht ionisierter Form (freie Säure oder freie Base) durch Verwendung eines geeigneten Puffers mit einem pH-Wert unter (freie Säure) bzw. über (freie Base) dem pK_a -Wert durchgeführt werden. Alternativ könnte in Zukunft eine pH-Messmethode zur Prüfung ionisierbarer Stoffe zur Verfügung stehen, die als Alternativmethode (6) angewendet werden könnte. Wenn der $\log P_{ow}$ -Wert für eine Einstufung oder eine Bewertung des Umweltrisikos ermittelt wird, ist die Prüfung bei einem für die jeweilige natürliche Umgebung typischen pH-Bereich vorzunehmen (d. h. im pH-Bereich von 5,0 bis 9).
10. Manchmal können Verunreinigungen die Interpretation der Ergebnisse erschweren, weil die Zuordnung der Peaks nicht eindeutig ist. Für Gemische, die ein nicht aufgelöstes Band ergeben, sollten jeweils die obere und die untere Grenze des $\log P_{ow}$ -Peaks und die prozentuale Fläche jedes $\log P_{ow}$ -Peaks angegeben werden. Für Gemische, die aus einer Gruppe von Homologen bestehen, sollte auch der gewichtete durchschnittliche $\log P_{ow}$ -Wert angegeben werden (7); dieser ist ausgehend von den einzelnen P_{ow} -Werten und den entsprechenden prozentualen Flächen zu berechnen (8). Alle Peaks, die mit einer Fläche von mindestens 5 % zur gesamten Peak-Fläche beitragen, sind in der Berechnung zu berücksichtigen (9):

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

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

INFORMATIONEN ZUM PRÜFSTOFF

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

QUALITÄTSKRITERIEN

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

REFERENZSTOFFE

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

Tabelle 1

Empfohlene Referenzstoffe

	CAS-Nummer	Referenzstoff	$\log P_{ow}$	pKa
1	78-93-3	2-Butanon (Methylethylketon)	0,3	
2	1122-54-9	4-Acetylpyridin	0,5	
3	62-53-3	Anilin	0,9	
4	103-84-4	Acetanilid	1,0	
5	100-51-6	Benzylalkohol	1,1	
6	150-76-5	4-Methoxyphenol	1,3	pKa = 10,26
7	122-59-8	Phenoxyessigsäure	1,4	pKa = 3,12

	CAS-Nummer	Referenzstoff	log P _{ow}	pKa
8	108-95-2	Phenol	1,5	pKa = 9,92
9	51-28-5	2,4-Dinitrophenol	1,5	pKa = 3,96
10	100-47-0	Benzonitril	1,6	
11	140-29-4	Phenylacetonitril	1,6	
12	589-18-4	4-Methylbenzylalkohol	1,6	
13	98-86-2	Acetophenon	1,7	
14	88-75-5	2-Nitrophenol	1,8	pKa = 7,17
15	121-92-6	3-Nitrobenzoesäure	1,8	pKa = 3,47
16	106-47-8	4-Chloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	98-95-3	Nitrobenzol	1,9	
18	104-54-1	Zinnamylalkohol (Zimtalkohol)	1,9	
19	65-85-0	Benzoessäure	1,9	pKa = 4,19
20	106-44-5	p-Cresol	1,9	pKa = 10,17
21	140-10-3 (trans)	Zimtsäure	2,1	pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans)
22	100-66-3	Anisol	2,1	
23	93-58-3	Methylbenzoat	2,1	
24	71-43-2	Benzol	2,1	
25	99-04-7	3-Methylbenzoesäure	2,4	pKa = 4,27
26	106-48-9	4-Chlorphenol	2,4	pKa = 9,1
27	79-01-6	Trichlorethylen	2,4	
28	1912-24-9	Atrazin	2,6	
29	93-89-0	Ethylbenzoat	2,6	
30	1194-65-6	2,6-Dichlorbenzonitril	2,6	
31	535-80-8	3-Chlorbenzoesäure	2,7	pKa = 3,82

	CAS-Nummer	Referenzstoff	log P _{ow}	pKa
32	108-88-3	Toluol	2,7	
33	90-15-3	1-Naphthol	2,7	pKa = 9,34
34	608-27-5	2,3-Dichloranilin	2,8	
35	108-90-7	Chlorbenzol	2,8	
36	1746-13-0	Allyl-Phenylether	2,9	
37	108-86-1	Brombenzol	3,0	
38	100-41-4	Ethylbenzol	3,2	
39	119-61-9	Benzophenon	3,2	
40	92-69-3	4-Phenylphenol	3,2	pKa = 9,54
41	89-83-8	Thymol	3,3	
42	106-46-7	1,4-Dichlorbenzol	3,4	
43	122-39-4	Diphenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	91-20-3	Naphthalin	3,6	
45	93-99-2	Phenylbenzoat	3,6	
46	98-82-8	Isopropylbenzol	3,7	
47	88-06-2	2,4,6-Trichlorphenol	3,7	pKa = 6
48	92-52-4	Biphenyl	4,0	
49	120-51-4	Benzylbenzoat	4,0	
50	88-85-7	2,4-Dinitro-6-sec-butylphenol	4,1	
51	120-82-1	1,2,4-Trichlorbenzol	4,2	
52	143-07-7	Dodecansäure	4,2	pKa = 5,3
53	101-84-8	Diphenylether	4,2	
54	85-01-8	Phenanthren	4,5	
55	104-51-8	n-Butylbenzol	4,6	

	CAS-Nummer	Referenzstoff	log P _{ow}	pKa
56	103-29-7	Dibenzyl	4,8	
57	3558-69-8	2,6-Diphenylpyridin	4,9	
58	206-44-0	Fluoranthren	5,1	
59	603-34-9	Triphenylamin	5,7	
60	50-29-3	DDT	6,5	

BESCHREIBUNG DER METHODE

Vorabschätzung des Verteilungskoeffizienten

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

Gerät

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

Mobile Phase

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

Gelöste Stoffe

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

Prüfbedingungen

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

Bestimmung der Totzeit t_0

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

Regressionsgleichung

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

BESTIMMUNG DES P_{ow} -WERTES DES PRÜFSTOFFS

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

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Prüfbericht

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

- $\log P_{ow}$ -Werte im Verhältnis zur prozentualen Fläche des $\log P_{ow}$ -Peaks;
- Berechnung mit einer Regressionsgeraden;
- gegebenenfalls berechnete durchschnittliche $\log P_{ow}$ -Werte.

LITERATUR

- (1) C.V. Eadsforth und P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.
- (2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss und H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. *Chemosphere*. 17, 361.
- (3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. *Pesticide Science*. 17, 311.
- (4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt und R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. *Pesticide Science*. 12, 219.
- (5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. *Chemosphere*. 10, 73.
- (6) OECD (2000). Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, November 2000.
- (7) OSPAR (1995). 'Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995', Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20.-24. Februar 1995.
- (8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez und C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.
- (9) E. A. Vik, S. Bakke und K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. *Environmental Modelling & Software* Vol. 13, S. 529-537.
- (10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem und K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. *Chemosphere*. 9, 683.
- (11) W.E. Hammers, G.J. Meurs und C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. *J. Chromatography* 247, 1.
- (12) J.E. Haky und A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. *J. Liq. Chromatography*. 7, 675.
- (13) S. Fujisawa und E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Biomedical Materials Research*. 15, 787.
- (14) C. Hansch und A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Wiley, New York.

- (15) C. Hansch, Vorsitz; A. J. Leo, Dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.
 - (16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479.
 - (17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, und J. Inczedy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. *J. Liq. Chromato.* 3, 1669.
-

Anlage

Methoden zur Berechnung von P_{ow} -Werten

EINLEITUNG

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

Prinzip der Berechnungsverfahren

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

Zuverlässigkeit berechneter Werte

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

Fujita-Hansch'sche π -Methode

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

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

wobei PhX ein aromatischer Abkömmling und PhH der Ausgangsstoff ist.

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

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

Rekker-Methode

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

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

wobei a_i für die Häufigkeit steht, mit der eine bestimmte Substruktur im Molekül vorkommt, und f_i das $\log P_{ow}$ -Inkrement der Substruktur ist. Die Glieder für die Wechselwirkungen lassen sich als ein ganzes Vielfaches einer einzigen Konstante C_m (der so genannten magischen Konstante) angeben. Die Substrukturkonstanten f_i und C_m wurden aus einer Liste von 1 054 experimentell ermittelten P_{ow} -Werten (825 Verbindungen) mithilfe der mehrfachen Regressionsanalyse bestimmt (6)(8). Die Bestimmung der Glieder für die Wechselwirkungen erfolgt nach den in der Literatur angegebenen Regeln (6)(8)(9).

Hansch-Leo-Methode

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

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

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

KOMBINIERTE METHODE

8. Die Berechnung der $\log P_{ow}$ -Werte komplexer Moleküle kann beträchtlich verbessert werden, wenn das Molekül in größere Substrukturen zerlegt wird, für die zuverlässige $\log P_{ow}$ -Werte vorliegen, sei es aus Tabellen (3) (4), sei es aus eigenen Messungen. Solche Substrukturen (z. B. Heterocyclen, Anthrachinon, Azobenzol) können dann mit den Hansch'schen π -Werten oder mit den Substrukturkonstanten nach Rekker oder Leo kombiniert werden.

Bemerkungen

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

LITERATUR ZU BERECHNUNGSMETHODEN

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl und D.H. Rosenblatt (Hrsg.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).
- (2) W.J. Dunn, J.H. Block und R.S. Pearlman (Hrsg.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) und Oxford (1986).
- (3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (4) C. Hansch und A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).
- (5) Leo, C. Hansch und D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews*. 71, 525.
- (6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479.

- (7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π , Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5175.
 - (8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, *Pharmacochemistry Library*, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).
 - (9) C.V. Eadsforth und P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere*. 12, 1459.
 - (10) R.A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, S. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).“
- (3) Kapitel C.3 erhält folgende Fassung:

„C.3. SÜSSWASSERALGEN UND CYANOBAKTERIEN: WACHSTUMSINHIBITIONSTEST

EINLEITUNG

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

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

3. Mit dieser Prüfung soll die Wirkung einer Chemikalie auf das Wachstum von Süßwasser-Mikroalgen und/oder Cyanobakterien bestimmt werden. Exponentiell wachsende Testorganismen werden in Batch-Kulturen über einen Zeitraum von im Allgemeinen 72 Stunden der Prüfchemikalie ausgesetzt. Trotz der verhältnismäßig kurzen Testdauer können Auswirkungen über mehrere Generationen beurteilt werden.
4. Die Systemantwort besteht in der Verringerung des Wachstums einer Reihe von Algenkulturen (Versuchseinheiten), die einer Prüfchemikalie in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt wurden. Diese Reaktion wird in Abhängigkeit von der Expositionskonzentration gegenüber dem durchschnittlichen Wachstum in der Chemikalie nicht ausgesetzten Replikatkontrollkulturen bewertet. Um die Systemantwort auf toxische Auswirkungen (optimale Empfindlichkeit) umfassend beschreiben zu können, wird ein unbegrenztes exponentielles Wachstum der Kulturen bei hinreichender Ernährung und kontinuierlicher Beleuchtung über einen ausreichenden Zeitraum ermöglicht, damit anschließend die Verringerung der spezifischen Wachstumsrate gemessen werden kann.
5. Wachstum und Wachstumshemmung werden durch zeitabhängige Messung der Biomasse der Algen bestimmt. Die Biomasse der Algen wird als Trockenmasse pro Volumen ausgedrückt (z. B. in mg Algen/Liter Testlösung). Die Trockenmasse ist jedoch schwer zu messen; daher werden Surrogatparameter verwendet. Häufigster Surrogatparameter ist die Zellzahl. Weitere Surrogatparameter sind das Zellvolumen, die Fluoreszenz, die optische Dichte usw. Der Faktor für die Umrechnung zwischen dem gemessenen Surrogatparameter und der Biomasse sollte bekannt sein.
6. Der Endpunkt des Tests ist die Wachstumshemmung, ausgedrückt als logarithmische Zunahme der Biomasse (durchschnittliche spezifische Wachstumsrate) während der Expositionsdauer. Aus den in einer Reihe von Testlösungen erfassten durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten wird die Konzentration bestimmt, bei der sich eine spezifizierte Hemmung der Wachstumsrate von x % (z. B. 50 %) ergibt; diese Konzentration wird als $E_x C_x$ bezeichnet (z. B. $E_x C_{50}$).
7. Eine weitere Reaktionsvariable bei dieser Prüfmethode ist der Zellertrag (Yield). Diese Variable kann erforderlich sein, damit länderspezifische Regulierungsanforderungen erfüllt werden. Der Zellertrag wird definiert als Biomasse am Ende der Expositionsdauer abzüglich der Biomasse zu Beginn der Expositionsdauer. Aus dem in einer Reihe von Testlösungen erfassten Zellertrag wird die Konzentration berechnet, die eine spezifizierte Hemmung des Zellertrags (z. B. um 50 %) hervorruft; diese Konzentration wird als $E_y C_x$ angegeben (z. B. $E_y C_{50}$).

8. Außerdem können die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC) und die höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete Wirkung (NOEC) statistisch bestimmt werden.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

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

VALIDITÄT DES TESTS

11. Damit ein Test als valide gewertet werden kann, müssen die folgenden Kriterien erfüllt sein:
- Die Biomasse der Kontrollkulturen muss binnen der 72-stündigen-Testdauer exponentiell um einen Faktor von mindestens 16 gewachsen sein. Dieses Wachstum entspricht einer spezifischen Wachstumsrate von $0,92 \text{ d}^{-1}$. Bei den am häufigsten verwendeten Arten ist die Wachstumsrate im Allgemeinen erheblich größer (siehe Anlage 2). Dieses Kriterium wird unter Umständen nicht erfüllt, wenn Arten verwendet werden, die langsamer wachsen als die in Anlage 2 genannten Arten. In diesem Fall sollte die Testdauer so verlängert werden, dass ein mindestens 16faches Wachstum der Kontrollkulturen gewährleistet ist; dabei muss das Wachstum während der gesamten Testdauer exponentiell erfolgen. Die Testdauer kann bis auf eine Mindestdauer von 48 Stunden verkürzt werden, um während des Tests ein unbegrenztes exponentielles Wachstum aufrechtzuerhalten; Voraussetzung ist jedoch, dass ein Mindestmultiplikationsfaktor von 16 erreicht wird.
 - Der mittlere Variationskoeffizient der sektionalen spezifischen Wachstumsraten (Tage 0-1, 1-2 und 2-3 bei 72-stündigen Tests) der Kontrollkulturen (siehe Anlage 1 unter ‚Variationskoeffizient‘) darf maximal 35 % betragen. Zur Berechnung der sektionalen spezifischen Wachstumsrate sind die Hinweise unter Nummer 49 zu beachten. Dieses Kriterium gilt für den Mittelwert des Variationskoeffizienten, der für Replikatkontrollkulturen berechnet wurde.
 - Der Variationskoeffizient der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten während der gesamten Testdauer darf bei den Replikatkontrollkulturen in Tests mit *Pseudokirchneriella subcapitata* und *Desmodesmus subspicatus* höchstens 7 % betragen. Bei weniger häufig in Tests verwendeten Arten sollte der Wert höchstens 10 % betragen.

REFERENZCHEMIKALIEN

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

ANWENDBARKEIT DES TESTS

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

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Apparatur

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

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

Testorganismen

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

Nährmedium

19. Als Nährmedien werden wahlweise das OECD-Medium oder das AAP-Medium empfohlen. Die Zusammensetzungen dieser Medien sind Anlage 3 zu entnehmen. Beide Medien haben unterschiedliche pH-Ausgangswerte und unterschiedliche Pufferkapazitäten (zur Regulierung des pH-Anstiegs). Daher können die Testergebnisse je nach verwendetem Medium unterschiedlich ausfallen; dies gilt insbesondere für die Prüfung ionisierender Chemikalien.
20. Für bestimmte Zwecke muss unter Umständen das Nährmedium modifiziert werden (z. B. für die Prüfung von Metallen und Chelatbildnern oder für Prüfungen bei unterschiedlichen pH-Werten). Die Verwendung modifizierter Nährmedien ist im Einzelnen zu erläutern und zu begründen (3)(4).

Biomasse-Ausgangskonzentration

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

Pseudokirchneriella subcapitata: $5 \times 10^3 - 10^4$ Zellen/ml

Desmodesmus subspicatus: $2-5 \times 10^3$ Zellen/ml

Navicula pelliculosa: 10^4 Zellen/ml

Anabaena flos-aquae: 10^4 Zellen/ml

Synechococcus leopoliensis: $5 \times 10^4 - 10^5$ Zellen/ml

Konzentrationen der Prüfchemikalie

22. Der Konzentrationsbereich, in dem Effekte zu erwarten sind, sollte durch einen Vortest (Range-Finding Test) ermittelt werden. Für den definitiven Test sind mindestens fünf Konzentrationen in einer geometrischen Reihe mit einem Faktor von höchstens 3,2 auszuwählen. Bei Prüfchemikalien mit einer flacheren Konzentrations-Wirkungskurve kann ein höherer Faktor gerechtfertigt sein. Die Konzentrationsreihen sollten vorzugsweise einen Bereich abdecken, in dem das Algenwachstum um 5-75 % gehemmt wird.

Replikate und Kontrollen

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

Herstellung der Impfkultur

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

Herstellung der Testlösungen

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

Inkubation

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

31. Die Oberfläche, auf der die Kulturen inkubiert werden, sollte kontinuierlich und gleichförmig fluoreszierend beleuchtet werden (z. B. mit den Lichtfarben kaltweiß („cool-white“) oder mit Tageslicht („daylight“)). Algen- und Cyanobakterienstämme stellen unterschiedliche Anforderungen an die Lichtverhältnisse. Die Lichtintensität sollte entsprechend den verwendeten Testorganismen gewählt werden. Bei den empfohlenen Grünalgenarten ist für die Testlösungen eine Lichtintensität von $60\text{-}120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zu wählen (bei Messung im photosynthetisch wirksamen Spektralbereich von $400\text{-}700 \text{ nm}$ mit einem geeigneten Rezeptor). Einige Arten, insbesondere *Anabaena flos-aquae*, wachsen bei geringeren Lichtintensitäten und können durch größere Lichtintensitäten beschädigt werden. Bei diesen Arten sollte die durchschnittliche Lichtintensität im Bereich $40\text{-}60 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ liegen. (Bei in Lux kalibrierten Lichtmessgeräten entspricht der Bereich $4\ 440\text{-}8\ 880 \text{ lx}$ für die Lichtfarbe „cool-white“ etwa der empfohlenen Lichtintensität von $60\text{-}120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Lichtintensität darf um höchstens $\pm 15 \%$ von der durchschnittlichen Lichtintensität über dem Inkubationsbereich abweichen.

Testdauer

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

Messungen und analytische Bestimmungen

33. Die Algenbiomasse in den einzelnen Kolben wird während der Testdauer mindestens einmal täglich überprüft. Wenn die Messungen an kleinen Volumina vorgenommen werden, die aus der Testlösung pipettiert wurden, sollten die betreffenden Volumina nicht ersetzt werden.
34. Die Biomasse wird durch manuelle Zählung der Zellen unter dem Mikroskop oder mit einem elektronischen Teilchenzähler (bei Zellzahlen und/oder Biovolumen) ermittelt. Alternative Verfahren wie z. B. die Messung mit einem Durchflusszytometer, in vitro und/oder in vivo durchgeführte Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen (5)(6) oder Messungen der optischen Dichte kommen in Betracht, wenn in dem für den jeweiligen Test maßgeblichen Biomassebereich eine befriedigende Korrelation mit der Biomasse nachgewiesen werden kann.
35. Der pH-Wert der Lösungen wird am Anfang und am Ende des Tests bestimmt.
36. Wenn ein Analyseverfahren zur Bestimmung der Testsubstanz im maßgeblichen Konzentrationsbereich durchführbar ist, sind die Testlösungen zu analysieren, um die Ausgangskonzentrationen und die Aufrechterhaltung der Expositionskonzentrationen während der Tests zu prüfen bzw. sicherzustellen.
37. Die Analyse der Prüfchemikalienkonzentration am Anfang und am Ende des Tests bei einer niedrigen und einer hohen Testkonzentration sowie bei einer Konzentration im zu erwartenden EC_{50} -Bereich kann hinreichend sein, wenn anzunehmen ist, dass die Expositionskonzentrationen während des Tests um weniger als 20% von den Nominalwerten abweichen. Wenn die Konzentrationen eher nicht im Bereich von $80\text{-}120 \%$ der nominellen Konzentrationen bleiben werden, wird die Analyse sämtlicher Testkonzentrationen am Anfang und am Ende der Tests empfohlen. Bei flüchtigen, instabilen oder stark adsorbierenden Prüfchemikalien werden während der Expositionsdauer weitere Probenahmen zur Durchführung von Analysen in Abständen von jeweils 24 Stunden empfohlen, um den Verlust der Prüfchemikalie besser bestimmen zu können. Bei diesen Chemikalien werden zusätzliche Replikate benötigt. In jedem Fall müssen die Prüfchemikalienkonzentrationen für alle Testkonzentrationen bei den Replikaten jeweils nur für ein Gefäß (bzw. für den Inhalt der gepoolten Gefäße der jeweiligen Replikate) bestimmt werden.
38. Eigens für die Analyse von Expositionskonzentrationen während der Testdauer hergestellte Prüfmedien werden auf die gleiche Weise behandelt wie die für die Tests verwendeten Medien, d. h. die Medien müssen mit Algen geimpft und unter identischen Bedingungen inkubiert werden. Wenn eine Analyse der gelösten Prüfchemikalie erforderlich ist, müssen die Algen unter Umständen vom Medium getrennt werden. Die Trennung sollte vorzugsweise durch Zentrifugierung mit einer so geringen Beschleunigung erfolgen, die gerade ausreicht, damit die Algen sich absetzen.
39. Wenn nachgewiesen wird, dass die Konzentration der Prüfchemikalie während der gesamten Testdauer zufriedenstellend im Bereich von $\pm 20 \%$ der Nominalkonzentration oder der gemessenen Ausgangskonzentration aufrechterhalten werden konnte, können die Ergebnisse auch ausgehend von den Nominalwerten bzw. von den gemessenen Ausgangswerten analysiert werden. Wenn die Abweichung von der Nominalkonzentration oder von der gemessenen Ausgangskonzentration mehr als $\pm 20 \%$ beträgt, sollte bei der Analyse der Ergebnisse von der geometrischen mittleren Konzentration während der Expositionsdauer oder von Modellen ausgegangen werden, welche den Rückgang der Prüfchemikalienkonzentration beschreiben (3)(7).
40. Der Test zur Hemmung des Algenwachstums ist ein dynamischeres Prüfsystem als die meisten sonstigen aquatischen Toxizitätstests mit kürzerer Testdauer. Entsprechend sind die tatsächlichen Expositionskonzentrationen unter Umständen schwer zu bestimmen; dies gilt besonders für adsorbierende Chemikalien, die bei

niedrigen Konzentrationen getestet werden. In diesen Fällen bedeutet das Verschwinden der Prüfchemikalie aus der Lösung infolge der Adsorption an die zunehmende Algenbiomasse nicht, dass das Prüfsystem die Chemikalie ‚verliert‘. Bei der Analyse des Testergebnisses ist zu prüfen, ob ein Rückgang der Prüfchemikalienkonzentration im Laufe des Tests mit einer Abnahme der Wachstumshemmung einhergeht. Wenn dies der Fall ist, kann der Einsatz eines geeigneten Modells zur Beschreibung des Rückgangs der Prüfchemikalienkonzentration (7) in Betracht gezogen werden. Ansonsten empfiehlt es sich unter Umständen, bei der Analyse der Ergebnisse von den Ausgangskonzentrationen (Nominalkonzentrationen oder gemessenen Konzentrationen) auszugehen.

Sonstige Beobachtungen

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

Limit-Test

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

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Grafische Darstellung der Wachstumskurven

43. Die Biomasse in den Prüfgefäßen kann in Einheiten des für die Messung verwendeten Surrogatparameters ausgedrückt werden (z. B. als Zellzahl oder Fluoreszenz).
44. Die geschätzte Biomassekonzentration der Prüfkulturen und der Kontrollkulturen ist zusammen mit den mindestens zu jeder vollen Stunde zu erfassenden Konzentrationen der Prüfchemikalie und den Messzeitpunkten in Tabellen zusammenzustellen und für die Erstellung von Wachstumskurven zu verwenden. In diesem ersten Stadium können sowohl logarithmische Skalen als auch lineare Skalen angebracht sein; während der Testdauer sind jedoch logarithmische Skalen zu verwenden, die im Allgemeinen eine bessere Darstellung von Abweichungen der Wachstumsstrukturen ermöglichen. Exponentielles Wachstum ergibt auf einer logarithmischen Skala aufgetragen eine Gerade, und die Steigung der Geraden gibt die Wachstumsrate an.
45. Mithilfe der Kurven ist zu untersuchen, ob die Kontrollkulturen während der gesamten Testdauer mit der erwarteten Geschwindigkeit exponentiell wachsen. Alle Datenpunkte sowie der Verlauf der Kurven sind kritisch zu prüfen, und Ausgangsdaten und Verfahren sind auf mögliche Fehler zu kontrollieren. Insbesondere sind alle Datenpunkte zu prüfen, die aufgrund eines systematischen Fehlers abzuweichen scheinen. Wenn Verfahrensfehler zweifelsfrei festgestellt und/oder als sehr wahrscheinlich betrachtet werden können, wird der betreffende Datenpunkt als Ausreißer gekennzeichnet und nicht in die anschließende statistische Analyse einbezogen. (Eine Algenkonzentration von null in einem von zwei drei Replikatgefäßen kann darauf hindeuten, dass das Gefäß nicht ordnungsgemäß geimpft oder nicht angemessen gereinigt wurde.) Die Gründe für den Ausschluss eines als Ausreißer eingestuftes Datenpunkts sind im Prüfbericht genau anzugeben. Als Begründungen werden ausschließlich (seltene) Verfahrensfehler, nicht aber einfach ungenaue Messungen anerkannt. Statistische Verfahren zur Bestimmung von Ausreißern sind bei dieser Art von Problemen von begrenztem Nutzen und können die Beurteilung durch Fachleute nicht ersetzen. Die Ausreißer sollten (als solche gekennzeichnet) vorzugsweise in den später in grafischen oder tabellarischen Darstellungen von Datenpunkten enthalten sein.

Reaktionsvariablen

46. Mit der Prüfung sollen die Auswirkungen der Prüfchemikalie auf das Algenwachstum bestimmt werden. Da in unterschiedlichen Rechtsordnungen unterschiedliche Präferenzen und rechtliche Anforderungen bestehen, werden in dieser Prüfmethode zwei Reaktionsvariablen beschrieben. Damit die Testergebnisse in allen Rechtsordnungen anerkannt werden können, sollten die Auswirkungen mit Hilfe der beiden im Folgenden beschriebenen Reaktionsvariablen a und b beurteilt werden:
 - a) Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate: Diese Reaktionsvariable wird ausgehend von der täglichen logarithmischen Zunahme der Biomasse während der Testdauer berechnet.
 - b) Zellertrag: Diese Reaktionsvariable ergibt sich aus der Biomasse am Ende des Tests abzüglich der Biomasse zu Beginn des Tests.

47. Es wird darauf hingewiesen, dass die mit diesen beiden Reaktionsvariablen berechneten Toxizitätswerte nicht vergleichbar sind; der entsprechende Unterschied muss bei der Verwendung der Testergebnisse berücksichtigt werden. Die aufgrund der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate ($E_r C_x$) berechneten Werte für EC_x werden im Allgemeinen höher sein als die anhand des Zellertrags ($E_y C_x$) ermittelten Werte, wenn die für diese Testmethode vorgesehenen Bedingungen eingehalten werden; dies ist auf die unterschiedliche mathematische Grundlage der beiden Verfahren zurückzuführen. Die auftretenden Unterschiede sollten jedoch nicht als Anzeichen für eine unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Reaktionsvariablen betrachtet werden; beide Werte sind einfach mathematisch verschieden. Das Konzept der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate beruht auf dem im Allgemeinen exponentiellen Verlauf des Algenwachstums bei nicht begrenzten Kulturen, bei denen die Toxizität aufgrund der Auswirkungen auf die Wachstumsrate ermittelt wird, ohne jedoch von der absoluten Höhe der jeweiligen Wachstumsrate der Kontrollprobe, von der Steigung der Konzentrations-Wirkungskurve oder von der Testdauer abhängig zu sein. Auf der Reaktionsvariable ‚Zellertrag‘ beruhende Ergebnisse hingegen hängen von allen übrigen genannten Variablen ab. $E_y C_x$ ist von der spezifischen Wachstumsrate der in den einzelnen Tests verwendeten Algenarten sowie von der maximalen spezifischen Wachstumsrate abhängig, die je nach Art sowie sogar zwischen den einzelnen Algenstämmen unterschiedlich sein kann. Diese Reaktionsvariable sollte nicht verwendet werden, um die Empfindlichkeit von Algenarten oder auch nur verschiedener Algenstämmen gegenüber Giftstoffen zu vergleichen. Die Verwendung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate zur Ermittlung der Toxizität wird in der Wissenschaft bevorzugt; bei dieser Prüfmethode werden jedoch auch Toxizitätsschätzungen aufgrund des Zellertrags berücksichtigt, um den derzeitigen Regulierungsanforderungen in einigen Ländern Rechnung zu tragen.

Durchschnittliche Wachstumsrate

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

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

Dabei sind:

μ_{i-j} : durchschnittliche spezifische Wachstumsrate zwischen Zeitpunkt i und Zeitpunkt j ;

X_i : Biomasse zum Zeitpunkt i

X_j : Biomasse zum Zeitpunkt j

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

49. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate wird über die gesamte Testdauer (im Allgemeinen Tage 0-3) berechnet; dabei ist eher von der geimpften Nominalbiomasse als von einem gemessenen Ausgangswert auszugehen, da auf diese Weise gewöhnlich eine höhere Genauigkeit erzielt wird. Wenn die zur Messung der Biomasse verwendete Ausrüstung eine hinreichend genaue Bestimmung der Biomasse mit der geringen Masse des Inokulums zulässt (z. B. ein Durchflusszytometer), kann die gemessene Konzentration der Ausgangsbiomasse angenommen werden. Außerdem ist während der gesamten Testdauer (Tage 0-1, 1-2 und 2-3) die sektionale Wachstumsrate als tägliche spezifische Wachstumsrate zu ermitteln und zu prüfen, ob das Wachstum der Kontrollgruppe konstant bleibt (siehe Gültigkeitskriterien, Nummer 11). Eine spezifische Wachstumsrate, die an einem bestimmten Tag signifikant niedriger ist als die durchschnittliche spezifische Gesamtwachstumsrate, kann Anzeichen für eine ‚Lag‘-Phase sein. Bei den Kontrollkulturen kann eine ‚Lag‘-Phase minimiert und praktisch ausgeschlossen werden, wenn die Vorkultur in geeigneter Weise vermehrt wird; bei den behandelten Kulturen hingegen kann eine ‚Lag‘-Phase Anzeichen für eine Erholung nach anfänglicher toxischer Belastung oder Anzeichen für eine geringere Belastung infolge eines Verlustes der Prüfchemikalie (u. a. durch Sorption in die Algenbiomasse) nach der anfänglichen Behandlung sein. Entsprechend kann die sektionale Wachstumsrate bewertet werden, um die Auswirkungen der Prüfchemikalie während der Expositionsdauer zu beurteilen. Erhebliche Unterschiede zwischen der sektionalen Wachstumsrate und der durchschnittlichen Wachstumsrate deuten auf Abweichungen vom konstanten exponentiellen Wachstum hin und erfordern eine genaue Überprüfung der Wachstumskurve.
50. Die prozentuale Hemmung der Wachstumsrate jedes Behandlungsreplikats ist mit folgender Formel zu berechnen:

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

Dabei sind:

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

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

Zellertrag

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

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

Dabei sind:

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

Grafische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurve

53. Die prozentuale Hemmung ist bezogen auf den Logarithmus der Prüfchemikalienkonzentration grafisch darzustellen und sorgfältig zu überprüfen; dabei sind alle Datenpunkte zu verwerfen, die in der ersten Phase als Ausreißer identifiziert wurden. Die Datenpunkte sind nach visueller oder rechnergestützter Interpolation zu einer gleichmäßigen Kurve zu verbinden, um einen ersten Eindruck von der Beziehung zwischen den verschiedenen Konzentrationen und Wirkungen zu erhalten. Anschließend ist mit einer differenzierteren Methode (vorzugsweise mit einer rechnergestützten statistischen Methode) fortzufahren. Je nach der beabsichtigten Verwendung der Daten, der Qualität (Genauigkeit) und dem Umfang der Daten sowie nach der Verfügbarkeit von Werkzeugen zur Analyse der Daten kann (gelegentlich durchaus berechtigt) entschieden werden, die Datenanalyse in diesem Stadium zu beenden und einfach die wesentlichen Werte für EC_{50} und EC_{10} (und/oder EC_{20}) aus der nach visueller Interpolation erstellten Kurve zu entnehmen (siehe auch folgender Abschnitt zu stimulierenden Auswirkungen). Die folgenden Gründe können dafür sprechen, von der Anwendung einer statistischen Methode abzusehen:

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

Statistische Verfahren

54. Ziel ist die Ermittlung einer quantitativen Konzentrations-Wirkungsbeziehung durch Regressionsanalyse. Im Anschluss an eine linearisierte Transformation der Reaktionsdaten (z. B. in Einheiten nach dem Probit-, Logit- oder Weibull-Modell) (8) kann eine gewichtete lineare Regression vorgenommen werden; nicht-lineare Regressionsverfahren, mit denen die unvermeidlichen Unregelmäßigkeiten der Daten und Abweichungen von gleichförmigen Verteilungen besser verarbeitet werden können, werden jedoch bevorzugt. Gegen null bzw. gegen die vollständige Hemmung können diese Unregelmäßigkeiten durch die Transformation vergrößert werden und die Analyse beeinträchtigen (8). Es wird darauf hingewiesen, dass Standard-Analysemethoden mit Probit-, Logit- oder Weibull-Transformationen für quantale Daten (z. B. Mortalität oder Überlebensraten) vorgesehen sind und zur Anwendung in Verbindung mit Wachstums- oder Biomassendaten modifiziert werden müssen. Spezifische Verfahren zur Bestimmung von EC_x -Werten aus kontinuierlichen Daten sind den Quellen (9), (10) und (11) zu entnehmen. In Anlage 5 wird der Einsatz nicht-linearer Regressionsanalysen näher erläutert.

55. Für jede zu analysierende Reaktionsvariable sind aufgrund der Konzentrations-Wirkungsbeziehung EC_x -Werte zu ermitteln. Nach Möglichkeit sollten für alle EC_x -Werte die 95- %-Konfidenzintervalle bestimmt werden. Die Qualität der Übereinstimmung der Reaktionsdaten mit dem Regressionsmodell wird grafisch oder statistisch bewertet. Die Regressionsanalyse muss mit den Reaktionen der einzelnen Replikate (und nicht mit den Mittelwerten der Behandlungsgruppe) durchgeführt werden. Wenn eine nicht-lineare Kurvenanpassung jedoch schwierig oder wegen zu großer Streuung der Daten nicht möglich ist, kann die Regression auch bezogen auf die Mittelwerte der Gruppe vorgenommen werden, um so auf einfache Weise die Auswirkungen erwarteter Ausreißer zu reduzieren. Wenn von dieser Möglichkeit Gebrauch gemacht wird, sollte dies im Prüfbericht als Abweichung vom normalen Verfahren vermerkt und darauf hingewiesen werden, dass mit Kurvenanpassungen der einzelnen Replikate kein befriedigendes Ergebnis erzielt wurde.
56. Schätzwerte für EC_{50} und für die Konfidenzintervalle können auch durch lineare Interpolation mit einem Bootstrapping-Algorithmus (13) erzielt werden, wenn die verfügbaren Regressionsmodelle/-methoden für die betreffenden Daten nicht geeignet sind.
57. Um die LOEC und entsprechend die NOEC zu schätzen sowie um die Auswirkungen der Prüfchemikalie auf die Wachstumsrate zu ermitteln, müssen die Mittelwerte der behandelten Proben mit Verfahren zur Varianzanalyse (ANOVA) verglichen werden. Der Mittelwert der einzelnen Konzentrationen ist dann mit einer geeigneten Methode zur Durchführung von Mehrfachvergleichen bzw. zur Durchführung von Trendtests mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe zu vergleichen. Dunnett- und Williams-Tests können hilfreich sein (12)(14)(15)(16)(17). Die ANOVA-Annahme der Varianzhomogenität muss einer Überprüfung unterzogen werden. Die entsprechende Bewertung kann anhand einer grafischen Darstellung oder aufgrund eines formalen Tests vorgenommen werden (17). Geeignet sind Levene- und Bartlett-Tests. Wenn die Annahme der Varianzhomogenität nicht erfüllt ist, kann gelegentlich eine Korrektur durch logarithmische Datentransformation erfolgen. Bei außerordentlicher Varianzheterogenität, die durch Transformation nicht korrigiert werden kann, sollten Analysemethoden wie z. B. Jonckheere-Trendtests (Step-down) erwogen werden. Weitere Hinweise zur Bestimmung von NOEC-Werten sind Quelle (11) zu entnehmen.
58. Aufgrund neuer Forschungsergebnisse wird empfohlen, das Konzept der NOEC aufzugeben und durch Punktschätzungen von EC_x -Werten zu ersetzen, die durch Regression ermittelt wurden. Für diesen Algentest wurde noch kein geeigneter Wert für x definiert. Ein Bereich von 10 bis 20 % scheint geeignet (je nach ausgewählter Reaktionsvariable); vorzugsweise sollten sowohl EC_{10} als auch EC_{20} protokolliert werden.

Wachstumsstimulation

59. Gelegentlich wird bei niedrigen Konzentrationen eine Wachstumsstimulation (negative Hemmung) beobachtet. Diese Wachstumsstimulation kann entweder auf eine Hormesis (toxische Stimulation) oder darauf zurückzuführen sein, dass im verwendeten Minimalmedium mit dem zu prüfenden Material zusätzliche das Wachstum stimulierende Faktoren zum Tragen kommen. Die Zugabe anorganischer Nährstoffe sollte keine unmittelbaren Auswirkungen haben, weil das Prüfmedium während der gesamten Testdauer ohnehin überschüssige Nährstoffe enthalten sollte. Eine Stimulation mit niedriger Dosierung kann bei Berechnungen von EC_{50} gewöhnlich übergangen werden, wenn die Stimulation nicht ungewöhnlich stark ist. Bei ungewöhnlich starker Stimulation oder wenn ein EC_x -Wert für einen niedrigen x -Wert berechnet werden soll, sind möglicherweise jedoch besondere Verfahrensweisen erforderlich. Die Löschung von Stimulationsreaktionen aus der Datenanalyse sollte nach Möglichkeit vermieden werden, und wenn die verfügbare Software zur Kurvenanpassung nicht in der Lage ist, geringere Stimulationen zu verarbeiten, kann eine lineare Interpolation mit einem Bootstrapping-Algorithmus vorgenommen werden. Bei ungewöhnlich starker Stimulation kann der Einsatz eines Hormesis-Modells erwogen werden (18).

Nicht toxische Wachstumshemmung

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

PRÜFBERICHT

61. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfchemikalie:

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

Im Test verwendete Art:

- Stamm, Lieferant oder Herkunft und Kulturbedingungen.

Prüfbedingungen:

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

Ergebnisse:

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

LITERATUR

- (1) ISO (1993). ISO 8692 Wasserbeschaffenheit — Süßwasseralgen-Wachstumshemmtest mit einzelligen Grünalgen.
- (2) ISO (1998). ISO/DIS 14442. Wasserbeschaffenheit — Anleitung für Algenwachstumshemmtests in Gegenwart schwer löslicher Materialien, flüchtigen Verbindungen, Metallen und Abwasser.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (4) ISO (1998). ISO 5667-16 Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren.

- (5) Mayer, P., Cuhel, R., und Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.
 - (6) Slovencey, R.E., und Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22: 919-925
 - (7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L., und Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2073-2079.
 - (8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19: 713-718.
 - (9) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O., und Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 157-167.
 - (10) Bruce, R.D., und Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11: 1485-1494.
 - (11) OECD (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
 - (12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096-1121
 - (13) Norberg-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.
 - (14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
 - (15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
 - (16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 519-531.
 - (17) Draper, N.R., und Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.
 - (18) Brain, P., und Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.
-

Anlage 1

Begriffsbestimmungen

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

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

Chemikalie: ein Stoff oder eine Mischung.

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

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

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

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

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

Niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC): niedrigste geprüfte Konzentration, bei der beobachtet wurde, dass die Chemikalie binnen einer bestimmten Expositionsdauer gegenüber der Kontrollprobe eine statistisch signifikante Wachstumsreduzierung bewirkt (bei $p < 0,05$). Sämtliche Testkonzentrationen über der LOEC müssen schädliche Folgen haben, die mindestens den bei der LOEC beobachteten schädlichen Folgen gleichwertig sind. Wenn diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden können, ist umfassend darzulegen, warum die LOEC (und entsprechend die NOEC) gewählt wurde.

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

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

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

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

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

Anlage 2

Stämme, die sich für den Test als geeignet erwiesen haben**Grünalgen**

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

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

Kieselalgen

Navicula pelliculosa, UTEX 664

Cyanobakterien

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

Synechococcus leopoliensis, UTEX 625, CCAP 1405/1

Herkunft der Stämme

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

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

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

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

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

Aussehen und Merkmale der empfohlenen Arten

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

⁽¹⁾ Gemessen mit einem elektronischen Teilchenzähler.

⁽²⁾ Aus der Größe berechnet.

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

Spezifische Empfehlungen zur Kultivierung und zur Handhabung der für den Test empfohlenen Arten***Pseudokirchneriella subcapitata* und *Desmodesmus subspicatus***

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

Anabaena flos-aquae

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

Anabaena flos-aquae bildet Ansammlungen verschachtelter Zellketten. Die Größe dieser Ansammlungen kann je nach Kulturbedingungen unterschiedlich sein. Unter Umständen müssen diese Ansammlungen getrennt werden, wenn die Biomasse unter dem Mikroskop bzw. mit einem elektronischen Teilchenzähler bestimmt werden soll.

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

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

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

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

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

Synechococcus leopoliensis

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

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

Navicula pelliculosa

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

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

Anlage 3

Nährmedien

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Elementzusammensetzung der Prüfmedien

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

Herstellung des OECD-Mediums

Nährstoff	Konzentration in der Stammlösung
Stammlösung 1: Makronährstoffe	
NH_4Cl	1,5 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l
KH_2PO_4	0,16 g/l
Stammlösung 2: Eisen	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l

Nährstoff	Konzentration in der Stammlösung
Stammlösung 3: Spurenelemente	
H ₃ BO ₃	185 mg/l
MnCl ₂ · 4H ₂ O	415 mg/l
ZnCl ₂	3 mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,5 mg/l
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,01 mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7 mg/l
Stammlösung 4: Bicarbonat	
NaHCO ₃	50 g/l
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	

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

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

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

Zu 500 ml sterilisiertem Wasser werden folgende Mengen hinzugegeben:

10 ml Stammlösung 1

1 ml Stammlösung 2

1 ml Stammlösung 3

1 ml Stammlösung 4

Anschließend wird mit sterilisiertem Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt.

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

Herstellung des AAP-Mediums

1. Von den Stammlösungen 2.1 bis 2.7 ist jeweils 1 ml zu etwa 900 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser hinzuzugeben; anschließend wird auf 1 Liter aufgefüllt.
2. Stammlösungen mit Makronährstoffen werden hergestellt, indem die folgenden Stoffmengen jeweils zu 500 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser hinzugegeben werden. Die Reagenzien 2.1, 2.2, 2.3 und 2.4 können zu einer einzigen Stammlösung kombiniert werden.

2.1 NaNO₃ 12,750 g

2.2 MgCl₂·6H₂O 6,082 g

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

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

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

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

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

4. Der pH-Wert ist auf $7,5 \pm 0,1$ einzustellen (mit 0,1 N oder 1,0 N NaOH oder HCl).
 5. Wenn ein Teilchenzähler verwendet werden soll, wird das Medium durch einen 0,22-µm-Membranfilter in ein steriles Gefäß gefiltert; ansonsten erfolgt die Filtration in ein steriles Gefäß durch ein 0,45-µm-Filter.
 6. Das Medium ist bis zur Verwendung bei einer Temperatur von etwa 4 °C dunkel zu lagern.
-

*Anlage 4***Beispiel eines Verfahrens zur Kultivierung der Algen****Allgemeine Bemerkungen**

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

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

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

Ausrüstung und Materialien

Siehe Prüfmethode: Apparatur.

Verfahren zur Herstellung von Algenkulturen*Herstellung von Nährlösungen (Medien)*

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

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

Stammkultur

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

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

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

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

Vorkultur

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

Anlage 5

Datenanalyse durch nicht-lineare Regression**Allgemeine Bemerkungen**

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

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

Regressionsanalyse*Modelle*

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

Der Einsatz kontinuierlicher Schwellenwert-Funktionsmodelle (z. B. des Kooijman-Modells der ‚Hemmung des Populationswachstums‘ — Kooijman u. a. 1996) wurde kürzlich als Alternative zu asymptotischen Modellen vorgeschlagen. Dieses Modell geht davon aus, dass bei Konzentrationen unter einem bestimmten Schwellenwert EC_0 keine Auswirkungen mehr gegeben sind; dieser Schwellenwert wird mit Hilfe einer einfachen kontinuierlichen Funktion mit undifferenziertem Ausgangspunkt durch Extrapolation der Konzentrations-Wirkungsbeziehung so geschätzt, dass die Konzentrationsachse geschnitten wird.

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

Verfahren

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

Die angepasste Kurve und die gemessenen Daten werden grafisch dargestellt; anschließend ist zu prüfen, ob die Kurve in angemessener Weise angepasst wurde. Eine Analyse der Restwerte könnte für diesen Zweck besonders hilfreich sein. Wenn die gewählte Funktionsbeziehung zur Anpassung der Konzentrations-Wirkungskurve die Kurve nicht vollständig beschreibt oder einen wesentlichen Teil der Kurve wie z. B. die Reaktion bei niedrigen Konzentrationen nicht gut beschreibt, ist eine andere Kurvenanpassung zu wählen (z. B. eine nicht symmetrische Kurve wie etwa die Weibull-Funktion anstelle einer symmetrischen Kurve). Negative Hemmungen können z. B. in

Verbindung mit der logarithmischen Normalverteilung problematisch sein und ebenfalls den Einsatz einer alternativen Regressionsfunktion erfordern. Es wird nicht empfohlen, diesen negativen Werten einen Wert von null oder einen kleinen positiven Wert zuzuweisen, weil ansonsten die Fehlerverteilung beeinträchtigt werden könnte. Angemessen sind unter Umständen getrennte Kurvenanpassungen für bestimmte Bereiche der Kurve (z. B. für den Bereich mit der niedrigen Hemmung, wenn $EC_{low\ x}$ -Werte geschätzt werden sollen). Aus der angepassten Formel sind (mit der Umkehrfunktion $C = f^{-1}(Y)$) charakteristische Schätzwerte für EC_x zu ermitteln und mindestens für EC_{50} sowie für einen oder zwei Werte von $EC_{low\ x}$ zu protokollieren. Praktische Erfahrungen haben gezeigt, dass die Genauigkeit der Algentests im Allgemeinen eine angemessene exakte Schätzung der Konzentration bei einer Hemmung von etwa 10 % ermöglicht, wenn hinreichende Datenpunkte verfügbar sind (sofern nicht eine Unregelmäßigkeit in Form einer Stimulation auch bei niedrigen Konzentrationen gegeben ist). Die Genauigkeit einer EC_{20} -Schätzung ist häufig beträchtlich größer als die Genauigkeit geschätzter EC_{10} -Werte, weil die EC_{20} -Werte gewöhnlich im annähernd linearen Bereich der zentralen Konzentrations-Wirkungskurve vorgenommen werden. Gelegentlich ist die Beurteilung von EC_{10} -Werten wegen der Wachstumsstimulation problematisch. Werte für EC_{10} sind also im Allgemeinen mit hinreichender Genauigkeit zu erhalten; in jedem Fall empfiehlt sich jedoch, auch die EC_{20} -Werte zu erfassen.

Gewichtungsfaktoren

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

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

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

Normalisierung der Reaktionen

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

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

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

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

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

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

für die Gesamtvarianz der relativen Reaktion Y_i gilt somit:

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

Der Fehler im Mittelwert der Kontrollen ist umgekehrt proportional zur Quadratwurzel der Anzahl der in den Durchschnitt einbezogenen Kontrollreplikate; gelegentlich ist die Einbeziehung historischer Daten gerechtfertigt, um den Fehler auf diese Weise erheblich zu reduzieren. Ein alternatives Verfahren besteht darin, die Daten nicht zu normalisieren und die absoluten Reaktionen einschließlich der Daten der Kontrollreaktionen nicht anzupassen, sondern den Kontroll-Reaktionswert als zusätzlichen Parameter einzuführen, der durch nicht-lineare Regression anzupassen ist. In Verbindung mit einer normalen Regressionsgleichung mit zwei Parametern erfordert diese Methode die Anpassung von drei Parametern; daher sind mehr Datenpunkte erforderlich als bei der nicht-linearen Regression von Daten, die mit einer vordefinierten Kontrollreaktion normalisiert werden.

Umkehrung der Konfidenzintervalle

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

Für eine direktere Berechnung (Andersen u. a. 1998) kann die ursprüngliche Formel verwendet und eine Taylor-Expansion um die Mittelwerte für r_1 und r_0 angenommen werden.

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

LITERATUR

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

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

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

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

(4) Kapitel C.11 erhält folgende Fassung:

„C.11. BELEBTSCHLAMM, PRÜFUNG DER ATMUNGHEMMUNG (KOHLENSTOFF- UND AMMONIUMOXIDATION)“

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 209 (2010). Sie beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Auswirkungen einer Chemikalie auf Mikroorganismen (im Wesentlichen Bakterien) in Belebtschlamm durch Messung der Respirationsrate (Kohlenstoff- und/oder Ammoniumoxidation) unter definierten Bedingungen und bei unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfchemikalie. Die Prüfmethode beruht auf dem ETAD-Test (ETAD = *Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing industry*) (1)(2), auf der vorherigen OECD-Prüfrichtlinie 209 (3) und auf der geänderten ISO-Norm 8192 (4). Zweck dieser Methode ist die Schaffung eines schnellen Screening-Verfahrens, mit dem sich die Auswirkungen von Chemikalien auf die im Belebtschlamm der biologischen (aeroben) Stufe von Kläranlagen enthaltenen Mikroorganismen feststellen lassen. Die Testergebnisse können auch als Indikator für geeignete nicht inhibierende Konzentrationen von Prüfchemikalien dienen, welche in Tests zur biologischen Abbaubarkeit (siehe z. B. Kapitel C.4 A-F, C.9, C.10, C.12 und C.29 sowie OECD TG 302C) verwendet werden. In diesem Fall kann der Test als Screening-Test etwa wie ein Vorversuch oder ein Limit-Test (siehe Nummer 39) durchgeführt werden, bei dem nur die Gesamtrespiration berücksichtigt wird. Bei Prüfungen auf leichte biologische Abbaubarkeit (Kapitel C.4 A-F und Kapitel C.29), bei denen die Konzentration des Inokulums erheblich geringer ist als bei der vorliegenden Prüfmethode, sind diese Informationen allerdings mit Vorsicht zu bewerten. Wenn in diesem Respirationstest keine Hemmung festgestellt wird, bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass auch bei der Prüfung auf leichte biologische Abbaubarkeit gemäß den Kapiteln C.4 A-F oder C.29 keine Hemmung gegeben wäre.

2. Insgesamt wird die Prüfung der Atmungshemmung seit ihrer erstmaligen Veröffentlichung offenbar erfolgreich durchgeführt; gelegentlich wurde allerdings auch von falschen Ergebnissen berichtet (siehe z. B. (2)(4)(5)). Kurven, die die Respiration in Abhängigkeit von der Konzentration aufzeigen, verlaufen manchmal biphasisch, Darstellungen der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden verzerrt, und EC_{50} -Werte waren außergewöhnlich niedrig (5). In Untersuchungen wurde festgestellt, dass diese Ergebnisse dann ermittelt wurden, wenn der in der Prüfung verwendete Belebtschlamm stark nitrifiziert und wenn die Prüfchemikalie sich stärker auf die Ammoniumoxidation auswirkt als auf die allgemeine heterotrophe Oxidation. Bei diesen falschen Ergebnissen können zusätzliche Prüfungen mit einem spezifischen Nitrifikationshemmer durchgeführt werden. Durch die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate mit und ohne diese Hemmstoffe (z. B. N-Allylthioharnstoff (ATU)) können die gesamte und die heterotrophe Sauerstoffverbrauchsrate und die Sauerstoffverbrauchsrate durch Nitrifikation berechnet werden (4)(7)(8). Bei beiden Prozessen kann also die Hemmung durch eine Prüfchemikalie ermittelt werden, und die EC_{50} -Werte können sowohl für die Oxidation von organischem Kohlenstoff (heterotroph) als auch für die Ammoniumoxidation (Nitrifikation) wie gewohnt berechnet werden. In seltenen Fällen kann die hemmende Wirkung von N-Allylthioharnstoff durch die Komplexbildung mit Prüfchemikalien oder Mediumzusätzen, z. B. Cu^{++} -Ionen (6), teilweise oder vollständig aufgehoben werden. Cu^{+} -Ionen sind für *Nitrosomonas* von entscheidender Bedeutung; in höheren Konzentrationen sind sie allerdings giftig.
3. Die Nitrifikation bei der aeroben Behandlung von Abwässern als unumgänglicher Schritt bei der Abtrennung von Stickstoffverbindungen aus Abwässern durch Denitrifikation in gasförmige Produkte hat in europäischen Ländern besondere Bedeutung erlangt. Inzwischen hat die EU niedrigere Grenzwerte für die Stickstoffkonzentration in behandelten Abwässern festgesetzt, die in aufnehmende Gewässer eingeleitet werden (1).
4. Für die meisten Zwecke reicht es aus, nur die Auswirkungen auf die Mechanismen der Oxidation organischen Kohlenstoffs zu bewerten. Manchmal müssen jedoch die Auswirkungen auf die Nitrifikation allein oder auf die Nitrifikation und die Oxidation organischen Kohlenstoffs getrennt geprüft werden, um die Ergebnisse angemessen interpretieren und die Auswirkungen richtig verstehen zu können.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

5. Die Respirationsraten von mit synthetischem Abwasser beschickten Belebtschlammproben werden nach einer Kontaktzeit von drei Stunden in einer geschlossenen Zelle mit einer Sauerstoffelektrode gemessen. Wenn ein realistisches Expositionsszenarium zugrunde gelegt wird, können auch längere Kontaktzeiten angemessen sein. Wenn die Prüfchemikalie rasch abgebaut wird (z. B. abiotisch durch Hydrolyse) oder flüchtig ist und sich keine angemessene Konzentration aufrechterhalten lässt, kann zusätzlich eine kürzere Expositionsdauer (beispielsweise 30 Minuten) gewählt werden. Die Empfindlichkeit der einzelnen Belebtschlammproben ist am Tag der Exposition anhand einer geeigneten Referenzchemikalie zu prüfen. Mit der Prüfung wird gewöhnlich der EC_x -Wert (z. B. EC_{50}) der Prüfchemikalie und/oder die höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete Wirkung (NOEC) ermittelt.
6. Die Hemmung der Sauerstoffaufnahme durch Mikroorganismen, die organischen Kohlenstoff oxidieren, kann getrennt von derjenigen durch Ammonium oxidierende Mikroorganismen bestimmt werden; dazu ist die Sauerstoffverbrauchsrate mit und ohne N-Allylthioharnstoff zu messen; N-Allylthioharnstoff ist ein spezifischer Hemmstoff, der der Oxidation von Ammonium zu Nitrit durch Nitritbakterien (Stufe 1) entgegenwirkt. In diesem Fall wird die prozentuale Hemmung der Sauerstoffverbrauchsrate durch einen Vergleich der Sauerstoffverbrauchsrate in Gegenwart der Prüfchemikalie mit der mittleren Sauerstoffverbrauchsrate der entsprechenden Kontrollen ohne Prüfchemikalie berechnet, beides jeweils mit und ohne den spezifischen Inhibitor N-Allylthioharnstoff.
7. Ein etwaiger Sauerstoffverbrauch aufgrund abiotischer Prozesse kann nachgewiesen werden, indem die jeweilige Verbrauchsrate in Mischungen aus Prüfchemikalie, synthetischem Abwassermedium und Wasser, aber ohne Belebtschlamm, ermittelt wird.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

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

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

ANWENDBARKEIT DER PRÜFMETHODE

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

REFERENZCHEMIKALIEN

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

VALIDITÄTSKRITERIEN UND REPRODUZIERBARKEIT

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

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Prüfgefäße und Apparatur

13. Für die Prüfung sind gewöhnliche Laborausstattung sowie folgende Materialien zu verwenden:
 - a) Prüfgefäße — z. B. 1 000-ml-Bechergläser für jeweils 500 ml Reaktionsgemisch (siehe Nummer 5 in Abb. 1);
 - b) Zellen und Zubehör zur Messung der Konzentration des gelösten Sauerstoffs, eine geeignete Sauerstoffelektrode, eine geschlossene Zelle zur Aufnahme der Probe ohne Kopfraum (*headspace*) und ein Aufzeichnungsgerät (z. B. Nummern 7, 8, 9 in Abb. 1, Anlage 2). Alternativ kann eine BSB-Flasche mit geeigneter Übergangsstülle zur Abdichtung der Sauerstoffelektrode zum Flaschenhals verwendet werden (siehe Abb. 2 in Anlage 3). Um zu vermeiden, dass beim Einsetzen der Sauerstoffelektrode Flüssigkeit austritt, sollte zunächst ein Trichter oder ein Glasröhrchen durch die Tülle geschoben werden; statt dessen können auch Gefäße mit gebördeltem Rand verwendet werden. In beiden Fällen sind ein Magnetrührer oder ein alternatives Rührverfahren zu verwenden (z. B. eine selbstrührende Sonde);
 - c) Magnetrührer und Rührfisch mit einem Überzug aus inertem Material zur Verwendung in der Messkammer und/oder in den Prüfgefäßen;
 - d) Belüftungseinrichtung: Erforderlichenfalls muss Druckluft durch einen geeigneten Filter geleitet werden, um Staub und Öl abzutrennen und durch Waschflaschen mit Wasser zur Luftbefeuchtung. Die Gefäße sind mit Pasteur-Pipetten oder sonstigen Belüftungseinrichtungen zu belüften, die keine Chemikalien adsorbieren. Mit einer Schüttelmaschine mit Rundschüttelbewegung mit einer Drehzahl zwischen 150 und 250 min^{-1} und mit Flaschen mit einem Volumen von z. B. 2 000 ml kann der Sauerstoffbedarf des Schlamms gedeckt werden; außerdem können mit dieser Schüttelmaschine Probleme bei Chemikalien überwunden werden, die übermäßig schäumen, die flüchtig sind und daher verlorengehen können oder schwierig zu dispergieren sind, wenn die Belüftung durch Drucklufteinpeisung (*Air Sparging*) erfolgt. Das Prüfsystem umfasst gewöhnlich eine Reihe kontinuierlich belüfteter und nacheinander (z. B. in Intervallen von 10 bis 15 Minuten) angesetzter Bechergläser, die dann der Reihe nach analysiert werden. Wahlweise können auch validierte Geräte verwendet werden, die für eine gleichzeitige Belüftung und Messung der Sauerstoffverbrauchsrate der Mischungen ausgelegt sind;

- e) pH-Messgerät;
- f) Zentrifuge, normale Tischzentrifuge zur Zentrifugierung von Schlämmen mit 10 000 m/s².

Reagenzien

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

Wasser

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

Versorgung mit synthetischem Abwasser

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

— Pepton	16 g
— Fleischextrakt (oder ein vergleichbarer Pflanzenextrakt)	11 g
— Harnstoff	3 g
— Natriumchlorid (NaCl)	0,7 g
— Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ , 2H ₂ O)	0,4 g
— Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	0,2 g
— wasserfreies Kaliummonohydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	2,8 g
— destilliertes oder entionisiertes Wasser q.s.p. 1 Liter	

17. Der pH-Wert dieser Lösung muss bei $7,5 \pm 0,5$ liegen. Wenn das hergestellte Medium nicht sofort verwendet wird, kann es bei 0 bis 4 °C im Dunkeln höchstens eine Woche gelagert werden; alternativ kann die Lagerung auch unter anderen Bedingungen erfolgen, bei denen sich die Zusammensetzung nicht verändert. Dieses synthetische Abwasser hat die hundertfache Konzentration des im technischen Bericht der OECD vom 11. Juni 1976 ‚Vorgeschlagenes Verfahren zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von Tensiden in synthetischen Detergenzien‘ beschriebenen Abwassers und enthält außerdem Dikaliumhydrogenphosphat.
18. Alternativ können die Bestandteile des Mediums vor der Lagerung getrennt sterilisiert werden, oder das Pepton und der Fleischextrakt werden erst kurz vor der Durchführung der Prüfung hinzugegeben. Vor der Verwendung ist das Medium gründlich zu mischen und der pH-Wert erforderlichenfalls auf $7,5 \pm 0,5$ einzustellen.

Prüfchemikalie

19. Eine Stammlösung ist für leicht wasserlösliche Prüfstoffe nur bis zur maximalen Wasserlöslichkeit herzustellen. (Ausfällungen sind nicht annehmbar.) In Wasser schlecht lösliche Stoffe, Gemische mit Bestandteilen mit unterschiedlicher Wasserlöslichkeit und adsorptive Stoffe sind direkt in die Prüfgefäße einzuwiegen. In diesen Fällen kann die Verwendung von Stammlösungen eine Alternative sein, wenn gelöste Konzentrationen der Prüfchemikalien in den Prüfgefäßen analytisch bestimmt werden (bevor der Belebtschlamm hinzugegeben wird). Wenn WAFs (*Water-Accommodated Fractions*) hergestellt werden, ist auch eine analytische Bestimmung der aufgelösten Konzentrationen der Prüfchemikalien in den Prüfgefäßen von wesentlicher Bedeutung. Organische Lösungsmittel, Dispergiermittel/Emulgatoren zur Verbesserung der Löslichkeit sind zu vermeiden. Stammlösungen können einer Ultraschallbehandlung unterzogen werden, und Suspensionen können vorgerührt werden (z. B. über Nacht), wenn geeignete Informationen über die Stabilität der jeweiligen Prüfchemikalie unter den betreffenden Bedingungen verfügbar sind.
20. Die Prüfchemikalie kann den pH-Wert im Prüfsystem beeinträchtigen. Der pH-Wert der mit der Prüfchemikalie behandelten Mischungen ist vor der Herstellung des Versuchsaufbaus in einem Vorversuch zu bestimmen, um zu prüfen, ob der pH-Wert vor der eigentlichen Prüfung sowie nochmals am Tag der eigentlichen Prüfung eingestellt werden muss. Lösungen/Suspensionen der Prüfchemikalie in Wasser sind erforderlichenfalls vor Hinzugabe des Inokulums zu neutralisieren. Da die Neutralisierung jedoch die chemischen Eigenschaften der Chemikalie ändern kann, könnten je nach Zweck der Untersuchung weitere Prüfungen durchgeführt werden, um die Auswirkungen der Prüfchemikalie auf den Schlamm ohne Einstellung des pH-Wertes zu ermitteln.

21. Infolge von Stoffverlusten während der Expositionsdauer können die toxischen Wirkungen flüchtiger Chemikalien insbesondere bei Prüfungen, bei denen Luft durch das System geperlt wird, unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Bei den betreffenden Stoffen ist Vorsicht geboten; in diesen Fällen sind stoffspezifische Analysen von Kontrollmischungen vorzunehmen, in denen der jeweilige Stoff enthalten ist, und die Belüftung ist entsprechend zu modifizieren.

Referenzchemikalie

22. Wenn 3,5-Dichlorphenol als Referenzchemikalie verwendet wird, ist eine Lösung aus 1,00 g 3,5-Dichlorphenol auf 1 000 ml Wasser herzustellen (15). Die Auflösung ist durch warmes Wasser und/oder eine Ultraschallbehandlung zu beschleunigen; nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur ist die Lösung auf das vorgesehene Volumen aufzufüllen. Es muss allerdings sichergestellt werden, dass sich die Struktur der Referenzchemikalie nicht geändert hat. Der pH-Wert der Lösung wird geprüft und gegebenenfalls mit NaOH oder H₂SO₄ auf 7-8 eingestellt.
23. Wenn Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat als Referenzchemikalie vorgesehen ist, sind Konzentrationen von 58 mg/l, 100 mg/l und 180 mg/l (Faktor 1,8) zu verwenden. Der Stoff wird unmittelbar in die Prüfgefäße eingewogen (29 — 50 — 90 mg bei einem Gesamtvolumen von 500 ml). Anschließend wird der Stoff in 234 ml autoklaviertem Leitungswasser aufgelöst. Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat ist leicht löslich. Nach Beginn der Prüfung werden 16 ml synthetisches Abwasser und 250 ml Belebtschlamm hinzugegeben.

Spezifischer Nitrifikationshemmer

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

Abiotische Kontrolle

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

Inokulum

26. Im Allgemeinen wird Belebtschlamm am Auslass des Belebungsbeckens, oder in der Nähe des Auslasses des Beckens, einer ordnungsgemäß betriebenen Kläranlage entnommen, in der hauptsächlich häusliche Abwässer aufbereitet werden. Je nach Zweck des Tests können auch sonstige geeignete Typen von Belebtschlamm oder Belebtschlamm sonstiger Herkunft (z. B. im Labor gezüchteter Schlamm) mit geeigneten Konzentrationen an suspendierten Stoffen (2-4 g/l) verwendet werden. Schlämme aus unterschiedlichen Behandlungsanlagen könnten jedoch unterschiedliche Eigenschaften aufweisen und unterschiedlich empfindlich sein.
27. Der Schlamm kann wie entnommen verwendet werden; grobe Teilchen sind jedoch durch kurzzeitiges Absetzen (etwa 5-15 Minuten) und Dekantieren der oberen Schicht der feineren Feststoffe oder durch Sieben (z. B. mit einer Maschenweite von 1 mm²) abzutrennen. Alternativ kann der Schlamm in einem Mischer mindestens etwa 15 Sekunden homogenisiert werden; dabei sind jedoch die Scherkräfte und die Temperaturänderung zu beachten, die bei längerer Mischdauer auftreten können.

28. Häufig muss der Schlamm gewaschen werden (z. B. bei geringer endogener Respirationsrate). Zunächst ist der Schlamm zu zentrifugieren, bis ein klarer Überstand entsteht und sich aus den Feststoffen des Abwassers ein Pellet bildet (z. B. nach 10 Minuten mit etwa $10\,000\text{ m/s}^2$). Die überstehende Flüssigkeit wird entfernt und der Schlamm in chlorfreiem Leitungswasser unter Schütteln resuspendiert; anschließend ist das Waschwasser durch Zentrifugieren abzutrennen und ebenfalls zu entfernen. Erforderlichenfalls ist der Wasch- und Zentrifugiervorgang zu wiederholen. Die Trockenmasse eines bekannten Volumens des resuspendierten Schlammes wird ermittelt, und der Schlamm wird unter Abtrennen der Flüssigkeit konzentriert oder in chlorfreiem Leitungswasser weiter verdünnt, bis er die erforderliche Feststoffkonzentration von 3 g/l aufweist. Der Belebtschlamm ist bei der Testtemperatur kontinuierlich zu belüften (z. B. mit 2 l/Minute) und möglichst am Tag der Entnahme zu verwenden. Wenn dies nicht möglich ist, muss dem Schlamm das synthetische Abwasser (50 ml synthetisches Abwasser/l Belebtschlamm) zwei weitere Tage lang täglich zugeführt werden. Anschließend wird der Schlamm für die Prüfung verwendet, und die Ergebnisse sind als gültig anzunehmen, sofern keine signifikante Änderung der Aktivität des Schlammes zu verzeichnen ist; dies ist anhand der endogenen heterotrophen Respirationsrate und der Respirationsrate durch Nitrifikation zu beurteilen.
29. Schwierigkeiten können sich ergeben, wenn es bei der Inkubation zu derartiger Schaumbildung kommt, dass der Schaum und die mit dem Schaum verbundenen Feststoffe des Schlammes aus den Belüftungsgefäßen herausgedrückt werden. Gelegentlich ist ein Schäumen einfach auf das Vorhandensein des synthetischen Abwassers zurückzuführen, aber wenn die Prüfchemikalie aus einem Tensid besteht oder ein Tensid enthält, ist mit Schaumbildung zu rechnen. Der Verlust von Schlamm-Feststoffen aus den Prüfmischungen hat eine künstliche Reduzierung der Respirationsrate zur Folge, die fälschlicherweise als Ergebnis einer Hemmung ausgelegt werden könnte. Außerdem bewirkt die Belüftung der Tensidlösung eine Konzentration der Tenside in der Schaumschicht; der Verlust des Schaums aus dem Prüfsystem reduziert die Expositionskonzentrationen. Die Schaumbildung kann durch einfache mechanische Methoden (z. B. durch gelegentliches manuelles Rühren mit einem Glasstab) oder durch Zugabe eines tensidfreien Silikon-Antischaummittels und/oder durch Belüftung mit einem Schüttelkolben kontrolliert werden. Wenn das Problem auf das Vorhandensein des synthetischen Abwassers zurückzuführen ist, muss die Zusammensetzung des Abwassers geändert werden, indem ein Antischaum-Reagenz zugesetzt wird (z. B. $50\text{ }\mu\text{l/l}$). Ist die Schaumbildung auf die Prüfchemikalie zurückzuführen, muss die für eine Reduzierung der Schaumbildung erforderliche Menge bei der maximalen Prüfkonzentration ermittelt werden; anschließend sind alle Prüfgefäße in identischer Weise zu behandeln (einschließlich der Prüfgefäße wie Blindkontrollen und Referenzgefäße ohne Schaum). Wenn Antischaummittel verwendet werden, darf es nicht zu Wechselwirkungen mit dem Inokulum und/oder mit der Prüfchemikalie kommen.

PRÜFVERFAHREN

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

Prüfbedingungen

31. Die Prüfung ist bei einer Temperatur von $20 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ vorzunehmen.

Prüfmischungen

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

Referenzmischungen

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

Blindkontrollen

34. Bei Tests, bei denen die Prüfgefäße nacheinander in regelmäßigen Abständen vorbereitet werden, sind zu Beginn und am Ende der Expositionsdauer Blindkontrollen (F_b) vorzunehmen. Wenn Prüfungen mit Geräten vorgenommen werden, die gleichzeitige Messungen des Sauerstoffverbrauchs zulassen, sind für jede Gruppe gleichzeitiger Analysen mindestens zwei Blindkontrollen einzubeziehen. Blindkontrollen enthalten jeweils gleiche Volumina des Belebtschlammes und des synthetischen Mediums, jedoch weder die Prüfchemikalie noch die Referenzchemikalie. Sie sind mit Wasser auf das gleiche Volumen wie die Prüf- und die Referenzmischungen zu verdünnen.

Abiotische Kontrolle

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

Allgemeines Verfahren und Messungen

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

Nitrifikationspotenzial des Schlammes

38. Um festzustellen, ob der Schlamm nitrifiziert und in welchem Maß diese Nitrifikation gegebenenfalls erfolgt, werden Mischungen (F_b) wie die Mischungen für die Blindkontrollen und die zusätzlichen ‚Kontrollen‘ (F_N) hergestellt, die jedoch außerdem N-Allylthioharnstoff in einer Konzentration von 11,6 mg/l enthalten. Die Mischungen sind zu belüften und 3 Stunden bei 20 ± 2 °C zu inkubieren. Anschließend wird der Sauerstoffverbrauch gemessen, und die Sauerstoffverbrauchsrate durch Nitrifikation wird berechnet.

Prüfprotokolle

Vorversuch

39. Erforderlichenfalls wird mit einem Vorversuch der Konzentrationsbereich der Prüfchemikalie ermittelt, der in einem definitiven Test zur Bestimmung der Hemmung des Sauerstoffverbrauchs benötigt wird. Alternativ kann durch die Tatsache, dass in einem Vorversuch keine Hemmung des Sauerstoffverbrauchs durch die Prüfchemikalie festgestellt wurde, belegt werden, dass ein definitiver Test nicht erforderlich ist. In diesem Fall sollten drei Proben mit der höchsten geprüften Konzentration (in der Regel 1 000 mg/l, jedoch abhängig von den Datenanforderungen) im Vorversuch enthalten sein.

Tabelle 1

Beispiele für Mischungen für den Vorversuch

Reagenz	Ausgangskonzentration				
Stammlösung der Prüfchemikalie	10 g/l				
Stammlösung des synthetischen Mediums	Siehe Nummer 16				
Stammlösung mit Belebtschlamm	3 g/l suspendierte Feststoffe				
Bestandteile von Mischungen	Dosierung in Prüfgefäße ^(e)				
	F _{T1}	F _{T2}	F _{T3-5}	F _{B1-2}	F _A
Stammlösung der Prüfchemikalie (ml) (Nummern 19 bis 21)	0,5	5	50	0	50
Stammlösung des synthetischen Mediums (ml) (Nummer 16)	16	16	16	16	16
Belebtschlamm-Suspension (ml) (Nummern 26 bis 29)	250	250	250	250	0
Wasser (Nummer 15)	233,5	229	184	234	434
Gesamtvolumen der Mischungen (ml)	500	500	500	500	500
Konzentrationen in der Mischung					
Prüfsuspension (mg/l) Belebtschlamm	10	100	1 000	0	1 000
(suspendierte Feststoffe) (mg/l)	1 500	1 500	1 500	1 500	0

^(e) Auf dieselbe Weise ist mit der Referenzchemikalie zu verfahren (Gefäße F_{R1-3}).

40. Die Prüfung ist unter Verwendung von mindestens drei Konzentrationen der Prüfchemikalie (z. B. 10 mg/l, 100 mg/l und 1 000 mg/l) und mit einer Blindkontrolle sowie erforderlichenfalls mit mindestens drei abiotischen Kontrollen mit den höchsten Konzentrationen der Prüfchemikalie vorzunehmen (siehe z. B. Tabelle 1). Im Idealfall hat die niedrigste Konzentration keine Auswirkungen auf den Sauerstoffverbrauch. Die Sauerstoffverbrauchsrate und gegebenenfalls die Nitrifikationsrate sind zu berechnen; anschließend wird die prozentuale Hemmung berechnet. Je nach Zweck der Prüfung ist es auch möglich, nur die Toxizität einer Grenzkonzentration (z. B. 1 000 mg/l) zu bestimmen. Wenn bei diesen Konzentrationen keine statistisch signifikante toxische Wirkung auftritt, brauchen keine weiteren Prüfungen mit höheren oder niedrigeren Konzentrationen mehr vorgenommen zu werden. Schlecht wasserlösliche Stoffe, Mischungen mit Bestandteilen mit unterschiedlicher Wasserlöslichkeit und adsorptive Stoffe sind direkt in die Prüfgefäße einzuwiegen. In diesem Fall ist das für die Stammlösung mit dem Prüfstoff vorgesehene Volumen durch Verdünnungswasser zu ersetzen.

Definitiver Test

Hemmung des Gesamtsauerstoffverbrauchs

41. Die Prüfung wird mit einer Reihe von Konzentrationen durchgeführt, die im Vorversuch ermittelt wurden. Um sowohl eine NOEC als auch einen EC_x-Wert (z. B. EC₅₀) zu erhalten, sind meist sechs Kontrollen und fünf Prüfkonzentrationen in einer geometrischen Reihe mit je fünf Replikaten zu empfehlen. Die abiotische Kontrolle braucht nicht wiederholt zu werden, wenn im Vorversuch kein Sauerstoffverbrauch festgestellt wurde; wenn jedoch ein signifikanter Sauerstoffverbrauch zu verzeichnen ist, sind für jede Konzentration der Prüfchemikalie abiotische Kontrollen einzubeziehen. Die Empfindlichkeit des Schlammes ist mithilfe der Referenzchemikalie 3,5-Dichlorphenol zu prüfen. Da diese Empfindlichkeit erfahrungsgemäß schwankt, muss sie bei jeder Testreihe geprüft werden. In jedem Fall werden nach drei Stunden sowie erforderlichenfalls zusätzlich bereits nach 30 Minuten Proben aus den Prüfgefäßen entnommen, um den Sauerstoffverbrauch in der Zelle mit der Sauerstoffelektrode zu messen. Aus den erfassten Daten werden die spezifischen Respirationsraten der Kontroll- und der Prüfmischungen berechnet. Die prozentuale Hemmung ist mit der nachstehenden Gleichung 7 zu ermitteln.

Unterscheidung zwischen der Hemmung der heterotrophen Respiration und der Nitrifikation

42. Die Verwendung des spezifischen Nitrifikationshemmers ATU ermöglicht die unmittelbare Beurteilung der hemmenden Wirkung von Prüfchemikalien auf die heterotrophe Oxidation. Die Auswirkungen auf die Nitrifikationsrate können durch Subtraktion der Sauerstoffverbrauchsrate mit ATU von der Gesamtverbrauchsrate (ohne ATU) berechnet werden. Zwei Reihen von Reaktionsmischungen sind nach den Prüfprotokollen zur Ermittlung des EC_x -Wertes bzw. der NOEC herzustellen, wie unter Nummer 41 beschrieben; außerdem ist jedem Gemisch in einer der beiden Reihen ATU in einer Endkonzentration von 11,6 mg/l zuzugeben. (Von dieser Konzentration ist belegt, dass die Nitrifikation in Schlamm mit Konzentrationen suspendierter Feststoffe von bis zu 3 000 mg/l vollständig gehemmt wird (4).) Am Ende des Expositionszeitraums werden die Sauerstoffverbrauchsraten gemessen; diese direkten Werte geben nur Aufschluss über die heterotrophe Respiration. Die Differenz zwischen diesen Werten und den entsprechenden Gesamtrespirationsraten entspricht der Nitrifikation. Anschließend werden die unterschiedlichen Grade der Hemmung berechnet.

Messungen

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

Überprüfung der Konzentration der Prüfchemikalie

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

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

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

45. Um zeitaufwendige und teure Analysen zu vermeiden, sollte die Prüfchemikalie einfach direkt in die Prüfgefäße eingewogen und bei den anschließenden Berechnungen die anfänglich gewogene nominale Konzentration zugrunde gelegt werden. Eine Unterscheidung zwischen gelöster, nicht gelöster und adsorbierter Fraktion der Prüfchemikalie braucht nicht vorgenommen zu werden, da alle diese Fraktionen auch unter realen Bedingungen in Kläranlagen auftreten und je nach Zusammensetzung des Abwassers sehr unterschiedlich sein können. Ziel der Prüfmethode ist die realistische Abschätzung einer nicht hemmenden Konzentration; die Methode ist nicht geeignet, um im Einzelnen zu untersuchen, welche Fraktionen zur Hemmung der Mikroorganismen im Belebtschlamm beitragen. Auch adsorptive Stoffe sind direkt in die Prüfgefäße einzuwiegen; um Verluste durch Adsorption zu minimieren, werden die Gefäße silanisiert.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Berechnung der Sauerstoffverbrauchsraten

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

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

Dabei sind:

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

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

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

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

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

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

48. Die verschiedenen kombinierbaren Indizes von R sind:

S = spezifische Rate

T = Gesamtrespirationsrate

N = auf Nitrifikationsrespiration zurückzuführende Rate

H = auf heterotrophe Respiration zurückzuführende Rate

A = auf abiotische Prozesse zurückzuführende Rate

B = auf Blindkontrollen basierende Rate (Mittelwert)

Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate aufgrund von Nitrifikation

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

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

Dabei sind:

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

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

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

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

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

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

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

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

Berechnung der prozentualen Hemmung

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

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

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

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

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

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

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

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

EC_{50} < 1 mg/l

EC_{50} 1 mg/l bis 10 mg/l

EC_{50} 10 mg/l bis 100 mg/l

EC_{50} > 100 mg/l

Interpretation der Ergebnisse

EC_x

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

Schätzung der NOEC

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

Prüfbericht

59. Das Prüfprotokoll enthält die folgenden Informationen:

Prüfchemikalie:

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

Prüfsystem

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

Prüfbedingungen

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

Ergebnisse

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

LITERATUR

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

*Anlage 1***Begriffsbestimmungen**

Bei dieser Prüfmethode werden die folgenden Begriffsbestimmungen zugrunde gelegt:

Chemikalie: ein Stoff oder eine Mischung.

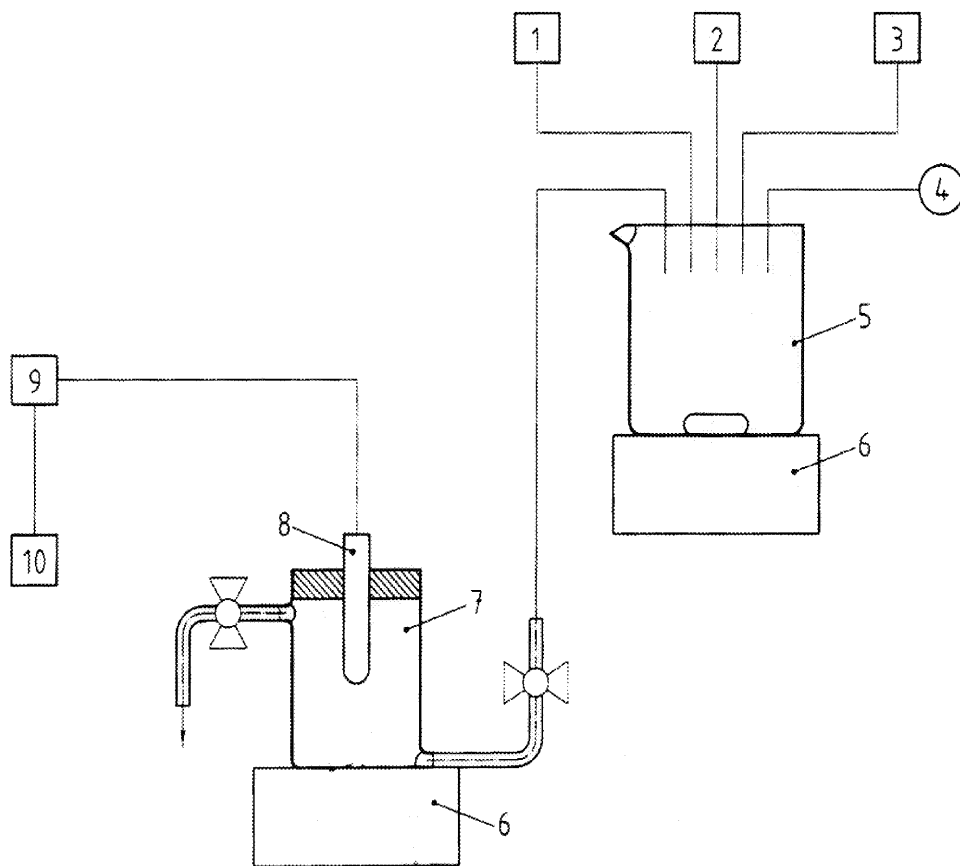
EC_x (Konzentration mit einer Wirkung von x %): Konzentration, bei der innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle eine Wirkung von x % auf die Testorganismen zu verzeichnen ist. Der EC₅₀-Wert beispielsweise ist die Konzentration, bei der bei 50 % einer exponierten Population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

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

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

Anlage 2

Abb. 1 Messgeräte (Beispiele)

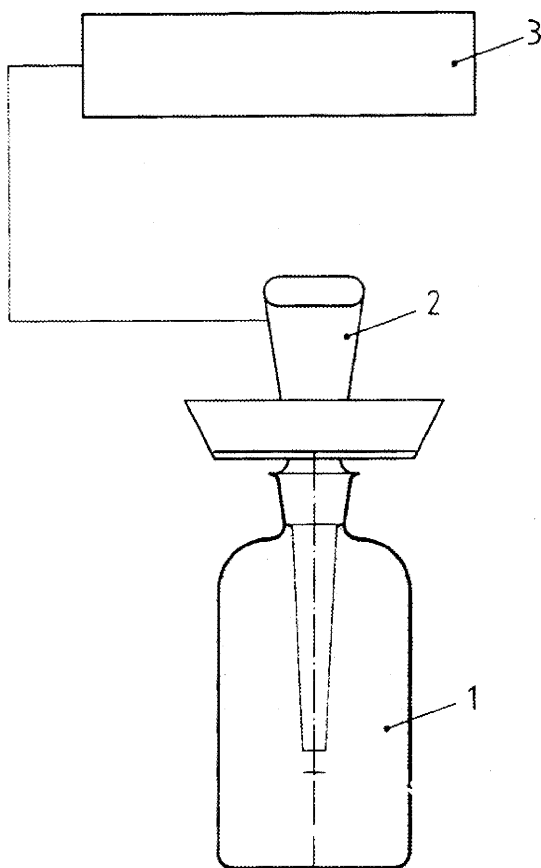


Legende

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

Anlage 3

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

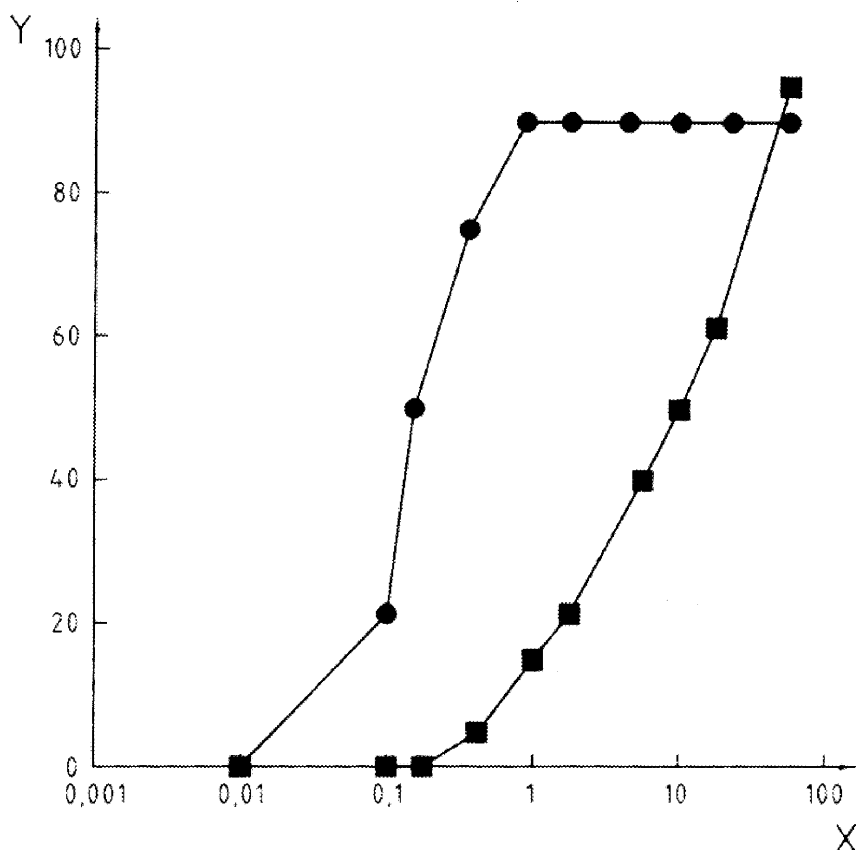


Legende

- 1 Prüfgefäß
- 2 Sauerstoffelektrode
- 3 Sauerstoffmessgerät

Anlage 4

Abb. 3 Hemmkurven (Beispiel)



Legende

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

Y Hemmung (%)

■ Hemmung der heterotrophen Respiration mit einem nitrifizierenden Schlamm

● Hemmung der Nitrifikation mit einem nitrifizierenden Schlamm

(5) Kapitel C.26 erhält folgende Fassung:

„C.26 LEMNA SP. — WACHSTUMSINHIBITIONSTEST

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 221 (2006). Sie dient zur Beurteilung der Toxizität von Chemikalien bei Süßwasserpflanzen der Gattung *Lemma* (Wasserlinse). Die Methode beruht auf bestehenden Methoden (1)(2)(3)(4)(5)(6), sieht aber Änderungen der entsprechenden Methoden vor, die neueren Forschungsergebnissen und Anhörungen bezüglich einer Reihe wesentlicher Aspekte Rechnung tragen. Die Prüfmethode wurde in einem internationalen Ringversuch validiert (7).

2. Die Prüfmethode beschreibt Toxizitätstests mit *Lemna gibba* und *Lemna minor*, die beide umfassend untersucht wurden und Gegenstand der genannten Standards waren. Die Taxonomie von *Lemna* spp. ist schwierig; problematisch sind die zahlreichen Phänotypen. *Lemna* können zwar genetisch bedingt unterschiedlich auf Giftstoffe reagieren, doch es liegen noch keine ausreichenden Daten zu den Ursachen für diese Variabilität vor, um einen speziellen Klon zur Verwendung bei dieser Prüfmethode empfehlen zu können. Es wird darauf hingewiesen, dass der Test nicht axenisch durchgeführt wird; in verschiedenen Stadien während der Durchführung des Tests wird jedoch mit geeigneten Maßnahmen versucht, Verunreinigungen durch andere Organismen auf ein Minimum zu begrenzen.
3. Die Durchführung von Tests sowohl mit Erneuerung der Testlösung (semistatische Tests und Durchflusstests) als auch ohne Erneuerung der Testlösung (statische Tests) wird detailliert beschrieben. Abhängig von den Zielsetzungen der Tests sowie von rechtlichen Anforderungen wird empfohlen, den Einsatz von semistatischen Methoden sowie von Durchflussmethoden zu prüfen (z. B. für Stoffe, die durch Verflüchtigung, Photoabbau, Ausfällung oder biologischen Abbau rasch verloren gehen). Weitere Informationen sind Quelle (8) zu entnehmen.
4. Definitionen der verwendeten Begriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

5. Exponentiell wachsende Pflanzenkulturen der Gattung *Lemna* werden über einen Zeitraum von sieben Tagen als Monokulturen in unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfchemikalie kultiviert. Ziel des Tests ist es, die durch den Stoff bedingten Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum während dieses Zeitraums zu quantifizieren, basierend auf der Auswertung ausgewählter Messvariablen. Die Frondzahl ist die primäre Messvariable. Außerdem wird mindestens eine weitere Messvariable (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse) gemessen, da sich einige Stoffe erheblich stärker auf diese Messvariablen auswirken als auf die Frondzahlen. Um die stoffabhängigen Auswirkungen zu quantifizieren, wird das Wachstum der Testlösungen mit dem Wachstum der Kontrolllösungen verglichen, und die Konzentration, die eine spezifizierte Wachstumshemmung von x % (z. B. 50 %) verursacht, wird bestimmt und als EC_x (z. B. EC_{50}) angegeben.
6. Der Endpunkt des Tests ist die Wachstumshemmung, ausgedrückt als logarithmische Zunahme der Messvariablen (durchschnittliche spezifische Wachstumsrate) während der Expositionsdauer. Aus den in einer Reihe von Testlösungen erfassten durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten wird die Konzentration bestimmt, bei der sich eine spezifizierte Hemmung der Wachstumsrate von x % (z. B. 50 %) ergibt; diese Konzentration wird als $E_x C_x$ bezeichnet (z. B. $E_x C_{50}$).
7. Eine weitere Reaktionsvariable bei dieser Prüfmethode ist der Zellertrag (Yield); diese Variable kann erforderlich sein, damit in manchen Ländern bestimmte Rechtsvorschriften erfüllt werden. Die Variable ergibt sich aus den Messvariablen am Ende der Expositionsdauer abzüglich der Messvariablen bei Beginn der Expositionsdauer. Aus dem in einer Reihe von Testlösungen ermittelten Zellertrag wird die Konzentration berechnet, bei der sich eine festgelegte Zellertrag-Hemmung von x % (z. B. 50 %) ergibt; diese Konzentration wird als $E_y C_x$ bezeichnet (z. B. $E_y C_{50}$).
8. Außerdem können die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC) und die höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkung (NOEC) statistisch bestimmt werden.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

9. Eine Analysemethode mit geeigneter Empfindlichkeit für die Quantifizierung des im Prüfmedium enthaltenen Stoffs sollte verfügbar sein.
10. Zur Festlegung der Testbedingungen hilfreiche Informationen zur Prüfchemikalie sind die Strukturformel, die Reinheit, die Wasserlöslichkeit, die Stabilität in Wasser, die Lichtbeständigkeit, pK_a , K_{ow} , der Dampfdruck und die biologische Abbaubarkeit. Aus der Wasserlöslichkeit und dem Dampfdruck kann die Henry-Konstante berechnet werden, aus der zu entnehmen ist, ob während der Testdauer erhebliche Verluste der Prüfchemikalie zu erwarten sind. Die Konstante gibt Aufschluss darüber, ob bestimmte Maßnahmen zur Überwachung dieser Verluste durchgeführt werden sollten. Wenn Informationen zur Löslichkeit und zur Stabilität der Prüfchemikalie nicht zuverlässig sind, sollten diese unter den Testbedingungen (Nährmedium, Temperatur und Beleuchtung) untersucht werden.

11. Wenn der Einhaltung des pH-Wertes des Prüfmediums besondere Bedeutung zukommt (z. B. beim Testen von Metallen oder sonstigen hydrolytisch instabilen Chemikalien), wird die Zugabe einer Pufferlösung zum Nährmedium empfohlen (siehe Nummer 21). Weitere Hinweise zur Prüfung von Chemikalien mit physikalisch-chemischen Merkmalen, welche die Durchführung des Tests erschweren, sind Quelle (8) zu entnehmen.

VALIDITÄT DES TESTS

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

REFERENZCHEMIKALIE

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

BESCHREIBUNG DER METHODE

Apparatur

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

Testorganismus

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

Kultivierung

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

Prüfmedium

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

Testlösungen

25. Die Testlösungen werden gewöhnlich durch Verdünnung einer Stammlösung hergestellt. Zum Herstellen von Stammlösungen der Prüfchemikalie wird die Chemikalie im Allgemeinen im Nährmedium gelöst.
26. Die höchste getestete Konzentration der Prüfchemikalie sollte in der Regel die Wasserlöslichkeit der Chemikalie bei den jeweiligen Testbedingungen nicht überschreiten. Allerdings wird darauf hingewiesen, dass *Lemna spp.* auf der Oberfläche treiben und Chemikalien ausgesetzt werden könnten, die sich am Übergang zwischen Wasser und Umgebungsluft sammeln (z. B. schlecht wasserlösliche oder hydrophobe Chemikalien oder oberflächenaktive Chemikalien). Unter diesen Umständen besteht eine Belastung durch nicht in der Lösung enthaltene Materialien, und die Testkonzentrationen können je nach den Merkmalen der Prüfchemikalie die Wasserlöslichkeit überschreiten. Bei Prüfchemikalien mit geringerer Wasserlöslichkeit muss unter Umständen mit einem organischen Lösungsmittel oder einem Dispergiermittel eine konzentrierte Stammlösung oder eine Dispersion der Chemikalie hergestellt werden, damit leichter die exakten Mengen der Prüfchemikalie zum Prüfmedium hinzugegeben werden können und damit die Dispergierung und die Auflösung der Chemikalie begünstigt wird. Die Verwendung dieser Materialien sollte unbedingt vermieden werden. Durch die Verwendung der Lösungsmittel oder Dispergiermittel sollte keine Phytotoxizität entstehen. Häufig verwendete Lösungsmittel, die bei Konzentrationen bis zu 100 µl/l keine phototoxische Wirkung haben, sind z. B. Aceton und Dimethylformamid. Wenn ein Lösungsmittel oder ein Dispergiermittel verwendet wird, muss die Endkonzentration protokolliert und auf ein Minimum (≤ 100 µl/l) beschränkt werden; alle behandelten Proben und die Kontrollproben müssen das Lösungsmittel bzw. das Dispergiermittel in derselben Konzentration enthalten. Weitere Informationen zur Verwendung von Dispergiermitteln sind Quelle (8) zu entnehmen.

Test- und Kontrollgruppen

27. Die vorherige Kenntnis der Toxizität der Prüfchemikalie für *Lemna* (z. B. aufgrund eines Vorversuchs) erleichtert die Auswahl geeigneter Testkonzentrationen. Beim definitiven Toxizitätstest werden in der Regel mindestens fünf Testkonzentrationen in einer geometrischen Reihe angeordnet. Der Abstandsfaktor zwischen den Testkonzentrationen beträgt höchstens 3,2; bei flachen Konzentrations-Reaktionskurven kommen jedoch auch höhere Werte in Betracht. Die Verwendung von weniger als fünf Konzentrationen muss begründet werden. Für jede Testkonzentration sind mindestens drei Replikate zu verwenden.

28. Beim Festlegen des Testkonzentrationsbereichs (zur Bereichsermittlung und/oder für den definitiven Toxizitätstest) sind folgende Punkte zu berücksichtigen:
- Um ein angemessenes Konfidenzintervall sicherzustellen, müssen bei der Bestimmung eines EC_x -Wertes die Testkonzentrationen so gewählt werden, dass der EC_x -Wert eingeschlossen ist. Bei der Ermittlung von EC_{50} beispielsweise muss die höchste Testkonzentration größer als EC_{50} sein. Wenn der EC_{50} -Wert außerhalb des Testkonzentrationsbereichs liegt, sind die entsprechenden Konfidenzintervalle groß, und das verwendete statistische Modell ist eventuell nicht geeignet.
 - Wenn die LOEC oder die NOEC bestimmt werden sollen, muss die niedrigste Testkonzentration so gering sein, dass das Wachstum nicht signifikant kleiner als das Wachstum der Kontrollgruppe ist. Außerdem muss die höchste Testkonzentration so hoch sein, dass das Wachstum signifikant geringer ist als das Wachstum der Kontrollgruppe. Ansonsten muss der Test mit einem anderen Konzentrationsbereich wiederholt werden (wenn die höchste Konzentration nicht an der Löslichkeitsgrenze bzw. bei der höchstens erforderlichen Grenzkonzentration [z. B. 100 mg/l^{-1}] liegt).
29. Die Tests beinhalten jeweils Kontrollen, bei denen das gleiche Nährmedium, die gleiche Anzahl an Fronds und Kolonien und die gleichen Umgebungsbedingungen wie in den Prüfgefäßen gegeben sind und nur die Prüfchemikalie fehlt. Wenn ein zusätzliches Lösungsmittel oder Dispergiermittel verwendet wird, muss eine zusätzliche Kontrolle mit der gleichen Konzentration des Lösungsmittel/Dispergiermittel wie in den Prüfansätzen getestet werden. Die Anzahl der Kontrollgefäße zur Durchführung von Replikaten (sowie ggf. der Lösungsmittelgefäße) muss mindestens identisch mit der Anzahl der für die verschiedenen Testkonzentrationen verwendeten Gefäße sein; im Idealfall sollten sogar doppelt so viele Gefäße verwendet werden.
30. Wenn die NOEC nicht bestimmt werden muss, kann das Prüfprotokoll geändert werden, indem die Anzahl der Konzentrationen erhöht und die Anzahl der Replikate verringert wird. Allerdings müssen mindestens drei Kontrollreplikate verwendet werden.

Exposition

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

Inkubationsbedingungen

35. Durch kontinuierliche fluoreszierende Beleuchtung mit warmem oder kaltweißem Licht wird eine Lichtintensität hergestellt, die bei Messung unter photosynthetisch aktiver Strahlung (400-700 nm) an Punkten jeweils in demselben Abstand von der Lichtquelle wie die Lemna-Fronds bei $85\text{-}135 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ liegt (entsprechend etwa 6 500-10 000 lx). Abweichungen von der gewählten Lichtintensität dürfen im Testbereich höchstens $\pm 15 \%$ betragen. Dabei ist zu beachten, dass die Messwerte von der Methode zur Feststellung und zur Messung der Lichtintensität (insbesondere vom Sensortyp) abhängen. Kugelförmige Sensoren (die auf Licht aus allen Winkeln über und unter der Messebene reagieren) sowie ‚Kosinus‘-Sensoren (die auf Licht aus allen Winkeln über der Messebene ansprechen) sind gegenüber unidirektionalen Sensoren zu bevorzugen, da diese Sensoren bei Mehrpunkt-Lichtquellen des hier beschriebenen Typs höhere Messwerte ergeben.

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

Dauer

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

Messungen und analytische Bestimmungen

38. Bei Beginn des Tests wird die Anzahl der in den Prüfgefäßen enthaltenen Fronds ermittelt und protokolliert; zu zählen sind alle herausragenden, deutlich erkennbaren Fronds. Die Anzahl der normal oder anomal aussehenden Fronds ist bei Beginn des Tests, alle drei Tage während der Expositionsdauer (d. h. binnen des Zeitraums von sieben Tagen mindestens zweimal) und am Ende des Tests zu bestimmen. Änderungen in der Entwicklung der Pflanzen (z. B. Änderungen der Größe oder des Aussehens der Fronds, Anzeichen für eine Nekrose, Chlorose oder Aufwölbungen, das Aufbrechen von Kolonien oder der Verlust der Schwimmfähigkeit sowie Veränderungen der Wurzellänge oder der sonstigen Beschaffenheit der Wurzeln) sind zu protokollieren. Wesentliche Merkmale des Prüfmediums (z. B. Vorliegen nicht gelösten Materials oder Algenwachstum im Prüfgefäß) werden ebenfalls vermerkt.
39. Ergänzend zur Ermittlung der Frondzahl während des Tests sind auch die Auswirkungen der Prüfchemikalie auf eine (oder mehrere) der folgenden Messvariablen zu bewerten:
- Gesamtfläche der Fronds,
 - Trockenmasse,
 - Frischmasse.
40. Die Gesamtfläche der Fronds hat den Vorteil, dass sie für jedes einzelne Prüfgefäß und für jedes einzelne Kontrollgefäß jeweils bei Beginn des Tests, während der Durchführung des Tests und am Ende des Tests bestimmt werden kann. Die Trockenmasse und die Frischmasse werden bei Beginn des Tests an einer Probe der Impfkultur ermittelt, die typisch für das bei Beginn des Tests verwendete Material ist; eine weitere Feststellung erfolgt am Ende des Tests anhand des Pflanzenmaterials jeweils aus den Prüfgefäßen und aus den Kontrollgefäßen. Wenn die Frondfläche nicht gemessen wird, ist eher die Trockenmasse als die Frischmasse zu ermitteln.
41. Die Gesamtfläche der Fronds, die Trockenmasse und die Frischmasse können wie folgt bestimmt werden:
- Gesamtfläche der Fronds:* Die Gesamtfläche der Fronds aller Kolonien kann durch Bildanalyse ermittelt werden. Eine Silhouette des Prüfgefäßes und der Pflanzen kann mit einer Videokamera erfasst werden. Dazu wird das Gefäß auf einen Leuchtkasten gestellt; das dort aufgenommene Bild wird anschließend digitalisiert. Durch die Kalibrierung mit flachen Verläufen bekannter Flächen kann dann die Gesamtfläche der Fronds im Prüfgefäß bestimmt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass Störungen durch den Rand des Prüfgefäßes ausgeschlossen werden. Ein alternatives, aber aufwendigeres Verfahren besteht darin, Prüfgefäße und Pflanzen zu fotokopieren und die entsprechenden Silhouetten der Kolonien auszuschneiden; anschließend wird die jeweilige Fläche mit einem Blattflächen-Analysator oder mit Millimeterpapier bestimmt. Geeignet sind unter Umständen aber auch andere Verfahren (z. B. die Ermittlung des Papiergewicht-Verhältnisses zwischen der Fläche der Kolonie-Silhouette und der Fläche der jeweils zugrunde gelegten Einheit).
 - Trockenmasse:* Alle Kolonien werden aus den Prüfgefäßen entnommen und mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gespült. Durch anschließendes Ablöschen wird überschüssiges Wasser entfernt; danach werden die Proben bei 60 °C auf ein konstantes Gewicht getrocknet. Wurzelreste werden einbezogen. Die Trockenmasse wird mit einer Genauigkeit von mindestens 0,1 mg angegeben.
 - Frischmasse:* Alle Kolonien werden in zuvor gewogene Röhrchen aus Polystyrol (oder einem sonstigen inerten Material) mit feinen Löchern (1 mm) im gerundeten Boden gesetzt. Anschließend werden die Röhrchen bei Raumtemperatur 10 Minuten mit 3 000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Die Röhrchen mit den nun getrockneten Kolonien werden noch einmal gewogen; danach wird die Frischmasse durch Subtraktion des Gewichts der leeren Röhrchen bestimmt.

Häufigkeit der Messungen und der analytischen Bestimmungen

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

43. Die Lichtintensität wird in der Wachstumskammer, im Inkubator oder im jeweiligen Raum in dem Abstand von der Lichtquelle gemessen, der auch bei den *Lemna*-Fronds gegeben ist. Während des Tests wird mindestens eine Messung vorgenommen. Die Temperatur des Mediums in einem Surrogatgefäß unter den gleichen Bedingungen wie in der Wachstumskammer bzw. im Inkubator oder im jeweiligen Raum ist mindestens täglich zu protokollieren.
44. Während des Tests wird die Konzentration der Prüfchemikalie in geeigneten Intervallen bestimmt. Bei statischen Tests ist die Konzentration mindestens bei Beginn des Tests und am Ende des Tests zu ermitteln.
45. Bei semistatischen Tests, bei denen davon ausgegangen wird, dass die Konzentration der Prüfchemikalie nicht im Bereich von ± 20 % der Nominalkonzentration aufrechterhalten werden kann, müssen alle frisch hergestellten Testlösungen sowie alle Lösungen jeweils nach der Erneuerung analysiert werden (siehe Nummer 33). Bei Tests, bei denen die gemessene Ausgangskonzentration der Prüfchemikalie zwar nicht ± 20 % der Nominalkonzentration beträgt, für die aber hinreichend nachgewiesen werden kann, dass die Ausgangskonzentrationen wiederholbar und stabil sind (d. h. dass die Konzentrationen im Bereich von 80-120 % der Ausgangskonzentration liegen), sind chemische Bestimmungen nur bei der höchsten und der niedrigsten Konzentration erforderlich. In jedem Fall brauchen die Prüfchemikalienkonzentrationen für alle Testkonzentrationen vor der Erneuerung jeweils nur bei einem einzigen Replikat (bzw. bei Gefäßen mit zusammengefassten Replikaten jeweils bei nur einem Gefäß) erneut bestimmt zu werden.
46. Bei Durchflusstests ist ähnlich zu verfahren, wie bei den semistatischen Tests, d. h. Analysen sind jeweils bei Beginn des Tests, in der Mitte und am Ende des Tests durchzuführen; Messungen der ‚verbrauchten‘ Lösungen sind jedoch nicht erforderlich. Bei diesem Testtyp wird der Durchfluss des Verdünnungsmittels und der Prüfchemikalie oder der Prüfchemikalien-Stammlösung täglich geprüft.
47. Wenn nachgewiesen wird, dass die Konzentration der Prüfchemikalie während der gesamten Testdauer zufriedenstellend in Höhe von ± 20 % der Nominalkonzentration oder der gemessenen Ausgangskonzentration aufrechterhalten werden konnte, können die Ergebnisse auch ausgehend von den Nominalwerten bzw. von den gemessenen Ausgangswerten analysiert werden. Beträgt die Abweichung von der Nominalkonzentration oder von der gemessenen Ausgangskonzentration mehr als ± 20 %, sollte bei der Analyse der Ergebnisse vom geometrischen Mittel der Konzentration während der Expositionsdauer oder von Modellen ausgegangen werden, die den Rückgang der Prüfchemikalienkonzentration beschreiben (8).

Limit-Test

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

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Verdopplungszeit

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

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

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

Reaktionsvariablen

50. Mit der Prüfung sollen die Auswirkungen der Prüfchemikalie auf das vegetative Wachstum von *Lemna* bestimmt werden. Diese Prüfmethode beschreibt zwei Reaktionsvariablen, da in unterschiedlichen Rechtsordnungen unterschiedliche Präferenzen und rechtliche Anforderungen bestehen. Damit die Testergebnisse in allen Rechtsordnungen anerkannt werden können, sind die Auswirkungen mithilfe der beiden im Folgenden beschriebenen Reaktionsvariablen a und b zu auswerten.
- a) *Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate*: Diese Reaktionsvariable wird aufgrund von Veränderungen der Frondzahlen-Logarithmen sowie ausgehend von den Veränderungen der Logarithmen sonstiger Messparameter der Kontrollen und der einzelnen Behandlungsgruppen (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse) während eines bestimmten Zeitraums (jeweils pro Tag ausgedrückt) berechnet. Gelegentlich wird diese Wachstumsrate auch als relative Wachstumsrate bezeichnet (12).
- b) *Zellertrag*: Diese Reaktionsvariable wird ausgehend von Änderungen der Frondzahl sowie aufgrund von Änderungen anderer Messparameter der Kontrollen und der einzelnen Behandlungsgruppen (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse) bis zum Ende der Testdauer berechnet.
51. Es wird darauf hingewiesen, dass die mit diesen beiden Reaktionsvariablen berechneten Toxizitätswerte nicht vergleichbar sind; der entsprechende Unterschied muss bei der Verwendung der Testergebnisse berücksichtigt werden. Die mit der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate ($E_r C_x$) berechneten Werte für EC_x werden im Allgemeinen höher sein als die anhand des Zellertrags ($E_y C_x$) ermittelten Werte, wenn die für diese Testmethode vorgesehenen Bedingungen eingehalten werden; dies ist auf die unterschiedliche mathematische Grundlage der beiden Berechnungsverfahren zurückzuführen. Die auftretenden Unterschiede sollten jedoch nicht als Anzeichen für eine unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Reaktionsvariablen betrachtet werden; beide Werte sind einfach mathematisch verschieden. Das Konzept der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate beruht auf dem im Allgemeinen exponentiellen Verlauf des Wasserlinsenwachstums bei nicht beschränkten Kulturen, bei denen die Toxizität aufgrund der Auswirkungen auf die Wachstumsrate ermittelt wird, ohne jedoch von der absoluten Höhe der jeweiligen Wachstumsrate der Kontrollprobe, von der Steigung der Konzentrations-Reaktionskurve oder von der Testdauer abhängig zu sein. Auf der Reaktionsvariable ‚Zellertrag‘ beruhende Ergebnisse hingegen hängen von allen übrigen genannten Variablen ab. $E_y C_x$ ist von der spezifischen Wachstumsrate der in den einzelnen Tests verwendeten Wasserlinsenarten sowie von der maximalen spezifischen Wachstumsrate abhängig, die je nach Art sowie sogar zwischen den einzelnen Klonen unterschiedlich sein kann. Diese Reaktionsvariable darf nicht verwendet werden, um die Empfindlichkeit von Algenarten oder auch nur verschiedener Klone gegenüber Giftstoffen zu vergleichen. Die Verwendung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate zur Schätzung der Toxizität wird in der Wissenschaft bevorzugt; bei dieser Prüfmethode werden jedoch auch Toxizitätsschätzungen aufgrund des Zellertrags berücksichtigt, um den derzeitigen rechtlichen Anforderungen einiger Rechtsordnungen Rechnung zu tragen.
52. Toxizitätsschätzungen müssen auf der Frondzahl sowie auf einer weiteren Messvariablen (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse) beruhen, da sich manche Chemikalien erheblich stärker auf andere Messvariablen auswirken können als die Frondzahl. Diese Auswirkungen würden nicht festgestellt, wenn ausschließlich die Frondzahl berechnet würde.
53. Die Anzahl der Fronds sowie alle sonstigen protokollierten Messvariablen (gesamte Frondfläche, Trockenmasse oder Frischmasse) werden zusammen mit den Konzentrationen der Prüfchemikalie für jede Messung tabellarisch zusammengestellt. Anschließende Datenanalysen z. B. zur Schätzung von LOEC-, NOEC- oder EC_x -Werten sollten auf den Werten der einzelnen Replikate, nicht aber auf berechneten Mittelwerten der einzelnen Behandlungsgruppen beruhen.

Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate

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

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

Dabei sind:

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

- N_j : Messvariable im Prüfgefäß bzw. im Kontrollgefäß zum Zeitpunkt j
- t : Zeitraum vom Zeitpunkt i bis zum Zeitpunkt j

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

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

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

Dabei sind:

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

Zellertrag

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

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

Dabei sind:

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

Darstellung der Konzentrations-Reaktionskurven

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

Schätzung von EC_x

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

Statistische Verfahren

60. Ziel ist die Ermittlung einer quantitativen Konzentrations-Wirkungsbeziehung durch Regressionsanalyse. Im Anschluss an eine linearisierte Transformation der Reaktionsdaten (z. B. in Einheiten nach dem Probit-, Logit- oder Weibull-Modell) (13) kann eine gewichtete lineare Regression vorgenommen werden; nicht-lineare Regressionsverfahren, mit denen die unvermeidlichen Unregelmäßigkeiten der Daten und Abweichungen von gleichförmigen Verteilungen besser verarbeitet werden können, werden jedoch bevorzugt. Im Bereich von null bzw. der vollständigen Hemmung können diese Unregelmäßigkeiten durch die Transformation vergrößert werden und die Analyse beeinträchtigen (13). Es wird darauf hingewiesen, dass Standard-Analysemethoden mit Probit-, Logit- oder Weibull-Transformationen für quantale Daten (z. B. Mortalität oder Überlebensraten) vorgesehen sind und zur Verwendung in Verbindung mit Wachstums- oder Zellertragsdaten entsprechend modifiziert werden müssen. Spezifische Verfahren zur Bestimmung von EC_x -Werten aus kontinuierlichen Daten sind den Quellen (14), (15) und (16) zu entnehmen.
61. Für jede zu analysierende Reaktionsvariable sind aufgrund der Konzentrations-Wirkungsbeziehung EC_x -Werte zu ermitteln. Nach Möglichkeit sollten für jeden EC_x -Wert die 95- %-Konfidenzintervalle bestimmt werden. Die Qualität der Übereinstimmung der Reaktionsdaten mit dem Regressionsmodell sollte grafisch oder statistisch bewertet werden. Die Regressionsanalyse wird mit den Reaktionen der einzelnen Replikate (und nicht mit den Mittelwerten der Behandlungsgruppe) durchgeführt.
62. Schätzwerte für EC_{50} und für die Konfidenzintervalle können auch durch lineare Interpolation mit einem Bootstrapping-Algorithmus (17) erzielt werden, wenn die verfügbaren Regressionsmodelle/-methoden für die betreffenden Daten nicht geeignet sind.
63. Für eine Schätzung der LOEC und entsprechend auch der NOEC müssen die Mittelwerte der behandelten Lösungen durch Varianzanalyseverfahren (ANOVA) verglichen werden. Der Mittelwert der einzelnen Konzentrationen ist dann mit einer geeigneten Methode zur Durchführung von Mehrfachvergleichen bzw. zur Durchführung von Trendtests mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe zu vergleichen. Dunnett- und Williams-Tests können hilfreich sein (18)(19)(20)(21). Die ANOVA-Annahme der Varianzhomogenität muss einer Überprüfung unterzogen werden. Die entsprechende Bewertung kann anhand einer grafischen Darstellung oder aufgrund eines formalen Tests vorgenommen werden (22). Geeignet sind Levene- und Bartlett-Tests. Wenn die Annahme der Varianzhomogenität nicht erfüllt ist, kann gelegentlich eine Korrektur durch logarithmische Datentransformation erfolgen. Bei außerordentlicher Varianzheterogenität, die durch Transformation nicht korrigiert werden kann, sollten Analysen durch Methoden wie z. B. Jonckheere-Trendtests (Stepdown) erwogen werden. Weitere Hinweise zur Bestimmung von NOEC-Werten sind Quelle (16) zu entnehmen.
64. Aufgrund neuer Forschungsergebnisse wird empfohlen, das Konzept der NOEC aufzugeben und durch Punktschätzungen von EC_x -Werten zu ersetzen, die durch Regression ermittelt wurden. Für diesen *Lemna*-Test wurde noch kein geeigneter Wert für x definiert. Ein Bereich von 10 bis 20 % scheint jedoch geeignet (abhängig von der ausgewählten Reaktionsvariablen); vorzugsweise sollten sowohl EC_{10} als auch EC_{20} protokolliert werden.

Abschlussbericht

65. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfchemikalie:

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

Im Test verwendete Art:

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

Prüfbedingungen:

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

Ergebnisse:

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

LITERATUR

- (1) ASTM International.(2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (neu genehmigt 1998). S. 733-742. In: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (2) US EPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156.8 S.
- (3) AFNOR — Association Française de Normalisation.(1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 S.
- (4) SSI — Swedish Standards Institute.(1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13.15 S. (Schwedisch).
- (5) Environment Canada.(1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 — 120 S.
- (6) Environment Canada.(1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation.Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (7) Sims, I., Whitehouse, P., und Lacey, R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline.R&D Technical Report EMA 003.WRc plc — Environment Agency.
- (8) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (9) Internationale Organisation für Normung. ISO DIS 20079. Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (*Lemna minor*) — Wasserlinsen-Wachstumshemmtest.
- (10) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804.US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.
- (11) Lockhart, W.L., Billeck, B. N., und Baron, C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 — 359.
- (12) Huebert, D.B. and Shay J.M.(1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds.*Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.
- (13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713-718.
- (14) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O., und Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157-167.
- (15) Bruce, R.D., und Versteeg, D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.
- (16) OECD. (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- (17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity:The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

- (18) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096-1121.
 - (19) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482-491.
 - (20) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
 - (21) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 519-531.
 - (22) Brain, P., und Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.
-

Anlage 1

Begriffsbestimmungen

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

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

Chemikalie: ein Stoff oder eine Mischung.

Chlorose: Gelbfärbung des Blattmaterials.

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

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

EC_x: Konzentration der im Prüfmedium aufgelösten Prüfchemikalie, bei der sich binnen einer festgelegten Expositionsdauer eine Reduzierung des Wachstums von *Lemna* um x % (z. B. 50 %) ergibt. (Die Expositionsdauer ist ausdrücklich zu nennen, wenn die Dauer von der vollständigen oder normalen Testdauer abweicht.) Um einen von der Wachstumsrate oder vom Zellertrag abweichenden EC-Wert eindeutig zu kennzeichnen, wird die Bezeichnung ‚E_xC‘ für die Wachstumsrate und ‚E_yC‘ für den Zellertrag jeweils gefolgt von der verwendeten Messvariablen (z. B. E₁C [Frondzahl]) verwendet.

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

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

Aufwölbungen: Fronds mit einer Wölbung oder Schwellung.

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

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

Niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC): niedrigste geprüfte Konzentration, bei der beobachtet wurde, dass die Chemikalie binnen einer bestimmten Expositionsdauer gegenüber der Kontrollprobe eine statistisch signifikante Wachstumsreduzierung bewirkt (bei $p < 0,05$); allerdings müssen sämtliche Testkonzentrationen über der LOEC schädliche Folgen haben, die mindestens den bei der LOEC beobachteten schädlichen Folgen gleichwertig sind. Wenn diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden können, ist umfassend darzulegen, warum die LOEC (und entsprechend die NOEC) gewählt wurde.

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

Monokultur: Kultur mit einer Pflanzenart.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Anlage 2

Beschreibung *Lemna* spp.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

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

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

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

Bezugsquellen für *Lemna*-Arten

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Kanada, M5S 3 B2
Telefon: +1-416-978-3641
Telefax: +1-416-978-5878
E-Mail: jacreman@botany.utoronto.ca

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
United States
Telefon +1 919 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
Stockholm
SCHWEDEN
Telefon: +46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Umweltbundesamt (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
DEUTSCHLAND
E-Mail: Lemna@uba.de

LITERATUR

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

*Anlage 3***Haltung der Stammkultur**

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

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

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

Anlage 4

Medien

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

Schwedisches Standard-Lemna-Nährmedium (SIS)

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

Stamm- lösung Nr.	Stoff	Konzentration in der Stammlösung (g/l)	Konzentration im hergestellten Me- dium (mg/•l)	Hergestelltes Medium	
				Element	Konzentration (mg/•l)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA 2H ₂ O	0,28	1,4	-	-
VII	MOPS (Puffer)	490	490	-	-

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

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

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

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

Nährmedium 20X AAP

Die Stammlösungen werden in sterilem destilliertem oder entionisiertem Wasser hergestellt.

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

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

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

Stamm- lösung Nr.	Stoff	Konzentration in der Stammlösung (g/•l) (*)	Konzentration im hergestellten Me- dium (mg/•l) (*)	Herstelltes Medium	
				Element	Konzentration (mg/•l) (*)
A1	NaNO_3	26	510	Na; N	190; 84
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12	240	Mg	58,08
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15	290	S	38,22
A3	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7

Stamm- lösung Nr.	Stoff	Konzentration in der Stammlösung (g/•l) (*)	Konzentration im hergestellten Me- dium (mg/•l) (*)	Hergestelltes Medium	
				Element	Konzentration (mg/•l) (*)
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,30	6,0	-	-
	ZnCl ₂	3,3 mg/l	66 µg/l	Zn	31 µg/l
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,4 mg/l	29 µg/l	Co	7,1 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7,3 mg/l	145 µg/l	Mo	58 µg/l
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,012 mg/l	0,24 µg/l	Cu	0,080 µg/l
C	NaHCO ₃	15	300	Na; C	220; 43

(*) Wenn nicht anders angegeben

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

STEINBERG-Medium (nach ISO 20079)

Konzentrationen und Stammlösungen

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

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

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

Tabelle 1

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

Bestandteil		Nährmedium	
Makroelemente	Molmasse	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41

Bestandteil		Nährmedium	
Mikroelemente	Molmasse	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
EDTA-Dinatrium-Dihydrat	372,24	1 500,00	4,03

Tabelle 2

Stammlösungen (Makroelemente)

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

Tabelle 3

Stammlösungen (Mikroelemente)

2. Mikroelemente (1 000fach konzentriert)	mg/l
Stammlösung 4:	
H ₃ BO ₃	120,0
Stammlösung 5:	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
Stammlösung 6:	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0

2. Mikroelemente (1 000fach konzentriert)	mg/l
Stammlösung 7:	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
Stammlösung 8:	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
EDTA-Dinatrium-Dihydrat	1 500,00

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

Herstellung der Endkonzentration des STEINBERG-Mediums (modifiziert)

- Zu 20 ml der Stammlösungen 1, 2 und 3 (siehe Tabelle 2) werden etwa 900 ml entionisiertes Wasser zugegeben, um eine Ausfällung zu vermeiden.
- Von den Stammlösungen 4, 5, 6, 7 und 8 wird jeweils 1,0 ml hinzugegeben (siehe Tabelle 3).
- Der pH-Wert wird durch Zugabe eines minimalen Volumens einer NaOH- oder HCl-Lösung auf $5,5 \pm 0,2$ eingestellt.
- Anschließend werden die Lösungen mit Wasser auf ein Volumen von 1 000 ml aufgefüllt.
- Wenn die Stammlösungen sterilisiert werden und geeignetes Wasser verwendet wird, ist eine weitere Sterilisierung nicht mehr erforderlich. Wird das endgültige Medium sterilisiert, wird nach dem Autoklavieren (20 Minuten bei 121 °C) die Stammlösung 8 hinzugegeben.

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

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

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

„C.31. WACHSTUMSTEST BEI LANDPFLANZEN: UNTERSUCHUNG VON AUFLAUF UND WACHSTUM VON KEIMLINGEN

EINLEITUNG

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

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

2. Mit der Prüfung werden die Wirkungen auf den Saatauflauf und das frühe Wachstum höherer Pflanzen beurteilt, die im Boden (oder in einer sonstigen geeigneten Bodenmatrix) der Prüfchemikalie ausgesetzt waren. Das Saatgut wird mit dem mit der Prüfchemikalie behandelten Boden in Berührung gebracht und gewöhnlich 14 bis 21 Tage nach dem Auflauf von 50 % der Samen in der Kontrollgruppe auf Wirkungen untersucht. Die gemessenen Endpunkte bestehen in der visuellen Beurteilung des Auflaufs, der Ermittlung der Sprossstrockenmasse (alternativ der Sprossfrischmasse) sowie in manchen Fällen der Sprosslänge und in einer Bewertung der sichtbaren schädlichen Wirkungen auf verschiedene Teile der Pflanze. Diese Messungen und Beobachtungen werden mit denen bei unbehandelten Kontrollpflanzen verglichen.
3. Je nach erwartetem Expositionspfad wird die Prüfchemikalie entweder in den Boden (bzw. in eine künstliche Bodenmatrix) eingearbeitet oder auf die Bodenoberfläche aufgebracht, so dass der potenzielle Expositionspfad der Chemikalie angemessen nachgebildet wird. Die Prüfchemikalie wird in die Bodenmasse eingearbeitet. Nach der Einarbeitung wird der Boden in Töpfe gefüllt; anschließend wird das Saatgut der betreffenden Pflanzenarten gesät. Bei der Applikation auf die Oberfläche wird die Chemikalie auf den in die Töpfe eingefüllten Boden ausgebracht, in den bereits die Samen gesät wurden. Danach werden die Versuchseinheiten (Kontrollen und behandelte Böden mit Saatgut) unter Bedingungen gehalten, die die Keimung/das Wachstum der Pflanzen fördern.
4. Je nach Ziel der Untersuchung kann die Prüfung zur Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve oder als Limit-Test mit nur einer Konzentration/Dosierung durchgeführt werden. Wenn die Ergebnisse des Limit-Tests ein bestimmtes Toxizitätsniveau überschreiten (z. B. wenn Wirkungen von mehr als x % beobachtet werden), wird ein Vorversuch zur Bestimmung der Ober- und der Untergrenze der Toxizität durchgeführt. Darauf folgt ein Test mit mehreren Konzentrationen/Dosierungen zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve. Mit einer geeigneten statistischen Analyse werden die wirksame Konzentration EC_x oder die wirksame Dosierung ER_x (z. B. EC_{25} , ER_{25} , EC_{50} , ER_{50}) für die empfindlichsten relevanten Parameter bestimmt. Außerdem können mit diesem Test die höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkung (NOEC) und die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC) berechnet werden.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

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

VALIDITÄT DES TESTS

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

REFERENZCHEMIKALIE

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

BESCHREIBUNG DER METHODE

Naturboden — künstliches Substrat

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

Kriterien für die Auswahl von Arten für die Prüfungen

11. Die ausgewählten Arten müssen in Bezug auf ihre taxonomische Diversität im Pflanzenreich, ihre Verbreitung, ihre Abundanz, die artenspezifischen Lebenszyklusmerkmale und ihren natürlichen Lebensraum ein angemessen breites Spektrum abdecken, um eine entsprechende Reihe von Reaktionen zu ermitteln (8)(10)(16)(17)(18)(19)(20). Bei der Auswahl sind folgende Merkmale der möglicherweise im Test zu verwendenden Arten zu berücksichtigen:
 - die Arten haben einheitliche Samen, die aus zuverlässigen Standardquellen für Saatgut leicht zu beschaffen sind und die regelmäßig, zuverlässig und gleichmäßig keimen; die Keimlinge wachsen einheitlich;
 - die Pflanzen sind für Labortests geeignet und führen zu verlässlichen und reproduzierbaren Ergebnissen innerhalb von Testanlagen sowie in unterschiedlichen Testanlagen;
 - die Empfindlichkeit der geprüften Arten muss sich mit den Reaktionen der Pflanzen decken, die in der durch die jeweilige Chemikalie belasteten Umgebung vorkommen;
 - die Arten wurden in gewissem Umfang bereits in anderen Toxizitätstests verwendet und ihr Verhalten in Herbizid-Bioassays, Schwermetall-Screenings, Tests auf Salz- oder Mineralienbelastung oder in Allelopathie-Untersuchungen deutet auf Empfindlichkeit gegenüber vielfältigen Belastungsfaktoren hin;
 - sie sind mit den Wachstumsbedingungen der Prüfung kompatibel;
 - sie erfüllen die Validitätskriterien der Prüfung.

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

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

Applikation der Prüfchemikalie

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

Einarbeitung in den Boden/in künstliches Substrat

14. In Wasser lösliche oder suspendierbare Chemikalien können in Wasser gegeben werden; anschließend wird die Lösung mithilfe einer geeigneten Mischvorrichtung mit dem Boden vermischt. Dieser Prüfungstyp kommt dann in Betracht, wenn eine Belastung durch die Chemikalie über den Boden oder über im Boden enthaltenes Porenwasser gegeben ist und die Gefahr der Aufnahme über die Wurzeln besteht. Die zugegebene Menge der Prüfchemikalie darf die Wasserhaltekapazität des Bodens nicht überschreiten. Bei allen Testkonzentrationen muss das gleiche Volumen Wasser zugegeben werden, jedoch nur so viel, dass das Bodensubstrat nicht verklumpt.
15. Schlecht wasserlösliche Chemikalien sind in einem geeigneten flüchtigen Lösungsmittel (z. B. Aceton oder Ethanol) aufzulösen und mit Sand zu mischen. Das Lösungsmittel kann dann aus dem Sand abgetrennt werden, indem ein Luftstrom auf den kontinuierlich durchmischten Sand geleitet wird. Der so behandelte Sand wird mit dem für den Versuch vorgesehenen Boden gemischt. Eine zweite Kontrolle wird ausschließlich aus Sand und Lösungsmittel hergestellt. Bei allen Dosierungsstufen und bei der zweiten Kontrolle werden gleiche Mengen Sand, dem zunächst Lösungsmittel beigemischt und dann entzogen wurde, hinzugegeben. Für feste, unlösliche Prüfchemikalien wird trockener Boden in einer geeigneten Mischvorrichtung mit der Chemikalie gemischt. Anschließend wird der Boden in Töpfe gefüllt, und das Saatgut wird umgehend eingesät.
16. Wenn anstelle von Naturboden ein künstliches Substrat verwendet wird, können wasserlösliche Chemikalien unmittelbar vor Beginn des Tests in der Nährlösung aufgelöst werden. Chemikalien, die nicht wasserlöslich sind, aber mit einem Lösungsmittelträger in Wasser suspendiert werden können, sind mit dem Träger zur Nährlösung hinzuzugeben. Nicht wasserlösliche Chemikalien, für die es auch keinen nicht toxischen wasserlöslichen Träger gibt, sind in einem geeigneten flüchtigen Lösungsmittel aufzulösen. Die Lösung wird mit Sand oder Glasperlen gemischt und in einem Vakuum-Rotationstrockner verdampft, so dass eine gleichmäßige Schicht der Chemikalie auf dem Sand oder den Perlen verbleibt. Vor der Befüllung der Töpfe ist eine gewogene Menge der Perlen mithilfe des gleichen organischen Lösungsmittels und der Prüfchemikalie zu extrahieren.

Ausbringung auf die Oberfläche

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

Verifizierung der Konzentration/Dosierung der Prüfchemikalie

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

VERFAHREN

Versuchsaufbau

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

Prüfbedingungen

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

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

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

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

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

Prüfung mit einer einzigen Konzentration/Dosierung

25. Bei der Bestimmung der Konzentration/Dosierung einer Chemikalie zur Durchführung eines Tests mit einer einzigen Konzentration/Dosierung (Challenge- oder Limit-Test) sind eine Reihe von Faktoren zu beachten. Bei allgemeinen Chemikalien gehören dazu die physikalisch-chemischen Eigenschaften der betreffenden Chemikalie. Bei Pflanzenschutzprodukten sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften und die Art der Verwendung der Prüfchemikalie, die maximale Konzentration/Dosierung, die Anzahl der Aufbringungen pro Saison und/oder die Persistenz der Prüfchemikalie zu berücksichtigen. Um festzustellen, ob eine allgemeine Chemikalie phytotoxische Eigenschaften besitzt, kann eine Prüfung mit maximal 1 000 mg/kg trockenem Boden angemessen sein.

Vorversuch

26. Erforderlichenfalls kann ein Vorversuch durchgeführt werden, um die in der definitiven Dosis-Wirkungs-Studie zu testenden Konzentrationen/Dosierungen zu bestimmen. Im Vorversuch sollten die Testkonzentrationen/-dosierungen weit auseinander liegen (z. B. 0,1, 1,0, 10, 100 and 1 000 mg/kg trockener Boden). Im Fall von Pflanzenschutzprodukten kann von der empfohlenen oder maximalen Konzentration oder Dosierung ausgegangen werden (z. B. 1/100, 1/10, 1/1 der empfohlenen/maximalen Konzentration oder Dosierung).

Prüfung mit mehreren Konzentrationen/Dosierungen

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

Beobachtungen

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

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Statistische Analyse*Prüfung mit einer einzigen Konzentration/Dosierung*

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

Prüfung mit mehreren Konzentrationen/Dosierungen

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

Prüfbericht

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

Prüfchemikalie:

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

Im Test verwendete Art:

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

Prüfbedingungen:

- Prüfanlage (z. B. Wachstumskammer, Phytotron und Gewächshaus);
- Beschreibung des Prüfsystems (z. B. Abmessungen der Töpfe, Topfmaterial und Bodenmenge);
- Merkmale des Bodens (Textur oder Typ: Partikelverteilung und Klassifizierung, physikalische und chemische Eigenschaften einschließlich Prozentanteil organischer Materie und organischen Kohlenstoffs sowie pH-Wert);
- Vorbereitung des Bodens/Substrats vor der Prüfung (natürlicher und künstlicher Boden, Sand usw.);
- Beschreibung des Nährmediums, falls verwendet;

- Applikation der Prüfchemikalie: Beschreibung der Applikationsmethode, Beschreibung der Ausrüstung, der Exposition (Dosierung und Volumina) einschließlich chemischer Verifizierung, Beschreibung der Kalibrierungsmethode und der Umgebungsbedingungen während der Applikation;
- Wachstumsbedingungen: Lichtintensität (z. B. photosynthetisch aktive Strahlung), Photoperiode, Temperaturen (max./min.), Bewässerungsplan und -methode, Düngung;
- Anzahl der Samen pro Topf, Anzahl der Pflanzen pro Dosis, Anzahl der Replikate (Töpfe) pro Expositionsrate;
- Typ und Anzahl der Kontrollen (negative und/oder positive Kontrollen sowie Lösungsmittelkontrollen, falls verwendet);
- Dauer der Prüfung.

Ergebnisse:

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

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

LITERATUR

- (1) Schrader, G., Metge, K., und Bahadir, M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. *Applied Soil Ecology*, 7, 189-193.
- (2) Internationale Organisation für Normung (1993). ISO 11269-1. Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora — Teil 1: Verfahren zur Messung der Wurzelwachstumshemmung.
- (3) Internationale Organisation für Normung (1995). ISO 11269-2. Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora — Teil 2: Wirkung von verunreinigten Böden auf Saatauflauf und frühes Wachstum höherer Pflanzen.
- (4) American Standard for Testing Material (ASTM). (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.
- (5) U.S. EPA. (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.
- (6) US EPA. (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:
 - 850.4000: Background — Non-target Plant Testing;
 - 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

- 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);
 - 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;
 - 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;
 - 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.
- (7) AFNOR, X31-201. (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1. (1993) Determination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.
 - (8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Kanada.
 - (9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C., und Zwerger, P. (1997). Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Nichtzielorganismen. Diskussionspapier zur Risikoabschätzung und Risikominimierung für terrestrische Nichtzielorganismen (Flora und Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. Nr. 48.
 - (10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K., und Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario, Kanada.
 - (11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
 - (12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, London, New York, Academic Press, NY, Chapter 5, S. 163-206.
 - (13) Beall, M.L., Jr., und Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.
 - (14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R., und Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.
 - (15) U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 S., FDA, Washington, DC.
 - (16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L., und Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174.
 - (17) Boutin, C.; Elmegaard, N., und Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.
 - (18) Boutin, C., und Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol.9(4):255-271.
 - (19) Boutin, C., und Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.
 - (20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P., und Maguire, R.J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.
 - (21) OECD (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
 - (22) Hatzios, K.K., und Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

-
- (23) Hamill, P.B., Marriage, P.B., und G. Friesen. (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. *Weed Science* 25:386-389.
- (24) Frans, R.E., und Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. *In*: B. Truelove (Ed.) *Research Methods in Weed Science*, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.
- (25) Bruce, R.D., und Versteeg, D. J.(1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 1485-1492.
- (26) Kapitel C.33: Reproduktionstest mit Regenwürmern (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).
-

Anlage 1

Begriffsbestimmungen

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

Chemikalie: ein Stoff oder eine Mischung.

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

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

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

Formulierung: für den Handel hergestelltes Produkt mit dem Wirkstoff; auch als Endpräparat⁽¹⁾ oder für den typischen Verwendungszweck bestimmtes Endprodukt bezeichnet.

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

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

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

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

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

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

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

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

Anlage 2

Liste der Üblicherweise für Pflanzentests verwendeten Arten

Familie	Art	Gewöhnliche Bezeichnung
DICOTYLEDONAE		
Apiaceae (Umbelliferae)	<i>Daucus carota</i>	Möhre
Asteraceae (Compositae)	<i>Helianthus annuus</i>	Sonnenblume
Asteraceae (Compositae)	<i>Lactuca sativa</i>	Gartensalat
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Sinapis alba</i>	Weißer Senf
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i>	Chinakohl
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica napus</i>	Raps
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	Kohl
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Brassica rapa</i>	Rübsen
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Lepidium sativum</i>	Gartenkresse
Brassicaceae (Cruciferae)	<i>Raphanus sativus</i>	Rettich
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Rübe
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Gurke
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Glycine max</i> (<i>G. soja</i>)	Sojabohne
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus aureus</i>	Mungobohne
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gartenbohne
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Pisum sativum</i>	Erbse
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Bockshornklee
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Lotus corniculatus</i>	Gewöhnlicher Hornklee
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Trifolium pratense</i>	Wiesenklee
Fabaceae (Leguminosae)	<i>Vicia sativa</i>	Futterwicke
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i>	Flachs
Polygonaceae	<i>Fagopyrum esculentum</i>	Buchweizen
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicon</i>	Tomate

Familie	Art	Gewöhnliche Bezeichnung
MONOCOTYLEDONAE		
Liliaceae (Amaryllidaceae)	<i>Allium cepa</i>	Zwiebel
Poaceae (Gramineae)	<i>Avena sativa</i>	Hafer
Poaceae (Gramineae)	<i>Hordeum vulgare</i>	Gerste
Poaceae (Gramineae)	<i>Lolium perenne</i>	Deutsches Weidelgras
Poaceae (Gramineae)	<i>Oryza sativa</i>	Reis
Poaceae (Gramineae)	<i>Secale cereale</i>	Roggen
Poaceae (Gramineae)	<i>Sorghum bicolor</i>	Körner-Sorghum, Mohrenhirse
Poaceae (Gramineae)	<i>Triticum aestivum</i>	Weichweizen
Poaceae (Gramineae)	<i>Zea mays</i>	Mais

Liste potenzieller Nichtkulturpflanzen

OECD-Liste potenzieller Arten für Toxizitätsprüfungen an Pflanzen

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

FAMILIE Botanischer Name der Art (gemeiner deutscher Name)	Lebensdauer (1) und Lebensraum	Samengewicht (mg)	Photoperiode für Keimung oder Wachstum (2)	Saattiefe (mm) (3)	Keimzeit (Tage) (4)	Spezialbehandlungen (5)	Toxizitätstest (6)	Saatgut-Anbieter (7)	Sonstige Literatur (8)
APIACEAE <i>Torilis japonica</i> (Gewöhnlicher Klettenkerbel)	A, B gestörte Flächen, Hecken, Weiden (16, 19)	1,7 – 1,9 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	5 (50 %) (19)	Stratifikation (Kälte) (7, 14, 18, 19); unter Umständen ist eine Reifung erforderlich (19); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1, 19); keine Spezialbehandlungen (5)	NACH (5)		
ASTERACEAE <i>Bellis perennis</i> (Gänseblümchen)	P Grasflächen, Äcker, Rasen (16, 19)	0,09-0,17 (4, 19)	L = D (14)	0 (4)	3 (50 %) (19) 11 (100 %) (18)	Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (18, 19); keine Spezialbehandlungen (4, 14)	NACH (4)	A, D, F	7
<i>Centaurea cyanus</i> (Kornblume)	A Felder, Straßenränder, offene Lebensräume (16)	4,1-4,9 (4, 14)	L = D (14)	0-3 (2, 4, 14)	14-21 (100 %) (14)	keine Spezialbehandlungen (2, 4)	NACH (2,4)	A, D, E, F	7
<i>Centaurea nigra</i> (Schwarze Flockenblume)	P Felder, Straßenränder, offene Lebensräume (16, 19)	2,4-2,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3 (50 %) (19) 4 (97 %) (18)	Reifung kann erforderlich sein (18, 19); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (19); keine Spezialbehandlungen (5, 14, 26)	NACH (5, 22, 26)	a	
<i>Inula helenium</i> Alant	P feuchte, gestörte Standorte (16)	1 – 1,3 (4, 14, 29)		0 (4, 29)		keine Spezialbehandlungen (4)	NACH (4)	A, F	

FAMILIE Botanischer Name der Art (gemeiner deutscher Name)	Lebensdauer ⁽¹⁾ und Lebensraum	Samengewicht (mg)	Photoperiode für Keimung oder Wachstum ⁽²⁾	Saattiefe (mm) ⁽³⁾	Keimzeit (Tage) ⁽⁴⁾	Spezialbehandlungen ⁽⁵⁾	Toxizitätstest ⁽⁶⁾	Saatgut-Anbieter ⁽⁷⁾	Sonstige Literatur ⁽⁸⁾
<i>Leontodon hispidus</i> (Steifhaariger Löwenzahn)	P Felder, Straßenränder, gestörte Flächen (16, 19)	0,85 -1,2 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18)	Keimung durch Bestrahlung gehemmt (17, 18, 19); keine Spezialbehandlungen (5, 23)	NACH (5, 22, 23)		
<i>Rudbeckia hirta</i> (Rudbeckie)	B, P gestört (16)	0,3 (4, 14)	L = D (14)	0 (4, 33)	< 10 (100 %) (33)	keine Spezialbehandlungen (4, 14, 33)	NACH (4, 33)	C, D, E, F	
<i>Solidago canadensis</i> Kanadische Goldrute	P Weiden, offene Flächen (16)	0,06-0,08 (4, 14)	L = D (11)	0 (4)	14-21 (11)	zu gleichen Teilen mit Sand mischen und 24 h in 500 ppm GA einweichen (11); keine Spezialbehandlungen (4)	NACH (4)	E, F	
<i>Xanthium pensylvanicum</i> (Spitzklette)	A Felder, offene Lebensräume (16)	25-61 (14, 29)		0(1) 5(29)		Keimung kann durch Dunkelheit gehemmt werden (1); 12 h in warmem Wasser einweichen (29)	VOR UND NACH (31)	a	
<i>Xanthium spinosum</i> (Dornige Spitzklette)	A offene Lebensräume (16)	200 (14)	L = D (14) L > D (6)	10 (6)		Skarifikation (14); keine Spezialbehandlungen (6)	VOR UND NACH (6)	a	
<i>Xanthium strumarium</i> (Gewöhnliche Spitzklette)	A Felder, offene Lebensräume (16)	67,4 (14)	L = D (14)	10-20 (6, 21)		keine Spezialbehandlungen (6, 14, 21)	VOR UND NACH (6, 21, 28, 31)	a	

FAMILIE Botanischer Name der Art (gemeiner deutscher Name)	Lebensdauer ⁽¹⁾ und Lebensraum	Samengewicht (mg)	Photoperiode für Keimung oder Wachstum ⁽²⁾	Saattiefe (mm) ⁽³⁾	Keimzeit (Tage) ⁽⁴⁾	Spezialbehandlungen ⁽⁵⁾	Toxizitätstest ⁽⁶⁾	Saatgut-Anbieter ⁽⁷⁾	Sonstige Literatur ⁽⁸⁾
BRASSICACEAE <i>Cardamine pratensis</i> (Wiesenschaumkraut)	P Felder, Straßenränder, Rasen (16, 19)	0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18)	Keimung durch Bestrahlung gehemmt (18, 19); keine Spezialbehandlungen (5, 14, 22)	NACH (5, 22)	F	
CARYOPHYLLACEAE <i>Lychnis flos-cuculi</i> (Kuckucks-Lichtnelke)	P (16)	0,21 (14)	L = D (14)		< 14 (100 %) (14, 25)	Reifung kann erforderlich sein (18); keine Spezialbehandlungen (5, 14, 15, 22-26)	NACH (5, 15, 22-26)	F	
Chenopodiaceae <i>Chenopodium album</i> (Weißer Gänsefuß)	a Feldränder, gestörte Flächen (16, 19)	0,7-1,5 (14, 19, 34)	L = D (14)	0 (1, 19)	2 (50 %) (19)	Behandlung je nach Farbe der Samen unterschiedlich (19); trockene Keimruhe (19); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1, 18, 19); Stratifikation (Kälte) (18); keine Spezialbehandlungen (14, 34)	VOR UND NACH (28, 31, 34)	a	32
CLUSIACEAE <i>Hypericum perforatum</i> (Echtes Johanniskraut)	P Felder, Äcker, offene Lebensräume (16, 19)	0,1-0,23 (14, 19)	L = D (14)	0 (1, 19)	3 (19) 11 (90 %) (18)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1, 18, 19) keine Spezialbehandlungen (5, 14, 15, 25, 27)	NACH (5, 15, 25, 27)	A, E, F	
CONVOLVULACEAE <i>Ipomoea hederacea</i> (Efeu-Prunkwinde)	a Straßenränder, offene Lebensräume, Maisfelder (16)	28,2 (14)	L > D (6, 10)	10-20 (6, 10, 21)	4 (100 %) (10)	Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1) keine Spezialbehandlungen (6, 21)	VOR UND NACH (6, 12, 21, 28)	a	
CYPERACEAE <i>Cyperus rotundus</i> (Knolliges Zypergras)	P Äcker, Weiden, Straßenränder (16, 30)	0,2 (14)	L = D (14)	0 (1) 10-20 (6, 10)	12 (91 %) (10)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1) keine Spezialbehandlungen (6, 10, 14)	VOR UND NACH (6, 28, 31)	B	7

FAMILIE Botanischer Name der Art (gemeiner deutscher Name)	Lebensdauer ⁽¹⁾ und Lebensraum	Samengewicht (mg)	Photoperiode für Keimung oder Wachstum ⁽²⁾	Saattiefe (mm) ⁽³⁾	Keimzeit (Tage) ⁽⁴⁾	Spezialbehandlungen ⁽⁵⁾	Toxizitätstest ⁽⁶⁾	Saatgut-Anbieter ⁽⁷⁾	Sonstige Literatur ⁽⁸⁾
FABACEAE <i>Lotus corniculatus</i> (Gewöhnlicher Hornklee)	P Grasflächen, Straßenränder, offene Lebensräume (16, 19)	1-1,67 (14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	Skarifikation (14, 19) Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (18, 19); keine Spezialbehandlungen (23, 25)	NACH (5, 23, 25)	A, D, E, F	
<i>Senna obtusifolia</i> (Senna)	A feuchte Wälder (16)	23-28 (9)	L = D (14) L > D (9)	10-20 (6,9)		Samen 24 h in Wasser einweichen (9) Skarifikation (14); je nach Farbe unterschiedliche Lebensfähigkeit der Samen (1); keine Spezialbehandlungen (6)	NACH (6,9)	a	
<i>Sesbania exaltata</i> (Hanf)	A Schwemmboden (16)	11-13 (9, 14)	L > D (9)	10-20 (9, 21)		Samen 24 h in Wasser einweichen (9) Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1); keine Spezialbehandlungen (21)	VOR UND NACH (9, 21, 28, 31)	a	
<i>Trifolium pratense</i> (Wiesenklee)	P Felder, Straßenränder, Äcker (16, 19)	1,4-1,7 (14, 19)	L= D (14)		1 (50 %) (19)	Skarifikation (14, 18) unter Umständen Reifung erforderlich (19); Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1, 19); keine Spezialbehandlungen (5)	NACH (5)	A, E, F	
LAMIACEAE <i>Leonurus cardiaca</i> (Echtes Herzgespann)	P offene Flächen (16)	0,75-1,0 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		keine Spezialbehandlungen (4, 14)	NACH (4)	F	
<i>Mentha spicata</i> (Grüne Minze)	P feuchte Gebiete (16)	2,21 (4)		0 (4)		keine Spezialbehandlungen (4)	NACH (4)	F	

FAMILIE Botanischer Name der Art (gemeiner deutscher Name)	Lebensdauer ⁽¹⁾ und Lebensraum	Samengewicht (mg)	Photoperiode für Keimung oder Wachstum ⁽²⁾	Saattiefe (mm) ⁽³⁾	Keimzeit (Tage) ⁽⁴⁾	Spezialbehandlungen ⁽⁵⁾	Toxizitätstest ⁽⁶⁾	Saatgut-Anbieter ⁽⁷⁾	Sonstige Literatur ⁽⁸⁾
<i>Nepeta cataria</i> (Echte Katzenminze)	P gestörte Flächen (16)	0,54 (4, 14)	L= D (14)	0 (4)		keine Spezialbehandlungen (2, 4, 14)	NACH (2,4)	F	
<i>Prunella vulgaris</i> (Gewöhnliche Braunelle)	P Äcker, Grasflächen, gestörte Standorte (16, 19)	0,58 -1,2 (4, 14, 19)	L= D (14)	0 (4, 19)	5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (18, 19) stärkere Keimung bei größeren Samen (1); keine Spezialbehandlungen (4, 14, 22)	NACH (4, 22)	A, F	
<i>Stachys officinalis</i> (Echte Betonie)	P Grasflächen, Feldränder (19)	14-18 (14, 19)	L= D (14)		7 (50 %) (19)	keine Spezialbehandlungen (5, 14, 22)	NACH (5, 22)	F	
MALVACEAE <i>Abutilon theophrasti</i> (Europäische Samtpappel)	A Felder, offene Lebensräume (16)	8,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 10, 21)	4 (84 %) (10)	Skarifikation (14) keine Spezialbehandlungen (5, 10, 21)	VOR UND NACH (6, 22, 28, 31)	A, F	
<i>Sida spinosa</i> Sida spinosa	a Felder, Straßenränder (16)	3,8 (14)	L= D (14)	10-20 (6, 21)		Skarifikation (14) Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1); keine Spezialbehandlungen (6, 21)	VOR UND NACH (6, 21, 28, 31)	A, F	
PAPAVERACEAE <i>Papaver rhoeas</i> (Klatschmohn)	a Felder, Äcker, gestörte Standorte (16, 19)	0,1 -0,3 (4, 14, 19, 29)	L= D (14)	0 (4, 29)	4 (50 %) (19)	Stratifikation (Kälte) und Skarifikation (1, 19, 32) keine Spezialbehandlungen (4, 14, 29)	NACH (4)	A, D, E, F, G	

FAMILIE Botanischer Name der Art (gemeiner deutscher Name)	Lebensdauer ⁽¹⁾ und Lebensraum	Samengewicht (mg)	Photoperiode für Keimung oder Wachstum ⁽²⁾	Saattiefe (mm) ⁽³⁾	Keimzeit (Tage) ⁽⁴⁾	Spezialbehandlungen ⁽⁵⁾	Toxizitätstest ⁽⁶⁾	Saatgut-Anbieter ⁽⁷⁾	Sonstige Literatur ⁽⁸⁾
POACEAE <i>Agrostis tenuis</i> (Rotes Straußgras)	Rasen, Weiden (16)	0,07 (14)	L > D (10)	20 (10)	10 (62 %) (10)	Keimung durch Bestrahlung gehemmt (1, 17-19); keine Spezialbehandlungen (10)	NACH (10)	A, E	
<i>Alopecurus myosuroides</i> (Acker-Fuchsschwanzgras)	A Felder, offene Lebensräume (16)	0,9-1,6 (29, 34)	L = D (14)	2 (29)	< 24 (30 %) (34)	Skarifikation (14); Behandlung mit 101 mg/l KNO ₃ (14); Stratifikation (Wärme) (1) Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1); keine Spezialbehandlungen (34)	VOR UND NACH (28, 34)	a	32
<i>Avena fatua</i> (Flughäfer)	A Anbaugelände, offene Lebensräume (16)	7-37,5 (14, 30)	L = D (14) L > D (6)	10-20 (6, 10)	3 (70 %) (18)	Skarifikation (7, 32); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1) Stratifikation (Kälte) (1, 18); keine Spezialbehandlungen (6, 10, 14)	VOR UND NACH (6, 10, 28, 31)	a	
<i>Bromus tectorum</i> (Dach-Trespe)	A Felder, Straßenränder, Äcker (16)	0,45-2,28 (14, 29)	L = D (14)	3 (29)		Reifungsperiode (1, 7, 32); Keimung durch Licht gehemmt (1); keine Spezialbehandlungen (14)	VOR UND NACH (28, 31)	a	
<i>Cynosurus cristatus</i> (Kammgras)	P Felder, Straßenränder, offene Lebensräume (16, 19)	0,5-0,7 (14, 19, 29)	L = D (14)	0 (29)	3 (50 %) (19)	Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (19); keine Spezialbehandlungen (14, 29)	NACH (5)	a	

FAMILIE Botanischer Name der Art (gemeiner deutscher Name)	Lebensdauer ⁽¹⁾ und Lebensraum	Samengewicht (mg)	Photoperiode für Keimung oder Wachstum ⁽²⁾	Saattiefe (mm) ⁽³⁾	Keimzeit (Tage) ⁽⁴⁾	Spezialbehandlungen ⁽⁵⁾	Toxizitätstest ⁽⁶⁾	Saatgut-Anbieter ⁽⁷⁾	Sonstige Literatur ⁽⁸⁾
<i>Digitaria sanguinalis</i> (Blutrote Fingerhirse)	A Felder, Rasen, offene Lebensräume (16)	0,52-0,6 (14, 30)	L = D (14)	10-20 (21)	7 (75 %) 14 (94 %) (7)	Skarifikation, Stratifikation (Kälte) und Reifung (1, 7, 14, 32); Behandlung mit 101 mg/l KNO ₃ (14); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1); keine Spezialbehandlungen (21)	VOR UND NACH (18, 25, 31)	a	
<i>Echinochloa crusgalli</i> (Hühnerhirse)	A (16)	1,5 (14)	L = D (14) L > D (3)	10-20 (7, 21)		Skarifikation (7, 32); Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1); keine Spezialbehandlungen (3, 14, 21)	VOR UND NACH (3, 21, 28, 31)	a	
<i>Elymus canadensis</i> (Kanada-Quecke)	P Uferzonen, gestörte Standorte (16)	4-5 (14, 30)	L = D (11)	1 (11)	14-28 (11)	keine Spezialbehandlungen (2, 11)	NACH (2)	C, D, E	
<i>Festuca pratensis</i> (Wiesenschwingel)	P Felder, feuchte Gebiete (16, 19)	1,53-2,2 (16, 19)	L = D (14) L > D (10)	20 (10)	9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19)	keine Spezialbehandlungen (10, 19)	NACH (10)	a	7
<i>Hordeum pusillum</i> (Gerste)	A Weiden, Straßenränder, offene Lebensräume (16)	3,28 (14)				Stratifikation (Wärme) (1); Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1)	VOR (31)		7
<i>Phleum pratense</i> (Wiesenschneggras)	P Weiden, Äcker, gestörte Standorte (16, 19)	0,45 (14, 19)	L > D (10, 14)	0-10 (10, 19)	2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (19); Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (17); keine Spezialbehandlungen (10, 14, 17, 19)	NACH (10)	A, E	

FAMILIE Botanischer Name der Art (gemeiner deutscher Name)	Lebensdauer ⁽¹⁾ und Lebensraum	Samengewicht (mg)	Photoperiode für Keimung oder Wachstum ⁽²⁾	Saattiefe (mm) ⁽³⁾	Keimzeit (Tage) ⁽⁴⁾	Spezialbehandlungen ⁽⁵⁾	Toxizitätstest ⁽⁶⁾	Saatgut-Anbieter ⁽⁷⁾	Sonstige Literatur ⁽⁸⁾
POLYGONACEAE <i>Polygonum convolvulus</i> (Windenknöterich)	A offene Lebensräume, Straßenränder (16)	5-8 (4, 14, 29)	L = D (20)	0-2 (4, 29)		Stratifikation (Kälte) über 4-8 Wochen (1, 2, 4, 20, 29); Keimung durch Bestrahlung nicht gehemmt (1)	VOR UND NACH (1, 2, 20, 28, 31)	a	32
<i>Polygonum lapathifolium</i> (Ampfer-Knöterich)	A feuchter Boden (16)	1,8-2,5 (14)	L > D (6)		5 (94 %) (18)	Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (1); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (18); Stratifikation (Kälte) (1); keine Spezialbehandlungen (5)	VOR UND NACH (6)	A, E	
<i>Polygonum pennsylvanicum</i> (Vogelknöterich)	A Felder, offene Lebensräume (16)	3,6-7 (14, 29)		2 (29)		Stratifikation (Kälte) über 4 Wochen bei 0-5 °C (1, 29); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1)	VOR (31)	A, E	
<i>Polygonum periscaria</i> (Floh-Knöterich)	A gestörte Flächen, Äcker (16, 19)	2,1 -2,3 (14, 19)	L > D (13)	0 (19)	< 14 (13) 2 (50 %) (19)	Skarifikation, Stratifikation (Kälte), Behandlung mit GA (14); Stratifikation (Kälte), Reifung (17-19); Keimung durch Dunkelheit gehemmt (19); keine Spezialbehandlungen (13)	NACH (13)	a	32
<i>Rumex crispus</i> (Krauser Ampfer)	P Äcker, Straßenränder, offene Flächen (16, 19)	1,3-1,5 (4, 14, 19)	L = D (14, 33)	0 (4, 19, 33)	3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (18, 19); Reifung kann erforderlich sein (18); keine Spezialbehandlungen (4, 14, 33)	NACH (4, 33)	A, E	32

FAMILIE Botanischer Name der Art (gemeiner deutscher Name)	Lebensdauer (1) und Lebensraum	Samengewicht (mg)	Photoperiode für Keimung oder Wachstum (2)	Saattiefe (mm) (3)	Keimzeit (Tage) (4)	Spezialbehandlungen (5)	Toxizitätstest (6)	Saatgut-Anbieter (7)	Sonstige Literatur (8)
PRIMULACEAE <i>Anagallis arvensis</i> (Acker-Gauchheil)	A Äcker, Grasflächen, gestörte Standorte (16, 19)	0,4-0,5 (4, 14, 19)	L = D (14)		1 (50 %) (19)	Stratifikation (Kälte), Behandlung mit GA (1,14, 18, 19, 32); Licht zur Keimung erforderlich (1); keine Spezialbehandlungen (2, 4)	NACH (2,4)	A, F	
RANUNCULACEAE <i>Ranunculus acris</i> (Scharfer Hahnenfuß)	P Äcker, Straßenränder, offene Flächen (16, 19)	1,5-2 (14, 19, 29)	L = D (14)	1 (29)	41 -56 (19, 29)	keine Spezialbehandlungen (5, 14, 22, 24 -26)	NACH (5, 22, 24-26)		32
ROSACEAE <i>Geum urbanum</i> (Echte Nelkenwurz)	P Hecken, feuchte Gebiete (16, 19)	0,8-1,5 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (18, 19); Stratifikation (Wärme) (1); keine Spezialbehandlungen (5, 14, 22, 25, 26)	NACH (5, 22, 25, 26)	a	
RUBIACEAE <i>Galium aparine</i> (Kletten-Labkraut)	a Äcker, feuchte Gebiete, gestörte Standorte (16, 19)	7-9 (14, 19)	L = D (14)		5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18)	Stratifikation (Kälte) (1, 18, 19); Keimung durch Bestrahlung nicht beeinträchtigt (18, 19); Keimung durch Licht gehemmt (1); keine Spezialbehandlungen (6, 14)	VOR UND NACH (6, 28)	a	32
<i>Galium mollugo</i> (Wiesen-Labkraut)	P Wallhecken, offene Flächen (8)	7 (29)	L = D (14)	2 (29)		keine Spezialbehandlungen (5, 14, 22, 24, 26, 29)	NACH (5, 22, 24, 26)	a	
SCROPHULARIACEAE <i>Digitalis purpurea</i> (Roter Fingerhut)	B, P Hecken, offene Flächen (16, 19)	0,1-0,6 (4, 14, 19)	L = D (14)	0 (4, 19)	6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (1, 17-19); keine Spezialbehandlungen (4, -26, 22)	NACH (4, 22-26)	D, G, F	

FAMILIE Botanischer Name der Art (gemeiner deutscher Name)	Lebensdauer ⁽¹⁾ und Lebensraum	Samengewicht (mg)	Photoperiode für Keimung oder Wachstum ⁽²⁾	Saattiefe (mm) ⁽³⁾	Keimzeit (Tage) ⁽⁴⁾	Spezialbehandlungen ⁽⁵⁾	Toxizitätstest ⁽⁶⁾	Saatgut-Anbieter ⁽⁷⁾	Sonstige Literatur ⁽⁸⁾
<i>Veronica persica</i> (Persischer Ehrenpreis)	A Äcker, Grasflächen, gestörte Standorte (16, 19)	0,5-0,6 (14, 19)	L = D (14)	0 (19)	3(19) 5 (96 %) (18)	Keimung durch Dunkelheit gehemmt (18, 19); Stratifikation (Kälte) (18); keine Spezialbehandlungen (14)	VOR UND NACH (28)	a	32

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

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

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

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

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

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

⁽⁷⁾ Beispiele gewerblicher Saatgutanbieter.

⁽⁸⁾ Zwei alternative Quellen, die ebenfalls berücksichtigt wurden.

Genannte Saatgutanbieter

Anbieter	Anbieterinformationen
A	Herbiseed New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ, ENGLAND +44 1189 349 464 www.herbiseed.com
B	Tropilab Inc. 8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948, USA +1 727 344 — 4050 www.tropilab.com
C	Pterophylla — Native Plants & Seeds #316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON NOE 1X0, KANADA +1 519 586 — 3985
D	Applewood Seed Co. 5380 Vivian St., Arvada, CO 80002, USA +1 303 431 — 7333 www.applewoodseed.com
E	Ernst Conservation Seeds 9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335, USA +1 800 873 — 3321 www.ernstseed.com
F	Chiltern Seeds Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB, ENGLAND +44 1229 581137 www.chilternseeds.co.uk
G	Thompson & Morgan P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7, KANADA +1 800 274 — 7333 www.thompson-morgan.com

LITERATUR

- (1) Baskin, C.C., und Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto
- (2) Blackburn, L.G., und Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). *Ecotoxicology*, 12:271-285.
- (3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., und Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 19(10):2532-2541.
- (4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. *Ecotoxicology*, 13:349-369.
- (5) Breeze, V., Thomas, G., und Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. *Annals of Applied Biology*, 121:669-677.
- (6) Brown, R.A., und Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: *Plants for toxicity assessment: 2nd volume*. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W. Wang, und M.A. Lewis, Hrsg. American Society for Testing & Materials, Philadelphia. S. 197-208.

- (7) Buhler, D.D., und Hoffman, M.L., 1999. *Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants*. Weed Science Society of America, Lawrence, K.
- (8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., und Warburg, E.F. 1981. *Excursion flora of the British Isles*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge
- (9) Clay, P.A., und Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. *Weed Science*, 48:481-486.
- (10) Cole, J.F.H., und Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. *BCPC — Weeds*. S. 151-156.
- (11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Personal communication. (www.ernstseed.com)
- (12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., und McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 9:769-776.
- (13) Fletcher, J.S., Pflieger, T.G., Ratsch, H.C., und Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 15 (7):1189-1196.
- (14) Flynn, S., Turner, R.M., und Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgekew.org.uk/data/sid)
- (15) Franzaring, J., Kempenaar, C., und van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. *Environmental Pollution*, 114:21-28.
- (16) Gleason, H.A., und Cronquist, A. 1991. *Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada*, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY
- (17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. *Annals of Applied Biology*, 98:555-558.
- (18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., und Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. *Journal of Ecology*, 69:1017-1059.
- (19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., und Hunt, R. 1988. *Comparative plant ecology: a functional approach to common British species*. Unwin Hyman Ltd., London
- (20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (*Polygonum convolvulus* L.). *Weed Research*, 34:453-459.
- (21) Klingaman, T.E., King, C.A., und Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. *Weed Science*, 40:227-232.
- (22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., und Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. *Environmental Pollution*, 59:71-86.
- (23) Marrs, R.H., Frost, A.J., und Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. *Environmental Pollution*, 69:223-235.
- (24) Marrs, R.H., Frost, A.J., und Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. *Environmental Pollution*, 73:25-42.
- (25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., und Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. *Agriculture, Ecosystems, & Environment*, 45:283-293.

- (26) Marrs, R.H., und Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. *Journal of Environmental Management*, 50:369-388.
 - (27) Marshall, E.J.P. und Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. *BCPC — Weeds*. S. 1021-1028.
 - (28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., und Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. *Pest Management Science*, 58:1161-1174.
 - (29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Personal communication. (<http://www.herbiseed.com>)
 - (30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA
 - (31) USEPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].
 - (32) Webster, R.H. 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.
 - (33) White, A. L., und Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Persönliche Auskunft.
 - (34) Zwerger, P., und Pestemer, W., 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. *Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh.*, 17:711-718.
-

Anlage 4

Beispiele für geeignete Wachstumsbedingungen für bestimmte Pflanzenarten

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

Kohlendioxid-Konzentration: 350 ± 50 ppm;

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

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

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

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

Die Kulturpflanzenarten sind:

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

C.32. ENCHYTRAEEN-REPRODUKTIONSTEST

EINLEITUNG

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

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

2. Bodenbewohnende Anneliden der Gattung *Enchytraeus* sind ökologisch relevante Arten für Ökotoxizitätssprüfungen. Enchytraeen kommen zwar häufig in Böden vor, in denen auch Regenwürmer leben; bei vielen Böden treten sie aber auch dann in großer Anzahl auf, wenn keine Regenwürmer vorkommen. Enchytraeen können sowohl in Labortests als auch in Halbfreiland- und in Freilandtests verwendet werden. Aus praktischer Sicht ist festzustellen, dass viele *Enchytraeus*-Arten leicht zu handhaben und zu züchten sind; außerdem ist ihre Regenerationszeit erheblich kürzer als die von Regenwürmern. Ein Reproduktionstest mit Enchytraeen dauert nur 4 bis 6 Wochen (gegenüber 8 Wochen bei Regenwürmern (*Eisenia fetida*)).
3. Allgemeine Informationen zur Ökologie und zur Ökotoxikologie von Enchytraeen in der terrestrischen Umwelt sind den Quellen (9), (10), (11) und (12) zu entnehmen.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

4. Adulte Enchytraeen werden verschiedenen Konzentrationen der in künstlichen Boden eingemischten Prüfchemikalie ausgesetzt. Die Prüfung kann in zwei Schritte unterteilt werden: a) einen Vorversuch zur Feststellung des geeigneten Konzentrationsbereichs (falls keine hinreichenden Informationen verfügbar sind), in dem die Mortalität nach zweiwöchiger Exposition als wesentlicher Endpunkt beurteilt wird, und b) einen definitiven Reproduktionstest, bei dem die Gesamtzahl an juvenilen Tieren eines Elterntiers und das Überleben der Elterntiere bewertet werden. Der definitive Test dauert sechs Wochen. Nach den ersten drei Wochen werden die adulten Würmer herausgenommen und die morphologischen Änderungen protokolliert. Nach weiteren drei Wochen werden die juvenilen Tiere gezählt, die aus den von den adulten Tieren hergestellten Kokons geschlüpft sind. Die Reproduktionsleistung der Tiere, die der Prüfchemikalie ausgesetzt waren, wird mit der Reproduktionsleistung der Kontrollgruppe(n) verglichen, um i) die NOEC (höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete schädliche Wirkung) und/oder ii) mit dem EC_x -Wert (z. B. EC_{10} oder EC_{50}) (mithilfe eines Regressionsmodells) die Konzentration zu ermitteln, bei der die Reproduktionsleistung um x % reduziert wird. Die Testkonzentrationen müssen den EC_x -Bereich einschließen (z. B. EC_{10} und EC_{50}), damit der EC_x -Wert durch Interpolation anstelle einer Extrapolation ermittelt werden kann.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

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

VALIDITÄT DES TESTS

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

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

REFERENZCHEMIKALIE

8. Eine Referenzchemikalie ist entweder regelmäßig zu prüfen oder in jeden einzelnen Test mit einzubeziehen, um sicherzustellen, dass sich die Reaktion der Testorganismen im Laufe der Zeit nicht signifikant geändert hat. Eine geeignete Referenzchemikalie ist Carbendazim, für das gezeigt wurde, dass es die Lebens- und Reproduktionsfähigkeit von Enchytraeen beeinträchtigt (13)(14); außerdem können Chemikalien mit gut bekannten Toxizitätsdaten verwendet werden. AgrEvo Company (Frankfurt, Deutschland) bietet unter dem Handelsnamen Derosal™ eine Carbendazim-Formulierung mit einem Wirkstoffanteil von 360 g/l (32,18 %) an. Diese Formulierung wurde in einem Ringtest verwendet (2). Der im Ringtest ermittelte EC₅₀-Wert der Reproduktionsleistung lag bei 1,2 ± 0,8 mg Wirkstoff/kg Trockenmasse (2). Wenn ein positiver toxischer Standard in die Testreihe aufgenommen wird, ist eine einzige Konzentration zu verwenden, und die Anzahl der Replikate muss mit der Anzahl der Kontrollen übereinstimmen. Bei Carbendazim wird die Prüfung von 1,2 mg Wirkstoff/kg Trockenmasse (getestet in einer flüssigen Formulierung) empfohlen.

BESCHREIBUNG DES TESTS

Ausrüstung

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

Herstellung des künstlichen Bodens

11. In diesem Test wird künstlicher Boden (5)(7) mit folgender Zusammensetzung verwendet (bezogen auf Trockenmassen, bei 105 °C bis zur Massekonstanz getrocknet):
 - 10 % Sphagnum-Torf, luftgetrocknet und fein gemahlen (eine Partikelgröße von 2 ± 1 mm ist akzeptabel); vor der Verwendung in einem Test sollte sichergestellt werden, dass mit einer frischen Torf-Charge hergestellter Boden für die Zucht der Würmer geeignet ist;
 - 20 % Kaolin-Ton (Kaolinit-Anteil vorzugsweise über 30 %);

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

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

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

12. Die trockenen Bestandteile des Bodens werden gründlich gemischt (z. B. in einem großen Labormischer). Der Mischvorgang wird mindestens eine Woche vor Prüfbeginn durchgeführt. Der gemischte Boden muss zwei Tage ruhen, damit sich der Säurepegel ausgleichen/stabilisieren kann. Zur Bestimmung des pH-Werts wird eine Mischung aus Boden und einer 1 M Kaliumchlorid- (KCl) oder einer 0,01 M Calciumchloridlösung (CaCl_2) im Verhältnis 1:5 verwendet (siehe (16) und Anlage 3). Wenn der Säuregrad des Bodens außerhalb des spezifizierten Bereichs liegt (siehe Nummer 11), kann der pH-Wert durch Zugabe einer geeigneten Menge CaCO_3 eingestellt werden. Ist der Boden zu alkalisch, kann der pH-Wert durch Zugabe eines größeren Anteils des Gemischs (siehe Nummer 11) ohne CaCO_3 eingestellt werden.
13. Die maximale Wasserhaltekapazität des künstlichen Bodens wird mit den in Anlage 2 beschriebenen Verfahren ermittelt. Ein oder zwei Tage vor Beginn des Tests wird der trockene künstliche Boden mit so viel entionisiertem Wasser befeuchtet, dass etwa die Hälfte des endgültigen Wassergehalts erreicht wird (40-60 % der maximalen Wasserhaltekapazität). Zu Beginn des Tests wird der befeuchtete Boden entsprechend der Anzahl der im Test zu verwendenden Testkonzentrationen (sowie gegebenenfalls der Referenzchemikalie) und Kontrollen aufgeteilt. Der Feuchtegehalt wird auf 40-60 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt, indem die Lösung mit der Prüfchemikalie und/oder destilliertes oder entionisiertes Wasser hinzugegeben wird (siehe Nummern 19, 20 und 21). Der Feuchtegehalt wird zu Beginn und am Ende des Tests ermittelt (durch Trocknen bei 105 °C bis zur Massekonstanz) und sollte im optimalen Bereich für die Lebensfähigkeit der Würmer liegen. Für eine grobe Prüfung des Feuchtegehalts des Bodens kann der Boden vorsichtig in der Hand gedrückt werden; bei richtigem Feuchtegehalt sollten Wassertröpfchen zwischen den Fingern austreten.

Auswahl und Vorbereitung der Versuchstiere

14. Die empfohlene Art für den Test ist *Enchytraeus albidus* (Henle 1837, weißer Topfwurm), ein Mitglied der Familie *Enchytraeidae* (Ordnung *Oligochaeta*, Stamm *Annelida*). *E. albidus* ist eine der größten Enchytraeen-Arten; bei einzelnen Exemplaren wurde eine Länge von bis zu 35 mm gemessen (17)(18). *E. albidus* ist weltweit in marinen, limnischen und terrestrischen Habitaten zu finden, hauptsächlich in faulem organischem Material (Seetang, Kompost), seltener auch in Wiesen (9). Die breite ökologische Toleranz und gewisse morphologische Variationen deuten darauf hin, dass es unterschiedliche Rassen geben könnte.
15. *E. albidus* wird im Handel als Fischfutter angeboten. Es ist zu prüfen, ob die Kultur durch andere, normalerweise kleinere Arten kontaminiert ist (1) (19). Ist dies der Fall, sind alle Würmer in einer Petrischale mit Wasser zu waschen. Mithilfe eines Stereomikroskops werden große adulte Exemplare von *E. albidus* für eine neue Kultur aussortiert, und alle anderen Würmer sind zu verwerfen. *E. albidus* lässt sich leicht in einer Vielzahl organischer Materialien züchten (siehe Anlage 4). Der Lebenszyklus von *E. albidus* ist kurz, da die Tiere ihre Geschlechtsreife zwischen dem 33. Lebenstag (bei 18 °C) und dem 74. Lebenstag (bei 12 1 °C) erreichen. Für die Prüfung sollten ausschließlich Wurmulturen verwendet werden, die mindestens fünf Wochen lang (eine Generation) ohne Probleme im Labor gehalten wurden.

16. Andere *Enchytraeus*-Arten kommen ebenfalls in Betracht; z. B. *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 oder *E. crypticus* Westheide und Graefe 1992 (siehe Anlage 5). Werden andere *Enchytraeus*-Arten verwendet, so sind diese eindeutig zu identifizieren, und die Wahl der Art ist zu begründen.
17. Für die Tests sind adulte Tiere zu verwenden. In der Clitellum-Region sollten Eier (weiße Flecken) erkennbar sein, und die Tiere müssen alle etwa gleich groß sein (ca. 1 cm lang). Die Zuchtkultur braucht nicht synchronisiert zu werden.
18. Wenn die Enchytraeen nicht in demselben Bodentyp und unter denselben Bedingungen (einschließlich Fütterung) gehalten werden wie im endgültigen Test, muss eine Akklimatisierung erfolgen (mindestens 24 Stunden bis drei Tage). Zunächst sollten mehr adulte Tiere als zur Durchführung des Tests benötigt akklimatisiert werden, damit beschädigte oder anderweitig ungeeignete Exemplare verworfen werden können. Am Ende des Akklimatisierungszeitraums werden für den Test ausschließlich Würmer ausgewählt, die Eier enthalten und keine Verhaltensauffälligkeiten zeigen (z. B. Versuche, den Boden zu verlassen). Die Würmer werden mit einer Juwelierpinzette, mit Haken oder Schlaufen vorsichtig herausgenommen und in eine Petrischale mit einer kleinen Menge Süßwasser gesetzt. Für diesen Zweck ist rekonstituiertes Süßwasser zu empfehlen, wie in Kapitel C.20 (*Daphnia magna* Reproduktionstest) beschrieben, da entionisiertes oder entmineralisiertes Wasser oder Leitungswasser für die Würmer schädlich sein könnte. Die Würmer werden unter einem Stereomikroskop untersucht, und Würmer ohne Eier werden verworfen. Es ist sorgfältig darauf zu achten, dass auch Milben und Springschwänze entfernt und verworfen werden, die in die Kulturen geraten sein könnten. Für den Test nicht benötigte gesunde Würmer werden in die Stammkultur zurückgegeben.

Herstellung der Testkonzentrationen

Wasserlösliche Prüfchemikalie

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

Wasserunlösliche Prüfchemikalien

20. Chemikalien, die in Wasser unlöslich, aber in organischen Lösungsmitteln löslich sind, können in der kleinstmöglichen Menge eines geeigneten Lösungsvermittlers (z. B. Aceton) gelöst werden. Hierzu sind ausschließlich flüchtige Lösungsmittel zu verwenden. Der Trägerstoff wird auf eine kleine Menge (z. B. 2,5 g) Quarzsand gesprüht oder mit dem Sand vermischt. Anschließend wird der Sand mindestens eine Stunde unter einem Abzug gestellt, damit das Lösungsmittel verdunsten kann. Diese Mischung aus Quarzsand und Prüfchemikalie wird zum angefeuchteten Boden hinzugegeben und nach Hinzugabe von entionisiertem Wasser in ausreichender Menge gründlich gemischt, um den erforderlichen Feuchtegehalt zu erzielen. Die endgültige Mischung wird in die Prüfgefäße gegeben.
21. Bei Chemikalien, die sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln schlecht löslich sind, wird das Äquivalent von 2,5 g fein gemahlenem Quarzsand pro Prüfgefäß mit der Menge der Prüfchemikalie vermischt, die erforderlich ist, um die gewünschte Testkonzentration zu erhalten. Diese Mischung aus Quarzsand und Prüfchemikalie wird zum angefeuchteten Boden hinzugegeben und nach Hinzugabe von entionisiertem Wasser in ausreichender Menge gründlich vermischt, um den erforderlichen Feuchtegehalt zu erzielen. Die endgültige Mischung wird auf die Prüfgefäße verteilt. Dieses Verfahren wird für alle Testkonzentrationen wiederholt, und es wird eine geeignete Kontrolle hergestellt.
22. Die Chemikalien werden im Allgemeinen höchstens bis zu einer Konzentration von 1 000 mg/kg Boden (Trockenmasse) geprüft. Je nach Zielsetzung eines bestimmten Tests können Prüfungen allerdings auch mit höheren Konzentrationen vorgenommen werden.

DURCHFÜHRUNG DER TESTS

Test- und Kontrollgruppen

23. Für jede Testkonzentration werden 20 g (Trockenmasse) Testboden in das Prüfgefäß gegeben (siehe Nummern 19, 20 und 21). Außerdem werden Kontrollen ohne die Prüfchemikalie hergestellt. In alle Prüfgefäße wird Futter gegeben, wie unter Nummer 29 beschrieben. In jedes Prüfgefäß werden zehn zufällig ausgewählte Würmer gesetzt. Die Würmer werden vorsichtig in die einzelnen Prüfgefäße gegeben und auf dem Boden

abgesetzt (z. B. mit einer Juwelierpinzette, mit Haken oder mit Schlaufen. Die Anzahl der Replikate der Testkonzentrationen und der Kontrollen hängt vom jeweiligen Prüfprotokoll ab (siehe Nummer 34). Die Prüfgefäße werden nach dem Zufallsprinzip in den Testinkubator gestellt, und die Positionen werden wöchentlich neu randomisiert.

24. Wenn zur Applikation der Prüfchemikalie ein Lösungsvermittler verwendet wird, ist zusätzlich zu den Testreihen eine Kontrollreihe mit Quarzsand mit aufgesprühtem oder untergemischtem Lösungsmittel zu prüfen. Die Konzentration des Lösungsmittels oder des Dispergiermittels muss mit der Konzentration übereinstimmen, die auch in den Prüfgefäßen mit der Prüfchemikalie verwendet wird. Bei Chemikalien, die gemäß den unter Nummer 21 beschriebenen Verfahren zu applizieren sind, muss eine Kontrollreihe mit zusätzlichem Quarzsand (2,5 g pro Gefäß) geprüft werden.

Prüfbedingungen

25. Die Testtemperatur beträgt 20 ± 2 °C. Damit die Würmer den Boden nicht verlassen, wird die Prüfung bei einem geregelten Licht-Dunkel-Zyklus (vorzugsweise 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit) mit einer Lichtstärke von 400 bis 800 lux im Bereich der Prüfgefäße durchgeführt.
26. Um die Feuchte des Bodens zu ermitteln, werden die Gefäße zu Beginn des Tests und danach jeweils einmal pro Woche gewogen. Gewichtsverluste werden durch Zugabe von entionisiertem Wasser in ausreichender Menge aufgefüllt. Wasserverluste können durch Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit (> 80 %) im Testinkubator reduziert werden.
27. Der Feuchtegehalt und der pH-Wert sind jeweils zu Beginn und am Ende sowohl des Vorversuchs als auch des definitiven Tests zu messen. Die Messungen sind an allen Kontrollen und an allen mit der Prüfchemikalie (in allen Konzentrationen) behandelten Bodenproben vorzunehmen, die zwar in der gleichen Weise wie die Testkulturen hergestellt und gehandhabt werden, aber keine Würmer enthalten. Zu diesen Bodenproben ist nur zu Beginn des Tests Futter hinzuzugeben, um die Aktivität der vorhandenen Mikroorganismen anzuregen. Es sollte die gleiche Menge Futter hinzugegeben werden, wie zu den Testkulturen. Während des Tests braucht in diese Gefäße allerdings kein weiteres Futter mehr gegeben zu werden.

Fütterung

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

Protokoll des Vorversuchs zur Konzentrationsbereichs-Bestimmung

30. Wenn erforderlich, wird ein Vorversuch beispielsweise mit fünf Konzentrationen der Prüfchemikalie (0,1, 1,0, 10, 100 und 1 000 mg/kg (Boden Trockenmasse)) durchgeführt. Ein Replikat für jede Behandlung und jede Kontrolle ist ausreichend.
31. Der Vorversuch dauert zwei Wochen. Am Ende des Versuchs wird die Mortalität der Würmer ermittelt. Ein Wurm wird dann als tot erfasst, wenn er am vorderen Ende nicht mehr auf mechanische Reize reagiert. Über die Mortalität hinaus können auch weitere Informationen hilfreich sein, um die im definitiven Test zu verwendenden Konzentrationen festzulegen. Änderungen im Verhalten der adulten Würmer (die Würmer können sich nicht mehr in den Boden eingraben, sie liegen reglos an der Glaswand des Prüfgefäßes usw.) sowie morphologische Änderungen (z. B. offene Wunden) sind daher ebenso zu protokollieren wie das Vorhandensein juveniler Würmer. Letzteres kann mit der in Anlage 6 beschriebenen Färbemethode ermittelt werden.

32. Der ungefähre LC_{50} -Wert kann bestimmt werden, indem der geometrische Mittelwert der Mortalitätsdaten berechnet wird. Bei der Festlegung des Konzentrationsbereichs für den definitiven Test wird davon ausgegangen, dass die Wirkungen auf die Reproduktionsleistungen maximal um den Faktor 10 geringer sind als der LC_{50} -Wert. Dies ist jedoch eine empirische Beziehung; jeder Einzelfall kann anderes aussehen. Weitere Beobachtungen im Vorversuch (z. B. das Vorkommen juveniler Tiere) können helfen, den Konzentrationsbereich der Prüfchemikalie für den definitiven Test noch genauer einzugrenzen.
33. Um den LC_{50} -Wert genau zu bestimmen, wird empfohlen, den Test mit mindestens vier Replikaten für jede Konzentration der Prüfchemikalie und mit einer geeigneten Anzahl Konzentrationen zu wiederholen, damit sich mindestens vier statistisch signifikante mittlere Reaktionen für die jeweiligen Konzentrationen ergeben. Eine ähnliche Anzahl an Konzentrationen und Replikaten ist gegebenenfalls auch für die Kontrollen zu verwenden.

Protokoll des definitiven Reproduktionstests

34. Entsprechend den Empfehlungen aufgrund eines Ringtests werden drei Protokolle vorgeschlagen (2):
- Zur Bestimmung der NOEC sind mindestens fünf Konzentrationen in einer geometrischen Reihe zu prüfen. Zu empfehlen sind vier Replikate je Testkonzentration und acht Kontrollen. Die Konzentrationen dürfen sich maximal um den Faktor 1,8 unterscheiden.
 - Zur Ermittlung des EC_x -Werts (z. B. EC_{10} oder EC_{50}) müssen mindestens fünf Konzentrationen geprüft werden; diese Konzentrationen müssen den EC_x einschließen, damit der EC_x interpoliert werden kann und nicht extrapoliert werden muss. Mindestens vier Replikate je Testkonzentration und vier Kontrollreplikate werden empfohlen. Der Abstandsfaktor kann unterschiedlich sein (d. h. im erwarteten Wirkungsbereich maximal 1,8 und bei den höheren und niedrigeren Konzentrationen mehr als 1,8).
 - Ein kombinierter Ansatz ermöglicht die Bestimmung sowohl der NOEC als auch des EC_x -Werts. Es sind acht Testkonzentrationen in einer geometrischen Reihe zu verwenden. Zu empfehlen sind vier Replikate je Behandlung und acht Kontrollen. Die Konzentrationen dürfen sich maximal um den Faktor 1,8 unterscheiden.
35. Pro Prüfgefäß sind zehn adulte Würmer zu verwenden (siehe Nummer 23). Zu Beginn des Tests und danach einmal wöchentlich bis zum 21. Tag einschließlich wird Futter in die Prüfgefäße gegeben (siehe Nummer 29). An Tag 21 werden die Bodenproben sorgfältig manuell abgesucht, und die lebenden adulten Würmer werden erfasst und gezählt; Verhaltensänderungen (die Würmer graben sich nicht mehr in den Boden; sie liegen reglos an der Glaswand des Prüfgefäßes usw.) und morphologische Veränderungen (z. B. offene Wunden) werden protokolliert. Anschließend werden alle adulten Würmer aus den Prüfgefäßen und aus dem Boden herausgenommen. Der Testboden mit etwa gebildeten Kokons wird nochmals drei Wochen unter den genannten Prüfbedingungen inkubiert, wobei allerdings nur noch einmal an Tag 35 gefüttert wird (25 mg gemahlene Haferflocken pro Gefäß).
36. Nach sechs Wochen werden die neu geschlüpften Würmer gezählt. Hierzu wird die auf der Färbung mit Bengalrot beruhende Methode (siehe Anlage 6) empfohlen, wengleich sich auch andere Verfahren zur Entnahme und Flotation unter Zufuhr von Flüssigkeit (aber nicht von Wärme) als geeignet erwiesen haben (4) (10)(11)(20). Die Einfärbung mit Bengalrot wird empfohlen, weil die Nassextraktion aus einem Bodensubstrat durch Trübungen aufgrund suspendierter Tonpartikel erschwert sein könnte.

Limit-Test

37. Wenn im Vorversuch auch bei der höchsten Konzentration (d. h. bei 1 000 mg/kg) keine Wirkungen festzustellen sind, kann der Reproduktionstest als Limit-Test durchgeführt werden, bei dem mit einer Konzentration von 1 000 mg/kg nachgewiesen wird, dass die NOEC im Hinblick auf die Reproduktionsleistung noch über diesem Wert liegt.

Zusammenfassung und Zeitplan des Tests

38. Im Einzelnen umfasst der Test folgende Schritte:

Zeitpunkt	Vorversuch	Definitiver Test
Tag – 7 oder früher	— Herstellen des künstlichen Bodens (Mischen trockener Bestandteile)	— Herstellen des künstlichen Bodens (Mischen trockener Bestandteile)
Tag – 5	— Prüfung des pH-Werts des künstlichen Bodens — Messung der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens	— Prüfung des pH-Werts des künstlichen Bodens — Messung der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens
Tag – 5 bis – 3	— Sortieren der Würmer zur Akklimatisierung	— Sortieren der Würmer zur Akklimatisierung
Tag – 3 bis 0	— Akklimatisieren der Würmer über mindestens 24 Stunden	— Akklimatisieren der Würmer über mindestens 24 Stunden
Tag – 1	— Befeuchten des künstlichen Bodens und Aufteilung in Chargen	— Befeuchten des künstlichen Bodens und Aufteilung in Chargen
Tag 0	— Herstellen der Stammlösungen — Applikation der Prüfchemikalie — Einwiegen des Prüfsubstrats in die Prüfgefäße — Einmischen des Futters — Einsetzen der Würmer — Messung pH-Werts und des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens	— Herstellen der Stammlösungen — Applikation der Prüfchemikalie — Einwiegen des Prüfsubstrats in die Prüfgefäße — Einmischen des Futters — Einsetzen der Würmer — Messung des pH-Werts und des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens
Tag 7	— Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens	— Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens — Füttern
Tag 14	— Bestimmen der Mortalität der adulten Tiere — Schätzung der Anzahl der juvenilen Tiere — Messung des pH-Werts und des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens	— Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens — Füttern
Tag 21		— Beobachten des Verhaltens der adulten Tiere — Entnahme der adulten Tieren — Bestimmung der Mortalität der adulten Tiere — Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens — Füttern
Tag 28		— Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens — Keine Fütterung

Zeitpunkt	Vorversuch	Definitiver Test
Tag 35		<ul style="list-style-type: none"> — Prüfen des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens — Füttern
Tag 42		<ul style="list-style-type: none"> — Zählen der juvenilen Würmer — Messung des pH-Werts und des Feuchtigkeitsgehalts des Bodens

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

39. Anlage 7 enthält zwar eine Übersicht, doch bei dieser Prüfmethode ist keine statistische Vorgehensweise für die Analyse der Prüfergebnisse vorgeschrieben.
40. Der wesentliche Endpunkt des Vorversuchs ist die Mortalität. Änderungen im Verhalten der adulten Würmer (die Würmer können sich nicht mehr in den Boden eingraben, sie liegen reglos an der Glaswand des Prüfgefäßes usw.) sowie morphologische Änderungen (z. B. offene Wunden) sind jedoch ebenso zu protokollieren wie das Vorhandensein juveniler Würmer. Der LC_{50} -Wert wird normalerweise mit Probit-Analysen (21) oder durch logistische Regressionsanalysen bestimmt. Wenn diese Analysemethode jedoch ungeeignet ist (z. B. weil weniger als drei Konzentrationen verfügbar sind, bei denen ein Teil der Tiere gestorben ist), können auch alternative Methoden verwendet werden. In Betracht kommen etwa gleitende Durchschnitte (22), die Trimmed-Spearman-Kärber-Methode (23) oder eine einfache Interpolation (z. B. geometrischer Mittelwert von LC_0 und LC_{100} , berechnet als Quadratwurzel von LC_0 multipliziert mit LC_{100}).
41. Endpunkt beim definitiven Test ist die Vermehrungsrate (d. h. die Anzahl der entstandenen juvenilen Tiere). Ebenso wie im Vorversuch sind jedoch im Abschlussbericht auch alle Anzeichen für sonstige schädliche Wirkungen zu erfassen. Für die statistische Analyse müssen für jede Textkonzentration und jede Kontrolle im Reproduktionstest das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet werden.
42. Wenn eine Varianzanalyse vorgenommen wurde, können die Standardabweichung, s , und die Freiheitsgrade, df , durch die nach der ANOVA geschätzte gepoolte Varianz bzw. durch die entsprechenden Freiheitsgrade ersetzt werden (wenn die Varianz nicht von der Konzentration abhängig ist). In diesem Fall sind die einzelnen Varianzen der Kontrollen und der Gefäße mit den Testkonzentrationen zu verwenden. In der Regel werden die betreffenden Werte mit kommerzieller Statistik-Software berechnet, wobei die Ergebnisse der einzelnen Gefäße als Replikate angenommen werden. Wenn die Zusammenfassung von Daten der negativen Kontrollen und der Lösungsmittelkontrollen sinnvoller erscheint als die Prüfung mit einer einzelnen Kontrolle, werden die Kontrollen getestet, um sicherzustellen, dass sich die Ergebnisse nicht signifikant unterscheiden (entsprechende Tests siehe Nummer 45 und Anlage 7).
43. Ob weitere statistische Tests vorzunehmen und statistische Rückschlüsse zu ziehen sind, hängt davon ab, ob bei den Replikaten eine Normalverteilung und eine homogene Varianz der Werte gegeben ist.

Schätzung der NOEC

44. Vorzugsweise sollten leistungsfähige Tests durchgeführt werden. Dabei könnten Informationen (z. B. frühere Erfahrungen mit Ringtests oder sonstige historische Daten) herangezogen werden, um zu beurteilen, ob die Daten in etwa normal verteilt sind. Entscheidender ist die Varianzhomogenität (Homoskedastizität). Erfahrungsgemäß steigt die Varianz häufig mit zunehmendem Mittelwert. In diesem Fall könnte eine Datentransformation eine Homoskedastizität zur Folge haben. Eine entsprechende Transformation sollte aber eher auf Erfahrungen mit historischen Daten als auf den Daten der aktuellen Untersuchung beruhen. Bei homogenen Daten sind multiple t-Tests (z. B. ein Williams-Test ($\alpha = 0,05$, einseitig) (24)(25) oder in bestimmten Fällen auch ein Dunnett-Test (26)(27)) durchzuführen. Bei uneinheitlichen Replikaten müssen die t-Werte in der Tabelle korrigiert werden, wie von Dunnett und Williams empfohlen. Bei einer starken Variation steigen/sinken die Ergebnisse nicht regelmäßig. Bei derart starken Monotonieabweichungen ist der Dunnett-Test besser geeignet. Bei Abweichungen von der Homoskedastizität kann es angebracht sein, mögliche Wirkungen in Bezug auf Varianzen näher zu untersuchen, um dann zu entscheiden, ob die t-Tests durchgeführt werden können, ohne zu viel an Aussagekraft einzubüßen (28). Alternativ kann ein multipler U-Test (z. B. der

Bonferroni-U-Test nach Holm (29)) oder — wenn bei diesen Daten zwar eine Homoskedastizität festzustellen ist, die Daten ansonsten aber mit der zugrunde liegenden monotonen Dosis-Wirkungs-Kurve übereinstimmen — ein weiterer nicht parametrischer Test (z. B. Jonckheere-Terpstra (30)(31) oder Shirley) (32)(33) vorgenommen werden; dies wäre im Allgemeinen sinnvoller als t-Tests für ungleiche Varianzen (siehe auch Flussdiagramm in Anlage 7).

45. Wenn ein Limit-Test durchgeführt wurde und die Voraussetzungen für parametrische Prüfverfahren (Normalität, Homogenität) erfüllt sind, kann der paarige Student-t-Test verwendet werden; ansonsten ist der -U-Test nach Mann und Whitney durchzuführen (29).

Schätzung von EC_x

46. Zur Berechnung eines EC_x -Werts wird eine Regressionsanalyse (linear oder nicht linear) mit den Mittelwerten aus der Vorbehandlung vorgenommen, nachdem eine geeignete Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt wurde. Für das Wachstum der Würmer als kontinuierliche Reaktion können EC_x -Werte mit einer geeigneten Regressionsanalyse geschätzt werden (35). Geeignete Funktionen für quantale Daten (Mortalität/Überleben und Anzahl der Nachkommen) sind die normale sigmoide Funktion, die Logit- oder die Weibull-Funktion mit zwei bis vier Parametern, die teilweise auch hormetische Effekte abbilden können. Wenn eine Dosis-Wirkungs-Funktion mithilfe einer linearen Regressionsanalyse angepasst wurde, müssten in der Regressionsanalyse ein signifikanter r^2 -Wert (Bestimmungskoeffizient) und/oder eine Steigung festzustellen sein; anschließend wird der EC_x -Wert abgeschätzt, indem in die nach der Regressionsanalyse erstellte Gleichung ein Wert entsprechend x % des Mittelwerts der Kontrollgruppe eingesetzt wird. 95- %-Konfidenzintervalle werden nach Fieller (zitiert in Finney (21)) oder mit sonstigen modernen geeigneten Methoden berechnet.
47. Alternativ wird die Reaktion als Anteil oder Prozentanteil eines Modellparameters nachgebildet, der dann als mittlere Reaktion der Kontrollgruppe angenommen wird. In diesen Fällen kann die normale (Logit, Weibull) sigmoide Kurve häufig leicht durch eine Probit-Regression an die Ergebnisse angepasst werden (21). In diesen Fällen ist die Gewichtungsfunktion entsprechend den metrischen Antworten anzupassen, wie bei Christensen (36) beschrieben. Wenn allerdings eine Hormesis festgestellt wurde, ist die Probit-Analyse durch eine 4-Parameter-Funktion (Logit oder Weibull) zu ersetzen, die mit einem nicht linearen Regressionsverfahren angepasst wird (36). Kann keine geeignete Dosis-Wirkungs-Funktion an die Daten angepasst werden, können alternative Methoden zur Abschätzung von EC_x und der entsprechenden Konfidenzintervalle verwendet werden (beispielsweise gleitende Durchschnitte nach Thompson (22) und das Trimmed-Spearman-Kärber-Verfahren (23)).

PRÜFBERICHT

48. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfchemikalie:

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

Im Test verwendete Art:

- eingesetzte Testtiere: Art, wissenschaftlicher Name, Bezugsquelle der Testorganismen und Zuchtbedingungen.

Prüfbedingungen:

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

Prüfergebnisse:

- Mortalität adulter Würmer nach zwei Wochen und Anzahl der juvenilen Tiere am Ende des Vorversuchs;
- Mortalität adulter Würmer nach dreiwöchiger Exposition und vollständige Anzahl der juvenilen Tiere am Ende des definitiven Tests;
- alle beobachteten physischen oder pathologischen Symptome und Verhaltensänderungen der Testorganismen;
- der LC₅₀-Wert, die NOEC und/oder der EC_x-Wert (z. B. EC₅₀ oder EC₁₀) für die Reproduktionsleistung, gegebenenfalls mit Konfidenzintervallen, und eine Grafik des angepassten Modells der Berechnung sowie sämtliche Informationen und Feststellungen, die für die Interpretation der Ergebnisse hilfreich sein können;

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

LITERATUR

- (1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen. Abschlussbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt (Berlin), FE-Vorhaben 106 03 051/01.
- (2) Römbke, J., und Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 S.
- (3) Westheide, W., und Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Hrsg. Esser, G., und Overdieck, D., S. 497-508. Elsevier, Amsterdam.
- (4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R., und Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 S.
- (5) Kapitel C.8: Toxizität bei Regenwürmern.
- (6) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1993). Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*) — Teil 1: Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität unter Verwendung von künstlichem Bodensubstrat, Nr. 11268-1. ISO, Genf.
- (7) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1996). Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer — Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*, Nr. 11268-2. ISO, Genf.
- (8) Rundgren, S., und A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). In: Løkke, H., und C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.
- (9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23, 217-232.
- (10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.
- (11) Dunger, W., und Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- (12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37, 2-29.
- (13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung. UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.
- (14) Römbke, J., und Federsmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.
- (15) Römbke, J., Riepert, F. und Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. und Eisentraeger, A. (Hrsg.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (16) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1994). Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des pH-Wertes, Nr. 10390. ISO, Genf.

- (17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.
 - (18) Nielsen, C.O. und Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.
 - (19) Bouguenec, V., und Giani, N. (1987). Deux nouvelles especes d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.
 - (20) Korinkova, J., und Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.
 - (21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), S. 19-76. Cambridge Univ. Press.
 - (22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, London.
 - (23) Hamilton, M.A., R.C. Russo und R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.
 - (24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.
 - (25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.
 - (26) Dunnett, C.W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.
 - (27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.
 - (28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361
 - (29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.
 - (30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.
 - (31) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.
 - (32) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.
 - (33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.
 - (34) Sokal, R.R., und F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
 - (35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.
 - (36) Van Ewijk, P.H., und J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC₅₀ and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.
-

Anlage 1

Begriffsbestimmungen

Für diese Prüfmethode gelten folgende Begriffsbestimmungen:

Chemikalie: ein Stoff oder eine Mischung.

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

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

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

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

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

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

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

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

Anlage 2

Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität**Bestimmung der Wasserhaltekapazität des künstlichen Bodens**

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

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

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

Dabei sind:

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

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

D = Trockenmasse des Substrats

LITERATUR:

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

—

*Anlage 3***Bestimmung des pH-Wertes von Böden**

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

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

LITERATUR

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

Anlage 4

Kulturbedingungen für *Enchytraeus* sp.

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

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

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

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

Die Kulturbedingungen gelten als zufriedenstellend, wenn die Würmer a) nicht versuchen, das Bodensubstrat zu verlassen, b) sich rasch im Boden bewegen, c) eine glänzende Oberfläche haben, an der keine Bodenpartikel anhaften, d) eine mehr oder weniger weißliche Farbe haben, e) in unterschiedlichen Altersstufen in der Kultur vertreten sind und f) sich kontinuierlich vermehren.

Anlage 5

Durchführung der Prüfung mit anderen *Enchytraeus*-Arten**Wahl der Arten**

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

Beispiele für geeignete alternative Arten)

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

Zuchtbedingungen

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

Prüfbedingungen

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

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

LITERATUR

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

Anlage 6

Detaillierte Beschreibung der Entnahmeverfahren**Färbung mit Bengalrot**

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

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

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

Nassextraktion

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

Flotation

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

LITERATUR

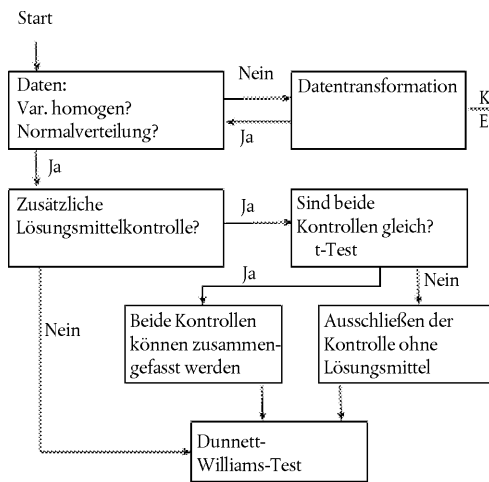
- (1) Korinkova, J., und Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, *Vestnik Československo Spolecnosti Zoologicke* 32, 300-305.
- (2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R., und Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (*Oligochaeta*, *Annelida*) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 S.

-
- (3) Posthuma, aL., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M., und Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. *Ecotox. Envir. Safety* 38, 108-121.
 - (4) Phillips, C.T., Checkai, R.T., und Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, USA. Abstract Book No. PMP069, S. 157.
-

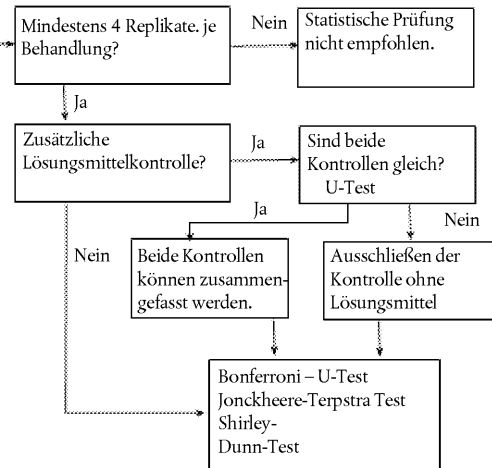
Anlage 7

Überblick über die statistische Auswertung der Daten (NOEC-Bestimmung)

Parametrische Prüfung



Nicht parametrische Prüfung



C.33. REPRODUKTIONSTEST MIT REGENWÜRMERN (EISENIA FETIDA/EISENIA ANDREI)

EINLEITUNG

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

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

3. Adulte Würmer werden einer Reihe von Konzentrationen der entweder in den Boden gemischten oder — bei Pestiziden — auf oder in den Boden applizierten Prüfchemikalie ausgesetzt; dabei ist entsprechend den Anwendungsformen der jeweiligen Chemikalie zu verfahren. Das Applikationsverfahren hängt von den Prüfzielen ab. Die Konzentrationsspanne wird so gewählt, dass die Konzentrationen abgedeckt sind, bei denen über einen Zeitraum von acht Wochen mit subletalen und letalen Wirkungen zu rechnen ist. Nach vierwöchiger Exposition werden die Wirkungen auf die Mortalität und das Wachstum der adulten Würmer ermittelt. Die adulten Würmer werden aus dem Boden entfernt, und nach weiteren vier Wochen werden durch Auszählen der im Boden vorhandenen juvenilen Tiere die Wirkungen auf die Reproduktionsleistung beurteilt. Die Reproduktionsleistung der Tiere, die der Prüfchemikalie ausgesetzt waren, wird mit der Reproduktionsleistung der Kontrollgruppe(n) verglichen, um (i) die NOEC (höchste messbare Konzentration ohne statistisch signifikante Wirkung) und/oder (ii) mithilfe eines Regressionsmodells den EC_x -Wert (z. B. EC_{10} oder EC_{50}), d. h. die Konzentration zu ermitteln, bei der die Reproduktionsleistung um x % reduziert wird. Die Testkonzentrationen müssen den EC_x -Bereich einschließen (z. B. EC_{10} und EC_{50}), damit der EC_x -Wert nicht extrapoliert werden muss, sondern durch Interpolation bestimmt werden kann (Begriffsbestimmungen siehe Anlage 1).

ANGABEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

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

REFERENZCHEMIKALIE

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

VALIDITÄT DES TESTS

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

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

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Ausrüstung

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

Herstellung des künstlichen Bodens

11. In diesem Test wird künstlicher Boden (5)(7) mit folgender Zusammensetzung verwendet (bezogen auf Trockenmassen, bei 105 °C bis zur Massekonstanz getrocknet):
- 10 % Sphagnum-Torf (pH-Wert möglichst im Bereich 5,5-6,0, keine sichtbaren Pflanzenreste, fein gemahlen und auf einen bestimmten Feuchtegehalt getrocknet);
 - 20 % Kaolin-Ton (Kaolinit-Anteil vorzugsweise über 30 %);

- 0,3 bis 1,0 % Calciumcarbonat (CaCO_3 , pulverisiert, analysenrein), um einen pH-Ausgangswert von $6,0 \pm 0,5$ zu erzielen;
- 70 % luftgetrockneter Quarzsand (je nach erforderlichem CaCO_3 -Anteil), hauptsächlich Feinsand mit mehr als 50 % Partikeln mit einer Größe von 50-200 μm .

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

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

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

12. Die trockenen Bestandteile des Bodens werden in einem gut belüfteten Bereich gründlich durchmischt (z. B. in einem großen Labormischer). Vor Prüfbeginn wird der trockene künstliche Boden mit so viel entionisiertem Wasser befeuchtet, bis etwa die Hälfte des endgültigen Wassergehalts erreicht ist, die 40 bis 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität (50 ± 10 % Feuchte bezogen auf die Trockenmasse) entspricht. Dabei entsteht ein Substrat, das kein überstehendes oder freies Wasser mehr enthält (durch Ausdrücken mit der Hand festzustellen). Die maximale Wasserhaltekapazität des künstlichen Bodens wird mit den in Anlage 2, ISO 11274 (15) oder der entsprechenden EU-Norm beschriebenen Verfahren ermittelt.
13. Wird die Prüfchemikalie auf die Bodenoberfläche aufgebracht oder ohne Wasser in den Boden gemischt, so kann die endgültige Menge des Wassers bei der Herstellung des Substrats in den künstlichen Boden gemischt werden. Wird die Prüfchemikalie zusammen mit etwas Wasser in den Boden gemischt, kann das zusätzliche Wasser zusammen mit der Prüfchemikalie hinzugegeben werden (siehe Nummer 19).
14. Der Feuchtegehalt des Bodens wird zu Beginn und am Ende des Tests gemäß ISO 11465 (16) oder nach der entsprechenden EU-Norm und der pH-Wert nach Anlage 3 oder ISO 10390 (13) bzw. der entsprechenden EU-Norm bestimmt. Diese Parameter sind an einer Probe des Kontrollbodens und jeweils an einer Probe des Bodens mit den einzelnen Testkonzentrationen zu ermitteln. Wenn saure oder basische Chemikalien geprüft werden, braucht der pH-Wert des Bodens nicht korrigiert zu werden. Der Feuchtegehalt ist während des gesamten Tests durch regelmäßiges Wiegen der Behältnisse zu kontrollieren (siehe Nummern 26 und 30).

Auswahl und Vorbereitung der Testtiere

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

Herstellung der Testkonzentrationen

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

Mischen der Prüfchemikalie in den Boden

Wasserlösliche Prüfchemikalien

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

Wasserunlösliche Prüfchemikalien

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

In Wasser und organischen Lösungsmitteln unlösliche Prüfchemikalien

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

Applikation der Prüfchemikalie auf die Bodenoberfläche

22. Der Boden wird nach dem Einsetzen der Würmer behandelt. Die Prüfbehälter werden zunächst mit dem angefeuchteten Bodensubstrat gefüllt; anschließend werden die gewogenen Würmer auf die Oberfläche gesetzt. Gesunde Würmer graben sich in der Regel sofort in das Substrat ein; nach 15 Minuten noch an der Oberfläche verbliebene Würmer werden entsprechend als beschädigt betrachtet und sind zu ersetzen. Wenn Würmer ersetzt werden, sind die neuen Würmer und die zu ersetzenden Würmer zu wiegen, damit zu Prüfbeginn das Lebendgewicht der gesamten exponierten Gruppe und das Gesamtgewicht des Behälters mit den Würmern bekannt sind.
23. Danach wird die Prüfchemikalie hinzugegeben. In der ersten halben Stunde nach dem Einsetzen der Würmer (oder wenn sich noch Würmer an der Oberfläche befinden) darf die Prüfchemikalie noch nicht hinzugegeben werden, um einen unmittelbaren Hautkontakt mit der Prüfchemikalie zu vermeiden. Handelt es sich bei der Prüfchemikalie um ein Pestizid, kann es angebracht sein, die Chemikalie auf den Boden aufzusprühen. Die Prüfchemikalie ist mit einem geeigneten Labor-Sprühgerät möglichst gleichmäßig auf den Boden aufzubringen, um die Sprühapplikation im Freiland zu simulieren. Vor der Applikation die Abdeckung des Prüfbehälters abnehmen und den Behälter auskleiden, um die Seitenwände des Behälters vor Spritzern zu schützen. Zur Auskleidung kann ein Prüfbehälter ohne Boden verwendet werden. Die Applikation muss bei einer Temperatur von 20 ± 2 °C und, bei wässrigen Lösungen, Emulsionen oder Dispersionen, mit einem Wasserdurchsatz von 600-800 $\mu\text{l}/\text{m}^2$ erfolgen. Die Wassermenge ist mit einem geeigneten Kalibrierungsverfahren zu kontrollieren. Spezielle Formulierungen (z. B. Granulate oder Saatgutbeizen) sind entsprechend der landwirtschaftlichen Praxis aufzubringen.

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

VERFAHREN

Test- und Kontrollgruppen

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

Prüfbedingungen

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

Fütterung

31. Akzeptabel ist jedes Futter, das nachweislich dafür sorgt, während der Dauer des Versuchs das Gewicht der Würmer aufrechtzuerhalten. Erfahrungsgemäß sind Haferflocken sowie Rinder- und Pferdedung geeignet. Es muss sichergestellt werden, dass die Rinder oder Pferde, von denen der Dung stammt, nicht mit Arzneimitteln oder Chemikalien wie z. B. wachstumsfördernden Mitteln, Nematiziden oder sonstigen veterinärmedizinischen Produkten behandelt wurden, die die Entwicklung der Würmer während des Versuchs beeinträchtigen könnten. Nach Möglichkeit sollte selbstgesamelter Rinderdung verwendet werden, da sich gezeigt hat, dass im Handel als Gartendünger angebotener Rinderdung nachteilige Wirkungen auf die Würmer haben kann. Der Dung sollte luftgetrocknet und fein gemahlen sein und vor seiner Verwendung pasteurisiert werden.
32. Jede frische Futtercharge ist vor der Verwendung im Versuch an eine nicht für den Versuch vorgesehene Wurmkultur zu verfüttern, um sicherzustellen, dass es von geeigneter Qualität ist. Das Wachstum und die Kokonbildung dürfen bei den Würmern im Vergleich zu Würmern in einem Substrat, das kein Futter aus der neuen Charge enthält (Bedingungen siehe Prüfmethode C.8 (4)), nicht beeinträchtigt sein.

33. Das Futter wird erstmals einen Tag nach dem Einsetzen der Würmer und nach Applikation der Prüfchemikalie auf den Boden bereitgestellt. In jedem Behälter werden etwa 5 g des Futters auf der Bodenoberfläche verteilt und mit entionisiertem Wasser befeuchtet (etwa 5 bis 6 ml pro Behälter). Danach wird während der vierwöchigen Testdauer einmal pro Woche frisches Futter hinzugegeben. Wenn das Futter nicht verzehrt wird, ist die Ration zu reduzieren, um Pilz- und Schimmelbildung zu vermeiden. Die adulten Würmer werden an Tag 28 des Versuchs aus dem Boden genommen. Danach werden nochmals weitere 5 g Futter in die Prüfbehälter gegeben. Während der übrigen vier Wochen des Tests wird nicht mehr gefüttert.

Auswahl der Testkonzentrationen

34. Bereits bekannte Informationen über die Toxizität der Prüfchemikalie bieten einen Anhaltspunkt für die Auswahl angemessener Testkonzentrationen (z. B. Erfahrungswerte aus einem Test zur Prüfung der akuten Toxizität (4) und/oder Ergebnisse von Vorversuchen). Wenn erforderlich, wird ein Vorversuch beispielsweise mit fünf Konzentrationen der Prüfchemikalie (0,1, 1,0, 10, 100 und 1 000 mg/kg (Trockenmasse des Bodens)) vorgenommen. Ein Replikat pro Gefäß mit Testkonzentration und pro Kontrolle ist ausreichend. Der Vorversuch dauert zwei Wochen; am Ende des Tests wird die Mortalität ermittelt.

Prüfprotokoll

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

Testdauer und Messungen

37. An Tag 28 werden die lebenden adulten Würmer ermittelt und gezählt. Verhaltensauffälligkeiten bei adulten Tieren (die Tiere können sich nicht mehr in den Boden eingraben oder liegen unbeweglich auf dem Boden) und morphologische Änderungen (z. B. offene Wunden) werden ebenfalls protokolliert. Anschließend werden alle adulten Würmer aus den Prüfgefäßen herausgenommen, gezählt und gewogen. Die Entnahme der adulten Würmer kann erleichtert werden, indem der Boden mit den Würmern vor der Beurteilung in eine saubere Schale umgefüllt wird. Vor dem Wiegen werden die aus dem Boden entnommenen Würmer gewaschen (mit entionisiertem Wasser); zur Entfernung des überschüssigen Wassers werden die Würmer kurz auf Filterpapier gelegt. Nicht wiedergefundene Würmer sind als tot zu erfassen; es wird davon ausgegangen, dass diese Würmer gestorben sind und sich vor der Bewertung zersetzt haben.
38. Wenn der Boden aus den Behältern genommen wurde, wird er nun (ohne die adulten Würmer, aber gegebenenfalls mit gebildeten Kokons) in die Behälter zurückgegeben. Anschließend wird der Boden weitere vier Wochen unter den genannten Prüfbedingungen inkubiert; gefüttert wird allerdings nur noch einmal zu Beginn dieser Testphase (siehe Nummer 33).

39. Nach Ablauf der zweiten 4-wöchigen Phase werden die Anzahl der aus den in dem Boden befindlichen Kokons geschlüpften juvenilen Tiere und die Anzahl der Kokons mit den in Anlage 5 beschriebenen Verfahren ermittelt. Außerdem sind sämtliche Anzeichen von Beschädigungen oder Verletzungen der Würmer während der Testphase zu erfassen.

Limit-Test

40. Wenn im Vorversuch bei der höchsten Konzentration (1 000 mg/kg) keine Wirkungen festzustellen sind, wird der Reproduktionstest als Limit-Test mit der Testkonzentration 1 000 mg/kg durchgeführt. Mit einem Limit-Test kann unter Minimierung der im Versuch zu verwendenden Würmer nachgewiesen werden, dass die NOEC für die Reproduktionsleistung größer ist als die Limit-Konzentration. Sowohl für den behandelten Boden als auch für die Kontrollen sind jeweils acht Replikate zu verwenden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

41. Anlage 6 enthält zwar eine Übersicht, doch bei dieser Prüfmethode ist keine statistische Vorgehensweise für die Analyse der Prüfergebnisse vorgeschrieben.
42. Ein Endpunkt ist die Mortalität. Änderungen im Verhalten der adulten Tiere (die Würmer können sich nicht mehr in den Boden eingraben, sie liegen reglos an der Glaswand des Prüfgefäßes usw.) sowie morphologische Änderungen (z. B. offene Wunden) sind jedoch ebenso zu protokollieren wie das Vorhandensein juveniler Würmer. Der LC_{50} -Wert wird normalerweise mit Probit-Analysen (18) oder durch logistische Regressionsanalysen bestimmt. Wenn diese Analysemethoden jedoch ungeeignet sind (z. B. wenn weniger als drei Konzentrationen verfügbar sind, bei denen Tiere gestorben sind), können auch alternative Methoden verwendet werden. In Betracht kommen etwa gleitende Durchschnitte (19), die Trimmed-Spearman-Kärber-Methode (20) oder eine einfache Interpolation (z. B. geometrischer Mittelwert von LC_0 und LC_{100} , berechnet als Quadratwurzel von LC_0 multipliziert mit LC_{100}).
43. Der andere Endpunkt ist die Vermehrungsrate (d. h. die Anzahl der entstandenen juvenilen Tiere). Ebenso wie im Vorversuch sind jedoch im Abschlussbericht auch alle sonstigen Anzeichen für schädliche Wirkungen zu erfassen. Für die statistische Analyse müssen für jede Testkonzentration und für jede Kontrolle im Reproduktionstest das arithmetische Mittel \bar{x} und die Standardabweichung berechnet werden.
44. Wenn eine Varianzanalyse vorgenommen wurde, können die Standardabweichung, s , und die Freiheitsgrade, df , durch die nach der ANOVA geschätzte gepoolte Varianz und durch die entsprechenden Freiheitsgrade ersetzt werden (wenn die Varianz nicht von der Konzentration abhängig ist). In diesem Fall sind die einzelnen Varianzen der Kontrollen und der Gefäße mit den Testkonzentrationen zu verwenden. In der Regel werden die betreffenden Werte mit kommerzieller Statistik-Software berechnet, wobei die Ergebnisse der einzelnen Gefäße als Replikate angenommen werden. Wenn die Zusammenfassung von Daten der negativen Kontrollen und der Lösungsmittelkontrollen sinnvoller erscheint als die Prüfung mit einer einzelnen Kontrolle, werden die Kontrollen getestet, um sicherzustellen, dass sich die Ergebnisse nicht signifikant unterscheiden (entsprechende Tests siehe Nummer 47 und Anlage 6).
45. Ob weitere statistische Tests vorzunehmen und statistische Rückschlüsse zu ziehen sind, hängt davon ab, ob bei den Replikaten eine Normalverteilung und eine homogene Varianz der Werte gegeben sind.

NOEC-Schätzung

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

Holm (26)) oder — wenn bei diesen Daten zwar eine Homoskedasizität festzustellen ist, die Daten ansonsten aber mit der zugrunde liegenden monotonen Dosis-Wirkungs-Kurve übereinstimmen — ein weiterer nicht parametrischer Test (z. B. Jonckheere-Terpstra (27) (28) oder Shirley (29) (30)) vorgenommen werden; dies wäre im Allgemeinen sinnvoller als t-Tests für ungleiche Varianzen (siehe auch Flussdiagramm in Anlage 6).

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

EC_x-Schätzung

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

PRÜFBERICHT

50. Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

Prüfchemikalie:

- eine genaue Beschreibung der Prüfchemikalie (Charge, Los, CAS-Nummer und Reinheit);
- Merkmale der Prüfchemikalie (z. B. log K_{ow}, Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Henry-Konstante (H) und Angaben zu Verbleib und Verhalten).

Testorganismen:

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

Prüfbedingungen

- Angaben zur Herstellung des Prüfbodens;
- maximale Wasserhaltekapazität des Bodens;
- Beschreibung des Verfahrens zur Einbringung der Prüfchemikalie in den Boden;
- nähere Angaben zu chemischen Hilfsstoffen, die zur Applikation der Prüfchemikalie verwendet wurden;
- (gegebenenfalls) Angaben zur Kalibrierung der Sprühvorrichtung;
- Beschreibung des Versuchsaufbaus und des Prüfverfahrens;
- Größe der Prüfbehälter und Volumen des Prüfsubstrats;
- Prüfbedingungen: Lichtintensität, Dauer der Licht-Dunkel-Zyklen, Temperatur;

- Beschreibung der Fütterung; Typ und Menge des im Versuch verwendeten Futters; Zeitpunkte der Fütterung;
- pH-Wert und Wassergehalt des Bodens zu Beginn und am Ende des Versuchs.

Prüfergebnisse:

- Mortalität der adulten Tiere (%) in jedem Prüfbehälter nach den ersten vier Wochen des Versuchs;
- Gesamtmasse der adulten Würmer in den einzelnen Prüfbehältern zu Beginn des Versuchs;
- Gewichtsveränderungen der lebenden adulten Würmer (% des Ausgangsgewichts) in den einzelnen Prüfbehältern nach den ersten vier Wochen des Versuchs;
- Anzahl der in den einzelnen Prüfbehältern entstandenen juvenilen Tiere am Ende des Versuchs;
- Beschreibung deutlicher oder pathologischer Symptome oder ausgeprägter Verhaltensänderungen;
- Ergebnisse mit der Referenzchemikalie;
- der LC₅₀-Wert, die NOEC und/oder der EC_x-Wert (z. B. EC₅₀ oder EC₁₀) für die Reproduktionsleistung, gegebenenfalls mit Konfidenzintervallen, und eine Grafik des angepassten Modells für die Berechnung sowie sämtliche Informationen und Feststellungen, die für die Interpretation der Ergebnisse hilfreich sein könnten;
- grafische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- Ergebnisse der einzelnen Prüfbehälter;

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

LITERATUR

- (1) Jaenicke, J. (1982). ‚*Eisenia fetida*‘ is two biological species. *Megadrilogica* 4, 6-8.
- (2) Oien, N. und J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia fetida* (Savigny) is two species. *Comp. Biochem. Physiol.* 78c (2), 277 — 282.
- (3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. In: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. *Mitt. Biol. Bundesamt. f. Land- Forstwirtsch.* Berlin-Dahlem, 320, S. 50-82.
- (4) Kapitel C.8 dieses Anhangs; Toxizität für Regenwürmer.
- (5) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1996). Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*, Nr. 11268-2. ISO, Genf.
- (6) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1993). Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia Fetida*) — Teil 1: Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität unter Verwendung von künstlichem Bodensubstrat, Nr. 11268-1. ISO, Genf.
- (7) SETAC (1998). *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M. und Posthuma, L. (Hrsg.). SETAC Press, 456 S.
- (8) EPA (1996). *Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00)*. United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.
- (9) Bouché, M.B. (1972). *Lombriens de France, Ecologie et systématique*. Institut National de la Recherche Agronomique.
- (10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Kommission der Europäischen Gemeinschaften.
- (11) Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J. und Heimbach, F. (Hrsg.) (1992). *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercept.

- (12) Edwards, C.A. und Bohlen, J. P. (1996). *Biology and ecology of Earthworms*, Dritte Ausgabe. Chapman and Hall, London.
- (13) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1994). *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des pH-Wertes*, Nr. 10390. ISO, Genf.
- (14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. und Achazi, R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. und Eisentraeger, A. (Hrsg.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.
- (15) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1992). *Bodenbeschaffenheit — Bestimmung des Wasserrückhaltevermögens — Laborverfahren*, Nr. 11274. ISO, Genf.
- (16) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1993). *Bodenbeschaffenheit; Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehaltes auf Grundlage der Masse; Gravimetrisches Verfahren*, Nr. 11465. ISO, Genf.
- (17) Römbke, J. und Moser, Th. (1999). *Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test*. UBA-Texte 4/99, S. 150+ 223.
- (18) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (Dritte Ausgabe), S. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- (19) Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. — Charles Griffin & Company Ltd, London.
- (20) Hamilton, M.A., Russo, R.C. und Thurston, R.V. (1977). *Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays*. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; berichtigte Fassung *Environ. Sci. Technol.* 12(1998), 417.
- (21) Williams, D.A. (1971). *A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control*. *Biometrics* 27, 103-117.
- (22) Williams, D.A. (1972). *The comparison of several dose levels with a zero dose control*. *Biometrics* 28, 519-531.
- (23) Dunnett, C.W. (1955). *A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control*. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- (24) Dunnett, C.W. (1964). *New tables for multiple comparisons with a control*. *Biometrics* 20, 482-491.
- (25) Hoeven, N. van der (1998). *Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols?* *Ecotoxicology* 7: 355-361.
- (26) Holm, S. (1979): *A simple sequentially rejective multiple test procedure*. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- (27) Jonckheere, A. R. (1954). *A distribution-free k-sample test against ordered alternatives*. *Biometrika* 41, 133-145.
- (28) Terpstra, T. J. (1952). *The asymptotic normality and consistency of Kendall's test against trend, when ties are present in one ranking*. *Indagationes Math.* 14, 327-333.
- (29) Shirley, E. A. (1979); *The comparison of treatment to control group means in toxicology studies*. *Applied Statistics* 28, 144-151.
- (30) Williams, D.A. (1986); *A note on Shirley's nonparametric test for comparing several dose levels with a zero-dose control*. *Biometrics* 42, 183-186.
- (31) Sokal, R.R. und Rohlf, F.J. (1981). *Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research*. Zweite Ausgabe. W.H. Freeman and Company. New York.
- (32) Bruce, R.D. und Versteeg, D.J. (1992) *A statistical procedure for modelling continuous toxicity data*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.
- (33) Christensen, E.R. (1984). *Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model*. *Water Research* 18, 213-221.
- (34) Van Ewijk, P.H. und Hoekstra, J.A. (1993). *Calculation of the EC₅₀ and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present*. *Ecotox, Environ. Safety.* 25, 25-32.

Anlage 1

Begriffsbestimmungen

Für diese Prüfmethode gelten folgende Definitionen:

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch.

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

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

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

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

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

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

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

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

Anlage 2

Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität des künstlichen Bodens

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

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

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

Dabei sind:

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

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

D = Trockenmasse des Substrats

LITERATUR:

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

*Anlage 3***Bestimmung des pH-Wertes von Böden**

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

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

LITERATUR:

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

Anlage 4

Anzucht von *Eisenia fetida* /*Eisenia andrei*

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

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

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

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

Anlage 5

Verfahren zum Zählen der aus den Kokons geschlüpften juvenilen Würmer

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

- (a) Die Prüfbehälter werden in ein Wasserbad mit einer Temperatur von anfänglich 40 °C gesetzt, die danach auf 60 °C erhöht wird. Nach etwa 20 Minuten müssten die juvenilen Würmer an die Bodenoberfläche kommen; von dort können sie leicht abgelesen und gezählt werden.
- (b) Der Testboden kann nach der von van Gestel u. a. entwickelten Methode (1) durch ein Sieb gespült werden, sofern der Torf, der Dung oder das Haferflockenmehl, der bzw. das dem Boden hinzugegeben wurde, fein gemahlen wurden. Zwei Siebe mit einer Maschenweite von 0,5 mm (Durchmesser 30 cm) werden aufeinander gesetzt. Der Inhalt eines Prüfbehälters wird mit einem kräftigen Leitungswasserstrahl durch die Siebe gespült, wobei die juvenilen Würmer und die Kokons hauptsächlich auf dem oberen Sieb verbleiben. Die gesamte Oberfläche des oberen Siebs ist während des Siebvorgangs feucht zu halten, damit die juvenilen Würmer auf einem Wasserfilm schwimmen und nicht durch die Maschen des Siebs kriechen. Am besten wird dazu ein Brauseaufsatz verwendet.

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

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

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

LITERATUR:

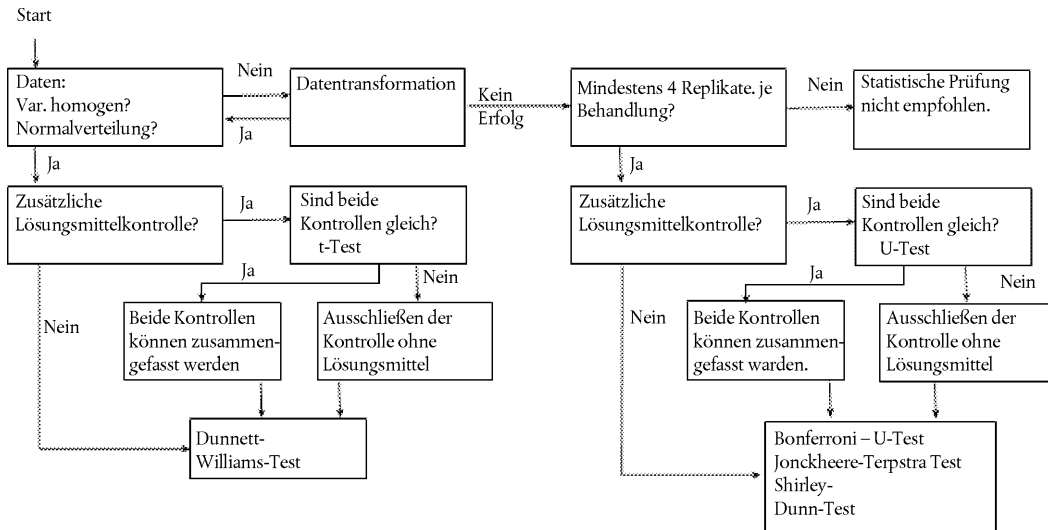
- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.

Anlage 6

Übersicht über die statistische Auswertung der Daten (NOEC-Bestimmung)

Parametrische Prüfung

Nicht parametrische Prüfung



C.34. BESTIMMUNG DER HEMMUNG ANAEROBER BAKTERIEN — REDUKTION DER GASPRODUKTION VON ANAEROBEM FAULSCHLAMM

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 224 (2007). In Gewässer eingeleitete Chemikalien passieren sowohl aerobe als auch anaerobe Zonen, in denen sie abgebaut werden und/oder die Aktivität von Bakterien hemmen können; in bestimmten Fällen können sie über Jahrzehnte oder noch länger unverändert in anaeroben Zonen verbleiben. Bei der Abwasserbehandlung ist die erste Stufe (Vorklämung) im Überstandswasser aerob und im abgesetzten Schlamm anaerob. Es folgt die zweite Stufe mit einer aeroben Zone im Belebtschlamm-Belüftungsbecken und einer anaeroben Zone im nachfolgenden Absetzbecken (Nachklämung). Schlamm aus beiden Stufen wird in der Regel einer anaeroben Behandlung unterzogen; dabei entstehen Methan und Kohlenstoffdioxid, die gewöhnlich zur Stromerzeugung genutzt werden. In der natürlichen Umwelt verbleiben Chemikalien, die sich in Sedimenten in Buchten, Ästuarien und im Meer ablagern, wahrscheinlich auf unbestimmte Zeit in diesen anaeroben Zonen, wenn sie nicht biologisch abbaubar sind. Große Anteile dieser Chemikalien gelangen hauptsächlich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften (z. B. schlechte Wasserlöslichkeit, starke Adsorption an suspendierte Feststoffe und keine biologische Abbaubarkeit unter aeroben Bedingungen) in diese Zonen.
2. In die Umwelt eingeleitete Chemikalien sollten zwar sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen abbaubar sein, doch ist es wichtig, dass in beiden Zonen die mikrobielle Aktivität durch diese Chemikalien nicht gehemmt wird. Im Vereinigten Königreich kam es in einigen Fällen zu einer vollständigen Hemmung der Methanproduktion, beispielsweise verursacht durch Pentachlorphenol in Industrieabwässern; hier mussten die betreffenden Schlämme aus den Faultürmen unter hohem Kostenaufwand an ‚sichere‘ Standorte gebracht und es musste gesunder Faulschlamm aus benachbarten Anlagen importiert werden. Es gab jedoch viele weniger drastische Fälle der Faulschlammmhemmung durch andere Chemikalien, darunter aliphatische Halogenkohlenwasserstoffe (aus der chemischen Reinigung) und Reinigungsmittel, die den Faulungsprozess dennoch erheblich beeinträchtigten.
3. Nur eine Prüfmethode (C.11) (1) befasst sich mit der Hemmung der Bakterienaktivität (Atmung von Belebtschlamm) und bewertet die Wirkung von Prüfchemikalien auf die Sauerstoffzehrung bei Vorhandensein von Substrat. Die Methode wird allgemein angewandt, um die mögliche schädliche Wirkung chemischer Stoffe auf die aerobe Behandlung von Abwässern möglichst frühzeitig zu erkennen und nicht hemmende Konzentrationen der Prüfchemikalien zur Verwendung in verschiedenen Bioabbaubarkeitstests abzuschätzen. Mit der Prüfmethode C.43 (2) ist es begrenzt möglich, die toxische Wirkung einer Prüfchemikalie auf die Gasproduktion anaeroben Schlamms zu bestimmen, der auf ein Zehntel seiner normalen Feststoffkonzentration verdünnt wurde, um bei der Bewertung des Zersetzungsprozentsatzes die erforderliche Genauigkeit zu gewährleisten. Da verdünnter Schlamm empfindlicher auf hemmende Chemikalien reagieren könnte, entschied sich die zuständige ISO-Gruppe für die Entwicklung einer Methode mit unverdünntem Schlamm. Mindestens drei Texte wurden geprüft (aus Dänemark, Deutschland und dem Vereinigten Königreich), und schließlich wurden zwei ISO-Normen erarbeitet — eine für unverdünnten Schlamm (ISO 13 641-1) (3) und eine für hundertfach verdünnten Schlamm (ISO 13 641-2) (4), um Schlämme und Sedimente mit geringen Bakterienpopulationen zu repräsentieren. Beide Methoden wurden im Ringtest geprüft (5), wobei Teil 1 als akzeptable Norm bestätigt wurde, bei Teil 2 jedoch Uneinigkeit bestand. Das Vereinigte Königreich war der Auffassung, diese Methode müsse weiter untersucht werden, da ein erheblicher Anteil der Teilnehmerlabors von sehr wenig oder keinerlei Gasproduktion berichtete, was zum Teil darauf zurückgeführt wurde, dass der Test aufgrund des zu hohen Gasanteils (75 %) nicht empfindlich genug war.
4. In früheren Arbeiten aus dem Vereinigten Königreich (6)(7) wurde ein manometrisches Verfahren beschrieben, bei dem unverdünnter Faulschlamm (plus roher Klärschlamm als Substrat) in 500-ml-Gefäßen verwendet wurde; die Apparatur war sperrig, und der Rohschlamm ging mit einer erheblichen Geruchsbelästigung einher. Später wurde die kompaktere und einfacher zu handhabende Apparatur von Shelton und Tiedje (8) (in der von Battersby und Wilson (9) entwickelten Form) von Wilson et al. (10) erfolgreich angewendet. Kawahara et al. (11) gelang im Labor die Herstellung weiterer Standardschlämme, die zur Verwendung in Tests auf anaerobe biologische Abbaubarkeit und die Hemmwirkung bestimmter Chemikalien geeignet sind. Außerdem wurde der Rohschlamm durch anaerobem Schlamm in hundertfacher Verdünnung bzw. durch Schlämme oder Sedimente bzw. vergleichbare Substrate mit niedriger bakterieller Aktivität als Testsubstrat ersetzt.
5. Mit dieser Prüfmethode können Daten generiert werden, die für die Prognostizierung der wahrscheinlichen Wirkung einer Prüfchemikalie auf die Gasproduktion in anaeroben Faultürmen hilfreich sind. Nur Langzeittests, bei denen aktive Faultürme realistischer simuliert werden, können jedoch Aufschluss darüber geben, ob es zu einer Anpassung der Mikroorganismen an die Prüfchemikalie kommen kann oder ob sich Chemikalien, mit hoher Adsorptionsneigung, die an den Schlamm adsorbiert werden, über einen über die Versuchsdauer hinausgehenden Zeitraum zu einer toxischen Konzentration anreichern können.

PRINZIP DER PRÜFUNG

6. Aliquoten einer Mischung aus anaerobem Faulschlamm (20-40 g/l Gesamtfeststoffgehalt) und einer abbaubaren Substratlösung einzeln und gleichzeitig in verschiedenen Prüfchemikalienkonzentrationen drei Tage lang in geschlossenen Gefäßen inkubieren. Die erzeugte Gasmenge (Methan und Kohlenstoffdioxid) anhand des Druckanstiegs (Pa) in den Flaschen messen. Die prozentuale Hemmung der Gaserzeugung durch die verschiedenen Prüfchemikalienkonzentrationen anhand der in den jeweiligen Prüf- und Kontrollgefäßen erzeugten Mengen berechnen. Den EC_{50} -Wert und andere Wirkkonzentrationen anhand von Kurven der prozentualen Hemmung bezogen auf die verschiedenen Prüfchemikalienkonzentrationen oder (häufiger) ihre Logarithmen berechnen.

ANGABEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

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

ANWENDUNGSBEREICH DER METHODE

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

REFERENZCHEMIKALIEN

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

REPRODUZIERBARKEIT VON TESTERGEBNISSEN

10. In einem internationalen Ringtest (5) konnten die 10 beteiligten Labore EC_{50} -Werte der für 3,5-Dichlorphenol und 2-Bromethansulfonsäure nur hinreichend reproduzieren. (Der Wertebereich für Dichlorphenol lag bei 32-502 mg/l und für Bromethansulfonsäure bei 220-2 190 mg/l.)

Zahl der Teilnehmer-labors	mg/l			mg/g Schlamm		
	Mittelwert	Standard-abwei-chung	VK (%)	Mittelwert	Standard-abwei-chung	VK (%)
	3,5-Dichlorphenol					
10	153	158	103	5	4,6	92
	2-Bromethansulfonsäure					
10	1 058	896	85	34	26	76

EC₅₀-Daten aus dem Ringtest — unverdünnter Schlamm

11. Die hohen Variationskoeffizienten zwischen den Labors spiegeln zu einem großen Teil die unterschiedliche Empfindlichkeit der im Schlamm enthaltenen Mikroorganismen wider, die durch eine Präexposition oder eine fehlende Präexposition gegenüber der Prüfchemikalie oder anderen chemisch verwandten Chemikalien verursacht wurde. Die Genauigkeit, mit der der EC₅₀-Wert anhand der Schlammkonzentration bestimmt wurde, war kaum besser als der ‚volumetrische‘ Wert (mg/l). Die Variationskoeffizienten (22, 9 und 18 % für EC₅₀ mg/g) der EC₅₀-Werte für 3,5-Dichlorphenol der drei Labore, die Angaben zur Genauigkeit Ihrer EC₅₀ Werte übermittelten, waren erheblich niedriger als die Mittelwerte aller zehn Labors zusammen. Die Mittelwerte der drei Labors waren jeweils 3,1; 3,2 und 2,8 mg/g. Die niedrigeren, annehmbaren Variationskoeffizienten innerhalb der Labors zeigen im Vergleich zu den erheblich höheren Variationskoeffizienten zwischen den Labors (9-22 % gegenüber 92 %) erhebliche Unterschiede bei den Eigenschaften der einzelnen Schlämme.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Apparatur

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

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

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

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

— Gasdicht beschichtete Septa werden empfohlen und sind bei flüchtigen Chemikalien unbedingt zu verwenden. (Einige handelsübliche Septa sind verhältnismäßig dünn (weniger als 0,5 cm) und werden undicht, wenn sie mit einer Spritzenadel durchstochen werden.)

— Septa aus Butylkautschuk (etwa 1 cm) werden für nicht flüchtige Prüfchemikalien empfohlen (denn sie bleiben normalerweise auch nach dem Durchstechen gasdicht).

— Vor dem Versuch sind die Septa sorgfältig auf Gasdichtheit nach dem Durchstechen zu prüfen.

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

- i) Mikrospritzen zum gasdichten Anschluss des Druckmessgeräts (siehe Nummer 12(c)) an den Kopfraum in den Flaschen (siehe Nummer 12(b)); auch für die Zugabe nicht löslicher flüssiger Testmaterialien in die Flaschen;
- j) Handschuhkasten (*Glovebox*), optional, aber empfohlen, mit leichtem Stickstoffüberdruck.

Reagenzien

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

Wasser

14. Wenn in einer Prüfungsphase eine Verdünnung vorgenommen werden muss, ist entlüftetes entionisiertes Wasser zu verwenden. Eine Analyse dieses Wassers zur Kontrolle ist nicht notwendig; es ist jedoch sicherzustellen, dass die Entionisierungsvorrichtung regelmäßig gewartet wird. Entionisiertes Wasser wird auch für die Herstellung von Stammlösungen verwendet. Vor der Zugabe des anaeroben Inokulums zu einer Lösung oder zu einer Verdünnung des Prüfmateri als ist sicherzustellen, dass die Lösung bzw. die Verdünnung frei von Sauerstoff ist. Dazu wird entweder eine Stunde vor Zugabe des Inokulums Stickstoffgas durch das Verdünnungswasser (bzw. durch die Verdünnungen) geblasen oder das Verdünnungswasser wird in sauerstofffreier Atmosphäre bis zum Siedepunkt erhitzt und anschließend weiterhin unter sauerstofffreier Atmosphäre auf Raumtemperatur abgekühlt.

Faulschlamm

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

Achtung! — Faulschlamm erzeugt entzündbare Gase, die einen Brand oder eine Explosion auslösen können. Da der Schlamm außerdem potenziell pathogene Organismen enthält, sind beim Umgang mit Faulschlamm entsprechende Vorsichtsmaßnahmen zu treffen. Aus Sicherheitsgründen dürfen zur Entnahme des Schlamm s keine Glasgefäße verwendet werden.

Inokulum

16. Unmittelbar vor der Verwendung den Schlamm vorsichtig umrühren und durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 1 mm² (Nummer 12(f)) in eine geeignete Flasche passieren (Nummer 12(g)), deren Kopfraum mit einem Stickstoffstrom begast wird. Für die Messung der Konzentration des gesamten Trockenstoffes (siehe z. B. ISO 11 923 (13) bzw. die entsprechende EU-Norm) eine Probe zur Seite stellen. Im Allgemeinen wird der Schlamm unverdünnt verwendet. Die Feststoffkonzentration liegt gewöhnlich zwischen 2 und 4 % (w/w). Den pH-Wert des Schlamm s prüfen und erforderlichenfalls auf $7 \pm 0,5$ einstellen.

Prüfsubstrat

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

Prüfchemikalie

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

19. Bei Prüfchemikalien, die in Wasser nicht hinreichend löslich sind, nach den Anweisungen in ISO 10 634 (12) bzw. der entsprechenden EU-Norm verfahren. Wenn ein organisches Lösungsmittel verwendet werden muss, sind Lösungsmittel wie etwa Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff zu vermeiden, da diese die Methanproduktion erfahrungsgemäß deutlich hemmen. In einem geeigneten flüchtigen Lösungsmittel (z. B. Aceton oder Diethylether) eine Lösung mit einer geeigneten Konzentration einer nicht wasserlöslichen Chemikalie herstellen. In die leeren Testflaschen die benötigten Mengen an in Lösungsmittel gelöster Chemikalie geben (Nummer 12(b)) und das Lösungsmittel vor Zugabe des Faulschlammes verdampfen lassen. Bei anderen Methoden gemäß ISO 10 634 (12) bzw. nach der entsprechenden EU-Norm verfahren; dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass zur Herstellung von Emulsionen verwendete Tenside die anaerobe Gasproduktion hemmen können. Wenn davon ausgegangen wird, dass das Vorhandensein organischer Lösungsmittel und Emulgatoren Artefakte verursachen könnte, kann die Prüfchemikalie auch als Pulver oder Flüssigkeit direkt in das Prüfgemisch gegeben werden. Flüchtige Chemikalien und wasserunlösliche flüssige Prüfchemikalien können mit Mikrospritzen in beimpfte Serumflaschen eingespritzt werden (Nummer 12(i)).
20. Die Prüfchemikalien werden so in die Flaschen gegeben, dass eine geometrische Konzentrationsreihe entsteht (z. B. 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l and 15,6 mg/l). Wenn der Toxizitätsbereich nicht von ähnlichen Chemikalien her bekannt ist, sollte zunächst einen Vorversuch mit Konzentrationen von 1 000 mg/l, 100 mg/l und 10 mg/l durchführt werden, um den benötigten Konzentrationsbereich zu ermitteln.

Referenzchemikalie

21. Zur Herstellung einer wässrigen Lösung mit 3,5-Dichlorphenol (10 g/l) schrittweise Natriumhydroxidlösung in einer Mindestmenge von 5 mol/l zu dem Feststoff geben und dabei die Lösung so lange schütteln, bis dieser sich aufgelöst hat. Anschließend die Lösung bis zum benötigten Volumen mit sauerstofffreiem Verdünnungswasser (Nummer 14) auffüllen; der Lösungsvorgang kann durch eine Ultraschallbehandlung unterstützt werden. Wenn der mittlere Bereich der EC_{50} -Werte in mindestens drei Tests mit unterschiedlichen Inokula (unterschiedliche Herkunft oder zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen) bestimmt wurde, können auch andere Referenzchemikalien verwendet werden.

INTERFERENZEN/FEHLER

22. Manche Bestandteile des Schlammes können mit potenziellen Hemmstoffen reagieren, die dann für Mikroorganismen nicht mehr verfügbar sind; die Hemmung wird dadurch entsprechend reduziert oder völlig unterbunden. Wenn der Schlamm bereits eine hemmende Chemikalie enthält, kann es bei der Prüfung ebenfalls zu falschen Ergebnissen kommen, wenn dieser Stoff getestet wird. Daneben gibt es noch eine Reihe weiterer Faktoren, die Ergebnisse verfälschen können. Diese sind (zusammen mit Methoden zur Vermeidung oder zumindest zur Reduzierung von Fehlern) in Anlage 3 aufgelistet.

PRÜFVERFAHREN

23. Die Zahl der erforderlichen Replikate hängt vom erforderlichen Genauigkeitsgrad der Inhibitionsindizes ab. Sind die Verschlüsse der Flaschen während der gesamten Versuchsdauer gasdicht genug, ist nur eine Charge (mindestens drei Replikate) Testflaschen pro getesteter Konzentration notwendig. Ebenso wird auch für jede Referenzchemikalie und für jede Kontrollreihe nur jeweils eine Charge Flaschen benötigt. Wenn die Verschlüsse der Flaschen jedoch nach ein- oder mehrmaligem Durchstechen nicht mehr dicht sind, muss für jede Zeitspanne (t), für die Ergebnisse ermittelt werden sollen, und für alle zu prüfenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie eine Charge Testflaschen (z. B. drei Flaschen) bereitgestellt werden. Gleichermaßen sind t-Chargen von Flaschen für die Referenzchemikalie und für die Kontrollen vorzubereiten.
24. Die Verwendung einer *Glove-Box* (Nummer 12(j)) wird empfohlen. Mindestens 30 Minuten vor Beginn des Versuchs wird mit der Einleitung eines Stickstoffstroms durch die *Glove-Box*, die die gesamte erforderliche Ausrüstung enthält, begonnen. Beim Handhaben und Verschließen der Flaschen ist sicherzustellen, dass die Temperatur des Schlammes im Bereich 35 ± 2 °C bleibt.

Vorversuch

25. Wenn über die Aktivität des Faulschlammes nichts bekannt ist, sollte ein Vorversuch durchgeführt werden. Dazu Kontrollen beispielsweise mit Feststoffkonzentrationen von 10 g/l, 20 g/l und 40 g/l und mit einem Substrat, jedoch ohne die Prüfchemikalie herstellen. Zudem verschiedene Mengen an Reaktionsgemisch verwenden, um drei oder vier verschiedene Verhältnisse an Kopfraum- zu Flüssigkeitsvolumen- zu erhalten. Anhand der Gasvolumina, die in den verschiedenen Zeitintervallen erzeugt werden, die optimalen Bedingungen ermitteln, unter denen zweimal täglich signifikante Gasvolumina und eine Druckentlastung pro Tag bei optimaler Empfindlichkeit ⁽¹⁾ und ohne Explosionsgefahr gemessen werden können.

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

Zugabe der Prüfchemikalien

26. Wasserlösliche Prüfchemikalien als wässrige Lösungen (Nummer 18) in leere Testflaschen (Nummer 12(b)) geben. Jeden Konzentrationsbereich mindestens in dreifacher Ausführung ansetzen (Nummer 20). Bei nicht oder schlecht löslichen Prüfchemikalien Lösungen der Prüfchemikalie in organischen Lösungsmitteln mit einer Mikrospritze in leere Flaschen injizieren, um Replikate von jeweils fünf Konzentrationen der Prüfchemikalie herzustellen. Das Lösungsmittel verdampfen, indem Stickstoffgas über die Oberfläche der Lösungen in die Testflaschen geleitet wird. Alternativ können nicht lösliche feste Chemikalien als abgewogene Feststoffmengen auch direkt in die Testflaschen gegeben werden.
27. Werden wasserunlösliche oder schlecht wasserlösliche flüssige Prüfchemikalien mithilfe eines Lösungsmittels hinzugegeben, so sind sie nach Zugabe des Inokulums und des Prübsubstrats (siehe Nummer 30) mit einer Mikrospritze direkt in die Testflaschen zu injizieren. Flüchtige Prüfchemikalien können auf dieselbe Weise hinzugegeben werden.

Zugabe von Inokulum und Substrat

28. Eine geeignete Menge gesiebten Faulschlamm (siehe Nummer 16) in einer 5-l-Flasche (Nummer 12(g)) rühren; dabei gleichzeitig den Kopfraum mit Stickstoffgas begasen. Testflaschen mit wässrigen Lösungen oder mit verdampften Lösungsmittellösungen der Prüfchemikalien etwa zwei Minuten mit gasförmigem Stickstoff spülen, um vorhandene Luft zu entfernen. Aliquoten (z. B. 100 ml) des gut durchmischten Schlamm mit einer Pipette mit weiter Öffnung oder mit einem Messzylinder in die Testflaschen geben. Wichtig ist, dass die Pipette in einem einzigen Schritt mit der exakt benötigten Schlammmenge gefüllt wird, da sich die im Schlamm enthaltenen Feststoffe leicht absetzen können. Wenn eine zu große Menge aufgenommen wird, muss die Pipette entleert und neu befüllt werden.
29. Anschließend so viel Substratlösung (Nummer 17) hinzugeben, dass sich in dem Gemisch eine Konzentration von jeweils 2 g/l Nährbouillon, Hefeextrakt und D-Glucose ergibt; die Testflaschen dabei kontinuierlich mit gasförmigem Stickstoff spülen. Die Testchargen könnten z. B. so aussehen:

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

Gesamtinhalt der Flasche = 160 ml, Flüssigkeitsvolumen = 103 ml,

Gasvolumen = 57 ml oder 35,6 % des Gesamtvolumens.

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

Kontrollen und Referenzchemikalie

31. Mindestens drei Replikate an Flaschen, die jeweils nur Schlamm und Substrat enthalten, als Kontrollen ansetzen. Des Weiteren Replikate an Flaschen mit Schlamm, Substrat und hinreichend Stammlösung der Referenzchemikalie — 3,5-Dichlorphenol (Nummer 21) — mit einer Endkonzentration von 150 mg/l vorbereiten. Diese Konzentration sollte die Gasproduktion um etwa 50 % hemmen. Alternativ kann eine Konzentrationsreihe mit der Referenzchemikalie hergestellt werden. Zudem vier zusätzliche Flaschen mit Schlamm, sauerstofffreiem Wasser und Substrat für pH-Messungen ansetzen. In zwei der Flaschen die Prüfchemikalie in der höchsten zu prüfenden Konzentration geben; zu den beiden übrigen Flaschen sauerstofffreies Wasser geben.

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

Inkubation der Flaschen

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

Druckmessung

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

Messung des pH-Werts

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

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Darstellung der Ergebnisse

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

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

Dabei sind:

I = Hemmung in Prozent (%);

P_i = der erzeugte Gasdruck in Pascal (Pa) in den Flaschen mit Prüfmaterial zum gewählten Zeitpunkt;

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

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

38. Berechnet wird entweder die durch die Konzentration der Referenzchemikalie bewirkte prozentuale Hemmung (wenn nur eine Konzentration verwendet wurde) oder der EC_{50} -Wert (wenn eine hinreichende Anzahl an Konzentrationen untersucht wurde).
39. Den mittleren Druck des in der Kontrolle erzeugten Gases P_c (Pa) mit Hilfe der Kalibrierkurve des Druckmessers (Anlage 2) in Volumen umrechnen; aus dem erhaltenen Wert sodann die Gasproduktion innerhalb von 48 Stunden als für 100 ml unverdünntem Schlamm mit einer Feststoffkonzentration von 2 % (20 g/l) bis 4 % (40 g/l) erzeugtes Volumen berechnen.

Validitätskriterien

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

Prüfbericht

42. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfchemikalie

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

Prüfbedingungen

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

Ergebnisse

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

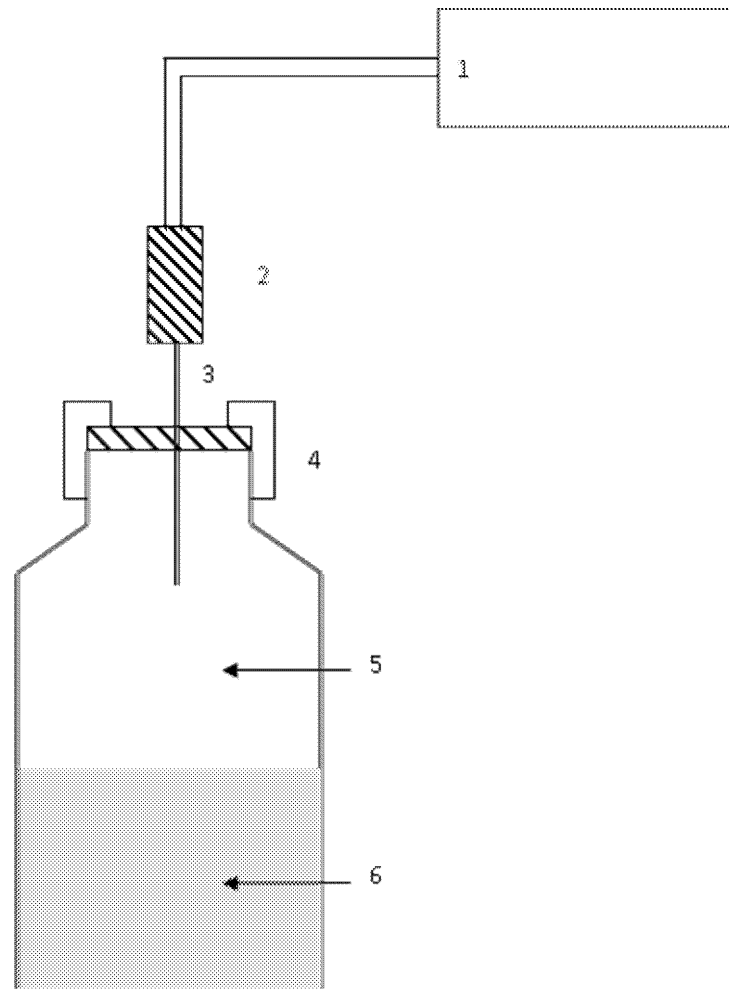
LITERATUR

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

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

Anlage 1

Muster einer Apparatur zur Messung der Biogasproduktion anhand des Gasdrucks



Legende:

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

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

Anlage 2

Umrechnung der Druckmesswerte

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

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

Anlage 3

Bekannte Faktoren, die Ergebnisse verfälschen könnena) *Qualität der Flaschenverschlüsse*

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

b) *Feuchtigkeit in der Spritzenadel*

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

c) *Verunreinigung durch Sauerstoff*

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

d) *Grobe Substratpartikel im Schlamm*

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

e) *Flüchtige Prüfchemikalien*

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

f) *Nichtlinearität der Gasproduktion*

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

Anlage 4

Anwendung auf Umweltproben mit niedriger Biomassekonzentration — Anaerobe Schlämme, Sedimente usw.

EINLEITUNG

- A.1 Im Allgemeinen ist die spezifische mikrobielle Aktivität (erzeugtes Gasvolumen pro g trockener Feststoffe) in natürlich vorkommenden anaeroben Schlämmen, Sedimenten, Böden usw. deutlich geringer als bei anaeroben Faulschlämmen aus Abwässern. Wenn die Hemmwirkung von Chemikalien bei diesen weniger aktiven Proben gemessen werden soll, müssen daher einige Versuchsparameter modifiziert werden. Bei diesen weniger aktiven Proben kommen zwei allgemeine Vorgehensweisen in Betracht:
- Um eine genauere Simulation (siehe ISO 13 641, Teil 1) zu ermöglichen, einen modifizierten Vorversuch (Nummer 25) mit der unverdünnten Probe Schlamm, Boden usw. bei 35 ± 2 °C oder der am Ort der Probenahme vorherrschenden Temperatur durchführen;
 - oder die Prüfung mit einem (im Verhältnis 1:100) verdünnten Faulschlamm durchführen, um die von der Umweltprobe erwartete geringere Aktivität zu simulieren; dabei allerdings die Temperatur von 35 ± 2 °C beibehalten (siehe ISO 13 641, Teil 2).
- A.2 Option a) kann nach der hier beschriebenen Methode (wie ISO 13 641, Teil 1) durchgeführt werden; entscheidend ist jedoch, dass im Vorversuch (Nummer 25) optimale Bedingungen bestimmt werden (wenn diese nicht bereits aus früheren Versuchen bekannt sind). Die Schlamm- oder die Sedimentprobe gründlich mischen (z. B. in einem Mischer) und falls notwendig mit einer kleinen Menge entlüfteten Verdünnungswassers (Nummer 14) so verdünnen, dass sie flüssig genug ist, um von einer Pipette mit großer Öffnung oder von einem Messzylinder aufgenommen zu werden. Ist davon auszugehen, dass Nährstoffe fehlen könnten, kann die Schlammprobe (unter anaeroben Bedingungen) zentrifugiert und in dem mit dem Hefeextrakt versetzten mineralischen Medium (A.11) neu suspendiert werden.
- A.3 Option b): Dieses Vorgehen gewährleistet die Simulation von schwach aktiven Umweltproben in ausreichender Art und Weise, allerdings fehlt bei diesen Proben die hohe Konzentration an suspendierten Feststoffen. Die Bedeutung dieser Feststoffe im Hinblick auf die Hemmung ist nicht bekannt, die Reaktion zwischen den Prüfchemikalien und den Schlammbestandteilen sowie die Adsorption der Prüfchemikalien an die Feststoffe könnte jedoch die Toxizität der Prüfchemikalie verringern.
- A.4 Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Temperatur: Im Interesse einer genauen Simulation sollten die Tests bei der am Ort der Probenahme vorherrschenden Temperatur durchgeführt werden, da andere Gruppen methanproduzierender Bakteriengemeinschaften bekanntermaßen innerhalb anderer Temperaturbereiche aktiv sind; so z. B. thermophile Bakterien bei ~ 30 - 35 °C, mesophile Bakterien bei 20 - 25 °C und psychrophile Bakterien bei < 20 °C; entsprechend können sich unterschiedliche Verläufe der Hemmungseffekte ergeben.
- A.5 Dauer: Bei der allgemeinen Prüfung, Teil 1, (mit unverdünntem Schlamm) wurde in den vorgesehenen 2-4 Tagen stets genügend Gas produziert, während die Gasproduktion bei Teil 2 (mit hundertfach verdünntem Schlamm) im Ringtest nicht ausreichend war (soweit überhaupt Gas produziert wurde). Madsen et. al. (1996) erklären in ihrer Beschreibung des letztgenannten Tests, dass mindestens 7 Tage vorgesehen werden sollten.

Test mit niedriger Biomassekonzentration (Option b)

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

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

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

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

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

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

‚Phosphorsäure (H₃PO₄), 85 Masse- % in Wasser.‘

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

‚Für diesen Test ist eine Endkonzentration von 0,20 ± 0,05 g/l Gesamttrockenfeststoff insgesamt zu verwenden.‘

A.10 Nummer 17. Prüfsubstrat

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

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

Nach Nummer 17 ist folgender Text anzufügen:

a) Mineralisches Prüfmedium, mit Hefextrakt

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

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

wasserfreiem Kalium-dihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	2,7 g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	4,4 g
(oder 11,2 g Dodecahydrat)	5,3 g
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ 2H ₂ O)	0,75 g
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ 6H ₂ O)	1,0 g
Eisen(II)-Chloridtetrahydrat (FeCl ₂ 4H ₂ O)	0,2 g
Resazurin (Redoxindikator)	0,01 g
Natriumsulfid-Nonahydrat (Na ₂ S 9H ₂ O)	1,0 g
(oder Titan-(III)-citrat) Endkonzentration	0,8 mmol/l bis 1,0 mmol/l
Spurenelementelösung (siehe Nummer 17 Buchstabe c; A.13)	10,0 ml
Hefextrakt	100 g

In Verdünnungswasser lösen (Nummer 14) und auf 1 000 ml auffüllen.

A.13 c) Spurenelementelösung, hergestellt aus:

Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat (MnCl ₂ 4H ₂ O)	0,5 g
Orthoborsäure (H ₃ BO ₃)	0,05 g

Zinkchlorid (ZnCl ₂)	0,05 g
Kupfer-(II)-chlorid (CuCl ₂)	0,03 g
Natriummolybdat-Dihydrat (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0,01 g
Kobalt-(II)-chlorid-Hexahydrat (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	1,0 g
Nickel-(II)-chlorid-Hexahydrat (NiCl ₂ ·6H ₂ O)	0,1 g
Dinatriumselenit (Na ₂ SeO ₃)	0,05 g

In Verdünnungswasser lösen (Nummer 14) und auf 1 000 ml auffüllen.'

A.14 Nummer 25: Vorversuch

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

Hinweis: Im Ringtest (5) war das Volumen des Kopfraums mit 75 % des Gesamtvolumens erheblich zu groß; es sollte im empfohlenen Bereich von 10 bis 40 % liegen. Das Volumen des Kopfraums sollte so gewählt werden, dass die produzierte Gasmenge bei einer Hemmung von etwa 80 % noch mit annehmbarer Genauigkeit (z. B. ± 5 bis ± 10 %) gemessen werden kann.

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

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

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

A.16 Nummer 33: Inkubation der Flaschen

Da eine geringere Gasproduktion zu erwarten ist, sollte die Inkubationsdauer auf mindestens 7 Tage verlängert werden.

A.17 Nummer 34: Druckmessungen

Die Messung des Drucks im Kopfraum der Flaschen erfolgt nach dem unter Nummer 34 beschriebenen Verfahren, wenn die Mengenangaben in der gasförmigen Phase benötigt werden. Sollen die CO₂- plus CH₄-Gesamtmengen gemessen werden, zunächst den pH-Wert der flüssigen Phase auf etwa pH 2 reduzieren, indem H₃PO₄ in die jeweiligen Flaschen injiziert wird; anschließend nach 30-minütigem Schütteln bei Testtemperatur der Druck messen. Mehr Informationen zur Qualität des Inokulums können allerdings ermittelt werden, indem der Druck in den einzelnen Flaschen vor und nach der Reduzierung des pH-Werts gemessen wird. Wenn beispielsweise die CO₂-Produktionsrate erheblich über der Methan-Produktionsrate liegt, kann dies die Empfindlichkeit der fermentativen Bakterien verändern und/oder die Prüfchemikalie wirkt vor allem auf methanogene Bakterien.

A.18 Nummer 36: Messung des pH-Werts

Wenn H₃PO₄ verwendet werden soll, sind speziell für die pH-Messungen einige zusätzliche Flaschen ohne H₃PO₄ vorzubereiten.

LITERATUR:

Madsen, T, Rasmussen, H.B., und Nilsson, L. (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Dänische Umweltagentur, Kopenhagen.

Tabelle A.1.

Versuchspläne für Testchargen — Beispiele

Bestandteile des Reaktionsgemischs	Beispiel 1	Beispiel 2	Normale Reihenfolge der Zugabe
Konzentration des präparierten Inokulums (g/l)	0,42	2,1	—
Volumen des zugegebenen Inokulums (ml)	45	9	4
Konzentration des Inokulums in den Testflaschen (g/l)	0,20	0,20	—
Volumen des zugegebenen Prüfmediums (ml)	9	9	2
Volumen des zugegebenen Verdünnungswassers (ml)	36	72	3
Konzentration des Hefeextrakts in den zu Testflaschen (g/l)	9,7	9,7	—
Volumen der Stammlösung mit der Prüfchemikalie (ml)	3	3	1
Gesamtflüssigkeitsvolumen (ml)	93	93	—

*Anlage 5***Begriffsbestimmungen**

Für diese Prüfmethode gelten die folgenden Definitionen:

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch.

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

C.35 SEDIMENT-WASSER-TOXIZITÄTSSTUDIE MIT DOTIERTEM SEDIMENT AN LUMBRICULUS

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 225 (2007). Sedimentfressende endobenthische Tiere werden durch in Sedimenten gebundene Chemikalien potenziell stark belastet und verdienen folglich besonderes Augenmerk (z. B. (1)(2)(3)). Unter diesen Sedimentfressern nehmen aquatische Oligochaeten in den Sedimenten aquatischer Systeme einen bedeutenden Platz ein. Durch Bioturbation der Sedimente und als Beutetiere haben diese Tiere erheblichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit sedimentgebundener Chemikalien für andere Organismen (z. B. benthivore Fische). Im Gegensatz zu epibenthischen Organismen graben sich endobenthische aquatische Oligochaeten (z. B. *Lumbriculus variegatus*) in die Sedimente ein und nehmen Partikel unterhalb der Sedimentoberfläche auf. Dies gewährleistet, dass die Testorganismen der Prüfchemikalie über alle möglichen Aufnahmewege ausgesetzt werden (z. B. Kontakt mit kontaminierten Sedimentpartikeln und orale Aufnahme dieser Partikel, aber auch Aufnahme über Poren- und Überstandswasser).
2. Diese Prüfmethode wurde zur Bewertung der Wirkung einer längerfristigen Exposition des endobenthischen Oligochaeten *Lumbriculus variegatus* (Müller) gegenüber sedimentgebundenen Chemikalien entwickelt. Sie beruht auf bereits bestehenden Testprotokollen für Sedimenttoxizität und -bioakkumulation (z. B. (3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)). Die Methode wird für statische Prüfbedingungen beschrieben. Bei dem für diese Prüfmethode verwendeten Expositionsszenario wird das Sediment mit der Prüfchemikalie dotiert. Mit dotierten Sedimenten soll ein mit der Prüfchemikalie kontaminiertes Sediment simuliert werden.
3. In der Regel haben auf Toxizität bei sedimentbewohnenden Organismen zu prüfende Chemikalien eine lange Verweildauer in diesem Kompartiment. Sedimentbewohner können über verschiedene Wege exponiert werden. 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 des betreffenden Stoffes und seinem Verhalten im tierischen Organismus ab. Für stark adsorbierende Chemikalien (z. B. $\log K_{ow} > 5$) oder für kovalent an das Sediment gebundene Chemikalien kann die Aufnahme über die Nahrung ein wichtiger Expositionspfad sein. Um die Toxizität dieser Chemikalien nicht unterzubewerten, wird das für die Vermehrung und das Wachstum der Testorganismen erforderliche Futter dem Sediment zugegeben, bevor es mit der Prüfchemikalie dotiert wird (11). Die beschriebene Prüfmethode ist detailliert genug, um die Prüfung durchführen und den Versuchsplan je nach Bedingungen in den einzelnen Labors und den unterschiedlichen Eigenschaften der Prüfchemikalien anpassen zu können.
4. Die Prüfmethode dient der Ermittlung der Wirkungen einer Prüfchemikalie auf die Reproduktion und die Biomasse der Testorganismen. Als biologische Parameter werden die Gesamtzahl der überlebenden Würmer und die Biomasse (Trockenmasse) am Ende der Expositionsdauer gemessen. Diese Daten werden entweder anhand eines Regressionsmodells zur Ermittlung der Konzentration analysiert, bei der eine Wirkung von x % auftreten würde (z. B. EC_{50} , EC_{25} und EC_{10}), oder es wird eine statistische Hypothesenprüfung vorgenommen, um die höchste messbare Expositionskonzentration ohne statistisch signifikante Wirkung (NOEC-Wert) und die niedrigste messbare Konzentration, bei der noch statistisch signifikante Wirkungen beobachtet werden (LOEC-Wert), zu bestimmen.
5. Kapitel C.27 dieses Anhangs ('Sediment-Wasser-Toxizitätstest mit gespiktem Sediment an Chironomiden' (6)) enthält viele wichtige und nützliche Informationen zur Durchführung der vorliegenden Sedimenttoxizitätsstudie. Dieses Dokument dient daher als Grundlage für die zur Durchführung von Sedimenttoxizitätstests mit *Lumbriculus variegatus* erforderlichen Modifikationen. Weitere Referenzdokumente sind z. B. der ASTM Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates (3), die U.S. EPA Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates (7) und die ASTM Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates (12). Wichtige Informationsquellen für die Erarbeitung dieses Dokuments waren außerdem die in Ringtests der Prüfmethode ((13), Ringtest-Bericht) gewonnenen praktischen Erfahrungen sowie Informationen aus der Fachliteratur.

VORAUSSETZUNGEN UND PRAKTISCHE HINWEISE

6. Vor Beginn der Studie sind Informationen zur Prüfchemikalie (z. B. Sicherheitsvorkehrungen, geeignete Lagerbedingungen und Analysemethoden) einzuholen. Für Leitlinien für Prüfchemikalien mit physikalisch-chemischen Eigenschaften, die die Durchführung des Tests erschweren, siehe (14).

7. Vor der Durchführung einer Prüfung sollte Folgendes über die Prüfchemikalie bekannt sein:
 - Name, chemische Bezeichnung (vorzugsweise IUPAC-Bezeichnung), Strukturformel, CAS-Nummer, Reinheit;
 - Dampfdruck;
 - Wasserlöslichkeit;
8. Die folgenden zusätzlichen Informationen gelten als hilfreich:
 - Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient, K_{ow} ;
 - organischer Kohlenstoff/Wasser-Verteilungskoeffizient, ausgedrückt als K_{oc} ;
 - Hydrolyse;
 - Phototransformation in Wasser;
 - biologische Abbaubarkeit;
 - Oberflächenspannung.
9. Informationen über bestimmte Eigenschaften des zu verwendenden Sediments sollten ebenfalls vor Beginn des Versuchs vorliegen (7). Für Einzelheiten siehe Nummern 22 bis 25.

TESTPRINZIP

10. Würmer in vergleichbarem physiologischem Zustand (synchronisiert wie in Anlage 5 beschrieben) werden einer Reihe von Giftstoffkonzentrationen ausgesetzt, die der Sedimentphase eines Sediment-Wasser-Systems zugesetzt wurden. Als Medien sollten künstliches Sediment und rekonstituiertes Wasser verwendet werden. Als Kontrollen werden Prüfgefäße ohne Prüfchemikalie verwendet. Die Prüfchemikalie wird für jede Konzentration in einem einzigen Schritt in das Sediment dotiert, um Schwankungen zwischen Replikaten der einzelnen Konzentrationen zu minimieren; die Testorganismen werden anschließend in die Prüfgefäße gesetzt, in denen Sediment-Wasser-Konzentrationen äquilibriert wurden (siehe Nummer 29). Die Testtiere werden in den Sediment-Wasser-Systemen 28 Tage lang exponiert. Aufgrund seines niedrigen Nährstoffgehalts sollte das künstliche Sediment mit Futter angereichert werden (siehe Nummern 22 und 23 sowie Anlage 4), um sicherzustellen, dass die Würmer unter kontrollierten Bedingungen wachsen und sich vermehren. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass die Tiere sowohl über das Wasser und das Sediment als auch über das Futter exponiert werden.
11. Bevorzugter Endpunkt bei dieser Art von Studie ist der EC_x -Wert (z. B. EC_{50} , EC_{25} und EC_{10} , d. h. die Konzentration, bei der eine Wirkung von x % bei den Testorganismen beobachtet wird) für die Reproduktion bzw. die Biomasse im Vergleich zur Kontrolle. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass der EC_{50} -Wert — angesichts der hohen Unsicherheit niedriger EC_x -Werte (z. B. EC_{10} oder EC_{25}) mit extrem hohem 95 %-Konfidenzintervall (z. B. (15)) und der durch Hypothesenprüfungen ermittelten statistischen Aussagekraft — als robustester Endpunkt betrachtet wird. Außerdem lassen sich für Biomasse und Reproduktion NOEC- und LOEC-Werte ermitteln, wenn Versuchsplan und verfügbares Datenmaterial diese Berechnungen gestatten (siehe Nummern 34 bis 38). Der Versuchsplan richtet sich nach dem Zweck der Studie, d. h. der Ableitung des EC_x -Werts oder des NOEC-Wertes.

REFERENZPRÜFUNG

12. Es wird davon ausgegangen, dass das Verhalten der Kontrollorganismen hinreichend dokumentiert, dass ein Labor zur Durchführung der Prüfung in der Lage und — soweit historische Daten vorliegen — die Prüfung wiederholbar ist. Zusätzlich können in regelmäßigen Abständen mithilfe eines Referenzgiftstoffs Referenz-Toxizitätstests durchgeführt werden, um die Empfindlichkeit der Testorganismen zu bestimmen. Mit 96 Stunden-Referenz-Toxizitätstests ausschließlich in Wasser können Empfindlichkeit und Zustand der Versuchstiere zufriedenstellend demonstriert werden (4)(7). Informationen über die Toxizität von Pentachlorphenol (PCP) in vollständigen Tests (28-tägige Exposition gegenüber dem dotierten Sediment) sind Anlage 6 sowie dem Bericht über den Ringtest dieser Prüfmethode (13) zu entnehmen. Für die akute Toxizität von PCP in Wasser siehe beispielsweise (16). Diese Informationen können für den Vergleich der Empfindlichkeit des Testorganismus in Referenzprüfungen mit PCP als Referenzgiftstoff verwendet werden. Kaliumchlorid (KCl) oder Kupfersulfat ($CuSO_4$) wurden als Referenzgiftstoffe für *L. variegatus* empfohlen (4)(7). Bislang ist es noch schwierig, Qualitätskriterien anhand von KCl-Toxizitätsdaten festzulegen, da Daten über *L. variegatus* in der Literatur nicht verfügbar sind. Für Informationen zur Toxizität von Kupfer für *L. variegatus* siehe (17) bis (21).

VALIDITÄT DES TESTS

13. Damit der Test als gültig anerkannt werden kann, sollten die folgenden Anforderungen erfüllt sein:
- Ein Ringtest (13) hat gezeigt, dass sich die durchschnittliche Anzahl lebender Würmer (*Lumbricus variegatus*) pro Replikat in den Kontrollen am Ende der Expositionsdauer gegenüber der Anzahl Würmer pro Replikat zu Beginn der Exposition mindestens um das 1,8-Fache erhöht hat.
 - Der pH-Wert des Überstandswassers muss während der gesamten Prüfung zwischen 6 und 9 liegen.
 - Die Sauerstoffkonzentration im Überstandswasser darf bei Testtemperatur nicht weniger als 30 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes (*Air Saturation Value*, ASV) betragen.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

Prüfsystem

14. Nach Möglichkeit sollten statische Systeme verwendet werden, bei denen das Überstandswasser nicht erneuert wird. Ist das Sediment/Wasser-Verhältnis (siehe Nummer 15) angemessen, reicht im Allgemeinen eine schwache Belüftung aus, um eine annehmbare Wasserqualität für die Testorganismen zu gewährleisten (z. B. Maximierung des Anteils an gelöstem Sauerstoff und Minimierung der Anreicherung von Ausscheidungsprodukten). Semistatische Systeme oder Durchflusssysteme mit intermittierender oder ständiger Erneuerung des Überstandswassers sollten nur in Ausnahmefällen verwendet werden, denn es ist davon auszugehen, dass die regelmäßige Erneuerung des Überstandswassers das chemische Gleichgewicht beeinträchtigt (z. B. durch Verluste der Prüfchemikalie aus dem Prüfsystem).

Prüfgefäße und Apparatur

15. Die Exposition erfolgt in 250-ml-Bechergläsern mit einem Durchmesser von 6 cm. Andere Glasgefäße können verwendet werden, sofern sie eine angemessene Tiefe von Überstandswasser und Sediment gewährleisten. In jedes Gefäß wird eine Schicht von etwa 1,5-3 cm des formulierten Sediments gegeben. Das Verhältnis zwischen Sedimentschichttiefe und Überstandswassertiefe beträgt 1:4. Die Gefäße müssen ein der Besatzrate (d. h. der Anzahl der pro Gewichtseinheit des Sediments eingesetzten Würmer) angemessenes Fassungsvermögen haben (siehe auch Nummer 39).
16. Prüfgefäße und sonstige Apparaturen, die mit der Prüfchemikalie in Berührung kommen, sollten vollständig aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Material bestehen. Die Verwendung von Materialien, die sich auflösen können, die Prüfchemikalien absorbieren oder andere Chemikalien freisetzen bzw. den Testorganismen schaden können, sollte für alle verwendeten Teile möglichst vermieden werden. Geräte, die mit den Prüfmedien in Berührung kommen, können aus Polytetrafluorethylen (PTFE), rostfreiem Stahl und/oder Glas bestehen. Bei organischen Chemikalien, die auf Glas bekanntermaßen adsorbiert werden, kann silanisiertes Glas erforderlich sein. In solchen Fällen muss das Gerät nach der Benutzung entsorgt werden.

Testspezies

17. Die für diese Art von Studie zu verwendende Spezies ist der Süßwasser-Oligochaet *Lumbricus variegatus* (Müller). Diese Art ist gegenüber einer Vielzahl von Sedimenttypen tolerant und wird allgemein für Sedimenttoxizitäts- und -bioakkumulationstests verwendet (z. B. (3), (5), (7), (9), (13), (15), (16), (22), (23), (24), (25), (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33), (34) und (35)). Die Herkunft der Testtiere, die Artbestimmung (z. B. (36)) und die Kulturbedingungen sind zu protokollieren. Die Art braucht nicht vor jeder Prüfung neu bestimmt zu werden, wenn die Organismen aus einer Laborkultur stammen.

Anzucht der Testorganismen

18. Damit eine ausreichende Anzahl Würmer für die Sediment-Toxizitätstests verfügbar ist, empfiehlt es sich, die Würmer in einer Dauerkultur vorrätig zu halten. Für Hinweise zu Laborkulturmethoden für *Lumbricus variegatus* sowie Bezugsquellen für Ausgangskulturen siehe Anlage 5. Für nähere Informationen zur Kultivierung dieser Art siehe (3), (7) und (27).
19. Um sicherzustellen, dass die Tests mit Tieren derselben Art durchgeführt werden, wird die Herstellung von Monospezies-Kulturen dringend empfohlen. Dabei ist sicherzustellen, dass die Kulturen und insbesondere die in den Tests verwendeten Würmer keine erkennbaren Anzeichen von Krankheiten und Anomalien aufweisen.

Wasser

20. Als Überstandswasser für die Tests wird rekonstituiertes Wasser (siehe Kapitel C.1 dieses Anhangs) (37) empfohlen. Dieses Testwasser kann auch für die Laborzucht der Würmer verwendet werden (für die Aufbereitung des Wassers siehe Anlage 2). Falls erforderlich, kann auch natürliches Wasser verwendet werden. Das gewählte Testwasser sollte so beschaffen sein, dass die Testspezies während der Akklimatisierungs- und Testphasen weiter wachsen und sich vermehren kann, ohne Abweichungen in Aussehen oder Verhalten zu entwickeln. Es wurde nachgewiesen, dass *Lumbriculus variegatus* in diesem Testwasser überlebt, wächst und sich vermehrt (30), und so eine maximale Standardisierung der Test- und Kulturbedingungen gewährleistet ist. Wenn rekonstituiertes Wasser verwendet wird, sollte seine Zusammensetzung protokolliert und das Testwasser vor der Verwendung charakterisiert werden (zumindest pH-Wert, Sauerstoffgehalt und Härte, letztere ausgedrückt in mg CaCO₃/l). Außerdem kann es sinnvoll sein, das Testwasser vor der Verwendung auf Mikroschadstoffe zu untersuchen (siehe z. B. Anlage 3).
21. Der pH-Wert des Überstandswassers sollte im Bereich 6,0-9,0 liegen (siehe Nummer 13). Wird mit einer verstärkten Ammoniakbildung gerechnet, sollte der pH-Wert auf 6,0-8,0 korrigiert werden. Für die Prüfung z. B. schwacher organischer Säuren empfiehlt es sich, den pH-Wert durch Puffern des Testwassers anzupassen, wie z. B. unter (16) beschrieben. Die Gesamthärte des Testwassers sollte bei natürlichem Wasser zwischen 90 und 300 mg CaCO₃ pro Liter betragen. Anlage 3 enthält zusätzliche Kriterien für akzeptables Testwasser im Sinne der OECD-Prüfrichtlinie 210 (38).

Sediment

22. Da unkontaminierte natürliche Sedimente von einem bestimmten Herkunftsort möglicherweise nicht ganzjährig verfügbar sind und darin vorhandene Infauna (Endofauna) und vorhandene Mikroschadstoffe den Test beeinflussen können, ist vorzugsweise ein formuliertes Sediment (auch bezeichnet als rekonstituiertes, künstliches oder synthetisches Sediment) zu verwenden. Durch die Verwendung eines formulierten Sediments werden Schwankungen bei den Testbedingungen und die Gefahr der Eintragung von im Sediment enthaltenen Organismen (Infauna) auf ein Mindestmaß begrenzt. Das folgende formulierte Sediment basiert auf dem künstlichen Sediment gemäß (6), (39) und (40). Es wird für diese Art von Prüfung empfohlen (siehe (6), (10), (30), (41), (42), (43)):
- 4-5 % (bezogen auf die Trockenmasse) Sphagnumtorf: Wichtig ist, dass der Torf in Pulverform (Zersetzungsgrad ‚mittel‘), fein gemahlen (Partikelgröße ≤ 0,5 mm) und ausschließlich luftgetrocknet verwendet wird;
 - 20 ± 1 % (bezogen auf die Trockenmasse) Kaolin-Ton (Kaolingehalt vorzugsweise über 30 %);
 - 75-76 % (bezogen auf die Trockenmasse) Quarzsand (feiner Sand, Korngröße ≤ 2 mm, > 50 % der Partikel sollten eine Korngröße zwischen 50 und 200 µm haben);
 - entionisiertes Wasser, 30–50 % bezogen auf die Trockenmasse des Sediments, zusätzlich zu den trockenen Sedimentbestandteilen;
 - chemisch reines Calciumcarbonat (CaCO₃), das zugegeben wird, um den pH-Wert der fertigen Mischung des Sediments einzustellen;
 - der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) der fertigen Mischung sollte 2 % (± 0,5 %), bezogen auf die Trockenmasse des Sediments, betragen und ist durch Zugabe von geeigneten Mengen Torf und Sand (siehe Buchstaben a und c) sicherzustellen;
 - Futter, beispielsweise fein gemahlene Brennnesselblätter (*Urtica* sp., gemäß Arzneimittelstandards, für den menschlichen Verzehr), oder eine Mischung aus fein gemahlenden Blättern von *Urtica* sp. mit Alpha-Cellulose (1:1), in einem Anteil von 0,4-0,5 %, bezogen auf die Trockenmasse des Sediments, zusätzlich zu den trockenen Sedimentbestandteilen; für nähere Informationen siehe Anlage 4.
23. Die Herkunft von Torf, Kaolin-Ton, Futtermaterial und Sand sollte bekannt sein. Zusätzlich zu Buchstabe g sind in Kapitel C.27 dieses Anhangs (6) alternative Pflanzenmaterialien aufgelistet, die als Nährstoffe dienen können: getrocknete Maulbeerblätter (*Morus alba*), Weißklee (*Trifolium repens*), Spinat (*Spinacia oleracea*) oder Getreidegräser.
24. Das gewählte Futter sollte hinzugegeben werden, bevor oder während das Sediment mit der Prüfchemikalie dotiert wird. Die Futterquelle sollte zumindest eine akzeptable Vermehrung in den Kontrollen ermöglichen. Eine vor Gebrauch durchgeführte Analyse des künstlichen Sediments oder seiner Bestandteile auf

Mikroschadstoffe könnte nützliche Informationen liefern. Ein Beispiel für die Herstellung des formulierten Sediments ist in Anlage 4 gegeben. Trockene Bestandteile können auch gemischt werden, sofern es nach Zugabe des Überstandswassers nachweislich nicht zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile (z. B. schwimmende Torfpartikel) kommt und der Torf oder das Sediment ausreichend konditioniert ist (siehe auch Nummer 25 und Anlage 4). Das künstliche Sediment sollte zumindest nach der Herkunft seiner Bestandteile, der Korngrößenverteilung (Prozentanteil an Sand, Schlick und Ton), dem gesamten organischen Kohlenstoff (TOC), dem Wassergehalt und dem pH-Wert charakterisiert werden. Die Messung des Redoxpotenzials ist fakultativ.

25. Soweit (beispielsweise für spezifische Tests) erforderlich, können auch natürliche Sedimente von unkontaminierten Standorten als Test- und/oder Kultursedimente dienen (3). Wenn natürliches Sediment verwendet wird, sollte dieses allerdings zumindest nach Herkunft (Entnahmeort), pH-Wert und Ammoniakgehalt des Porenwassers, gesamtem organischem Kohlenstoff (TOC) und Stickstoffgehalt, Partikelgrößenverteilung (Prozentanteil an Sand, Schlick und Ton) und Wassergehalt (in %) (7) charakterisiert werden; außerdem muss das Sediment frei von Schadstoffen und sonstigen Organismen sein, die mit den Testorganismen konkurrieren oder diese fressen könnten. Die Messung des Redoxpotenzials und der Kationenaustauschkapazität ist fakultativ. Ferner wird empfohlen, natürliches Sediment vor dem Dotieren mit der Prüfchemikalie sieben Tage lang unter den Bedingungen des anschließenden Tests zu konditionieren. Nach dieser Konditionierung ist das Überstandswasser zu entfernen und zu verwerfen.
26. Das zu verwendende Sediment sollte von einer Qualität sein, die gewährleistet, dass die Kontrollorganismen während der Exposition überleben und sich vermehren können, ohne Abweichungen in Aussehen oder Verhalten zu entwickeln. Die Kontrollwürmer sollten sich in das Sediment eingraben und das Sediment aufnehmen. Die Vermehrung in den Kontrollen sollte mindestens das Validitätskriterium gemäß Nummer 13 erfüllen. Das Vorhandensein bzw. Fehlen von Fäkalpellets auf der Oberfläche des Sediments (die auf Sedimentaufnahme hinweisen), ist zu protokollieren und kann bei der Auswertung der Testergebnisse hinsichtlich der Expositionspfade nützlich sein. Weitere Informationen über die Sedimentaufnahme können durch die unter (24), (25), (44) und (45) beschriebenen Methoden eingeholt werden, die der Bestimmung der Sedimentaufnahme oder der Wahl der Partikel durch die Testorganismen dienen.
27. Verfahren für die Handhabung natürlicher Sedimente vor der Verwendung im Labor sind unter (3), (7) und (12) beschrieben. Für die Aufbereitung und Lagerung des für den Versuch mit *Lumbriculus* empfohlenen künstlichen Sediments siehe Anlage 4.

Applikation der Prüfchemikalie

28. Die Prüfchemikalie wird in das Sediment dotiert. Da die meisten Prüfchemikalien wahrscheinlich nur schwach wasserlöslich sind, sollten sie zur Herstellung der Stammlösung in der kleinstmöglichen Menge eines geeigneten organischen Lösungsmittels (z. B. Aceton, n-Hexan oder Cyclohexan) gelöst werden. Die Stammlösung sollte mit demselben Lösungsmittel gelöst werden, um die Testlösungen herzustellen. Hauptkriterien für die Wahl des geeigneten Lösungsvermittlers sollten die Toxizität und Flüchtigkeit des Lösungsmittels und die Löslichkeit der Prüfchemikalie in dem gewählten Lösungsmittel sein. Für jede Konzentration ist dasselbe Volumen der entsprechenden Lösung zu verwenden. Das Sediment sollte für jede Konzentration in einem einzigen Schritt dotiert werden, um Schwankungen bei den Prüfchemikalienkonzentrationen zwischen den einzelnen Replikaten zu minimieren. Die Testlösungen anschließend mit Quarzsand vermischen, wie unter Nummer 22 beschrieben (z. B. 10 g Quarzsand pro Prüfgefäß). Erfahrungsgemäß reicht ein Volumen von 0,20-0,25 ml pro g Quarzsand aus, um den Sand vollständig zu durchtränken. Das Lösungsmittel anschließend verdampfen, bis der Sand vollständig getrocknet ist. Um (je nach Dampfdruck der Chemikalie) verflüchtigungsbedingte Prüfchemikalienverluste zu vermeiden, sollte der beschichtete Sand unmittelbar nach dem Trocknen verwendet werden. Den trockenen Sand mit einer geeigneten Menge eines formulierten Sediments der gewünschten Konzentration vermischen. Bei der Aufbereitung des Sediments die in der Mischung von Prüfchemikalie und Sand enthaltene Sandmenge berücksichtigen (d. h. das Sediment sollte mit möglichst wenig Sand hergestellt werden). Wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens ist, dass praktisch kein Lösungsmittel in das Sediment gelangt (7). Alternativ, z. B. bei Freilandsedimenten, kann die Prüfchemikalie auch hinzugegeben werden, indem ein getrockneter und fein gemahlener Anteil des Sediments dotiert wird (wie oben für Quarzsand beschrieben) oder indem die Prüfchemikalie in das feuchte Sediment eingerührt wird mit anschließender Verdampfung des verwendeten Lösungsvermittlers. Es ist darauf zu achten, dass die Prüfchemikalie mit dem Sediment gut durchmischt ist, um eine homogene Verteilung im Sediment zu gewährleisten. Erforderlichenfalls können Teilproben analysiert werden, um die Zielkonzentrationen im Sediment zu bestätigen und den Homogenitätsgrad zu bestimmen. Es kann auch sinnvoll sein, Teilproben der Testlösungen zu untersuchen, um auch dort die Zielkonzentrationen im Sediment zu bestätigen. Da zur Applikation der Prüfchemikalie auf den Quarzsand ein Lösungsmittel verwendet wird, sollte mit derselben Menge Lösungsmittel wie bei den Testsedimenten eine Lösungsmittelkontrolle angesetzt werden. Das verwendete Dotierungsverfahren und die Gründe für die Wahl eines anderen Verfahrens als oben beschrieben sollten angegeben werden. Das Dotierungsverfahren kann an die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie angepasst werden (z. B. um Verluste durch Verflüchtigung beim Dotieren oder Äquilibrieren zu vermeiden). Für weitere Hinweise zum Dotierungsverfahren siehe *Environment Canada (1995) (46)*.

29. Nachdem das dotierte Sediment hergestellt, in die Prüfgefäße für die Replikate gegeben und mit Testwasser aufgefüllt wurde, sollte ausreichend Zeit vorgesehen werden, damit sich die Prüfchemikalie aus dem Sediment in die wässrige Phase verteilen kann (z. B. (3)(7)(9)). Dies sollte möglichst unter den Temperatur- und Belüftungsbedingungen des Tests geschehen. Die erforderliche Äquilibrierungszeit ist sediment- und chemikalienabhängig und liegt gewöhnlich in der Größenordnung von Stunden bis Tagen, in seltenen Fällen beträgt sie mehrere Wochen (4 bis 5 Wochen) (z. B. (27)(47)). Bei diesem Test wird keine Gleichgewichtseinstellung abgewartet sondern es wird eine Äquilibrierungszeit von 48 Stunden bis zu 7 Tagen empfohlen, um die Zeit für einen Abbau der Prüfchemikalie zu minimieren. Je nach Zweck der Studie (z. B. Simulation von Umweltbedingungen) kann das dotierte Sediment für eine längere Dauer äquilibriert oder gealtert werden.
30. Nach dieser Äquilibrierungszeit sollten Proben zumindest aus dem Überstandswasser und dem Sediment entnommen werden, und zwar mindestens jeweils von der höchsten und einer niedrigeren Konzentration, um die Konzentration der Prüfchemikalie zu bestimmen. Diese analytischen Bestimmungen der Prüfchemikalie sollten die Berechnung der Massenbilanz und auf den gemessenen Ausgangskonzentrationen basierende Ergebnisse ermöglichen. In der Regel wird das Sediment-Wasser-System durch Probenahmen gestört oder zerstört. Daher können gewöhnlich für die Untersuchung von Sediment und Würmern nicht dieselben Replikate verwendet werden. Es müssen zusätzliche ‚Analytikgefäße‘ in geeigneter Größe bereitgestellt werden, die auf dieselbe Weise (inklusive Testorganismen) behandelt, die aber nicht für biologische Untersuchungen verwendet werden. Die Gefäßgröße ist so zu wählen, dass die für das jeweilige Analyseverfahren erforderlichen Probemengen aufgenommen werden können. Für nähere Informationen siehe Nummer 53.

DURCHFÜHRUNG DER PRÜFUNG

Vorversuch

31. Wenn keine Informationen über die Toxizität der Prüfchemikalie bei *Lumbriculus variegatus* verfügbar sind, kann die Durchführung eines Vorversuchs hilfreich sein, um den im Hauptversuch zu analysierenden Konzentrationsbereich zu ermitteln und die Bedingungen des endgültigen Tests zu optimieren. Zu diesem Zweck wird die Prüfchemikalie in einem breiten Konzentrationsbereich getestet. Die Würmer werden jeder Konzentration für eine bestimmte Zeit (z. B. 28 Tage wie im Hauptversuch) ausgesetzt, wodurch geeignete Testkonzentrationen ermittelt werden können. Replikate sind nicht erforderlich. Das Verhalten der Würmer (z. B. Meiden des Sediment), das durch die Prüfchemikalie und/oder das Sediment verursacht werden könnte, sollte im Vorversuch beobachtet und protokolliert werden. Konzentrationen über 1 000 mg/kg Sediment (Trockengewicht) sind im Vorversuch nicht zu untersuchen.

Hauptversuch

32. Im Hauptversuch mindestens fünf Konzentrationen verwenden, die beispielsweise nach dem Ergebnis des Vorversuchs (Nummer 31) ausgewählt werden, wie unter den Nummern 35, 36, 37 und 38 beschrieben.
33. Zusätzlich zu den Testreihen wird eine Kontrolle (für Replikate siehe Nummern 36, 37 und 38), die außer der Prüfchemikalie alle Testbestandteile enthält, angesetzt. Ein zur Applikation der Prüfchemikalie möglicherweise verwendeter Lösungsvermittler darf keine messbaren Wirkungen auf die Testorganismen haben; derartige Wirkungen lassen sich anhand einer zusätzlichen Kontrolle, die ausschließlich Lösungsmittel enthält, feststellen.

Versuchsplanung

34. Die Versuchsplanung regelt Zahl und Abstände der Testkonzentrationen, die Anzahl Prüfgefäße je Konzentration und die Zahl der auf die einzelnen Gefäße verteilten Würmer. Für die Verfahren zur Bestimmung der EC_x -Werte und der NOEC-Werte und für die Durchführung eines Limit-Tests siehe Nummern 35, 36, 37 und 38.
35. Die für den Test verwendeten Konzentrationen müssen in jedem Fall die Wirkungskonzentration (z. B. EC_{50} , EC_{25} und EC_{10}) und den Konzentrationsbereich, in dem die Wirkung der Prüfchemikalie von Interesse ist, einschließen. Extrapolierungen weit unterhalb der niedrigsten Konzentration mit Wirkung auf die Testorganismen oder oberhalb der höchsten getesteten Konzentration sind zu vermeiden. Wenn — in Ausnahmefällen — trotzdem eine Extrapolierung vorgenommen wird, ist dies im Bericht umfassend zu begründen.

36. Wenn EC_x -Werte bestimmt werden müssen, sollten mindestens fünf Konzentrationen und mindestens drei Replikate jeder Konzentration getestet werden. Um Schwankungen zwischen den Kontrollen besser abschätzen zu können, werden sechs Replikate für die Kontrolle bzw. — soweit verwendet — für die Lösungsmittelkontrolle empfohlen. Im Interesse einer angemessenen Modellierung ist es in jedem Fall ratsam, eine hinreichende Anzahl Konzentrationen zu testen. Die Konzentrationen sollten sich höchstens um den Faktor 2 unterscheiden (außer bei einer schwachen Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve). Die Anzahl Replikate pro Behandlung kann reduziert werden, wenn die Zahl der Prüfkonzentrationen mit Reaktionen im Bereich 5-95 % erhöht wird. Eine Erhöhung der Zahl der Replikate oder eine Verkürzung der Intervalle zwischen den Prüfkonzentrationen führt eher zu engeren Konfidenzintervallen für den Test.
37. Wenn LOEC- und NOEC-Werte bestimmt werden müssen, sollten mindestens fünf Testkonzentrationen mit mindestens vier Replikaten verwendet werden. Um Schwankungen zwischen den Kontrollen besser abschätzen zu können, werden sechs Replikate für die Kontrolle bzw. — soweit verwendet — für die Lösungsmittelkontrolle empfohlen. Die einzelnen Konzentrationen sollten sich höchstens um den Faktor 2 unterscheiden. Für Informationen zur statistischen Aussagekraft von Hypothesenprüfungen im Rahmen des Ringtests dieser Prüfmethode siehe Anlage 6.
38. Wenn (beispielsweise aufgrund eines Vorversuchs) bis zu 1 000 mg/kg Sediment (Trockengewicht) keine Wirkungen erwartet werden oder wenn bereits eine einzige Testkonzentration zur Bestätigung des maßgeblichen NOEC-Wertes ausreicht, kann (unter Verwendung einer Testkonzentration und von Kontrollen) ein Limit-Test durchgeführt werden. Im letztgenannten Fall ist die gewählte Limit-Konzentration im Prüfbericht detailliert zu begründen. Sinn und Zweck der Limit-Tests ist die Prüfung mit einer einzigen Konzentration, die so hoch ist, dass die Prüfer mögliche toxischen Wirkungen der Chemikalie ausschließen können; dabei wird das Limit auf einen Konzentrationswert festgesetzt, der unter realen Bedingungen nicht erreicht werden dürfte. Empfohlen wird eine Konzentration von 1 000 mg/kg (Trockengewicht). In der Regel sind mindestens sechs Replikate pro Behandlung und Kontrollen erforderlich. Für Informationen zur statistischen Aussagekraft von Hypothesenprüfungen im Rahmen des Ringtests dieser Prüfmethode siehe Anlage 6.

Expositionsbedingungen

Testorganismen

39. Der Versuch wird mit mindestens 10 Würmern je Replikat durchgeführt, das zur Bestimmung biologischer Parameter verwendet wird. Diese Anzahl Würmer entspricht in etwa 50-100 mg feuchter Biomasse. Ausgehend von einem Trockengewichtsanteil von 17,1 % (48) ergeben sich daraus ungefähr 9-17 mg trockene Biomasse pro Gefäß. U.S. EPA (2000 (7)) empfiehlt ein Füllverhältnis von höchstens 1:50 (trockene Biomasse: TOC). Für das unter Nummer 22 beschriebene Sediment entspricht dies etwa 43 g Sediment (Trockengewicht) pro 10 Würmer bei einem TOC von 2,0 % Trockensediment. Wenn mehr als 10 Würmer pro Gefäß verwendet werden, muss die Menge des Sediments und des Überstandswassers entsprechend angepasst werden.
40. Die für eine Prüfung verwendeten Würmer sollten alle aus derselben Quelle stammen und einen ähnlichen physiologischen Zustand aufweisen (siehe Anlage 5). Es sind Würmer ähnlicher Größe auszuwählen (siehe Nummer 39). Es wird empfohlen, vor dem Test eine Teilprobe der Charge oder des Wurmervorrats zu wiegen, um das Durchschnittsgewicht zu bestimmen.
41. Die für eine Prüfung zu verwendenden Würmer aus der Kultur nehmen (siehe Anlage 5). Große (adulte) Tiere, die keine Anzeichen einer kürzlich erfolgten Fragmentierung aufweisen, in Glasgefäße (z. B. Petrischalen) mit sauberem Wasser setzen und synchronisieren, wie in Anlage 5 beschrieben. Nach der Regeneration über einen Zeitraum von 10-14 Tagen unversehrte vollständige Würmer ähnlicher Größe, die nach einem leichten mechanischen Reiz aktiv schwimmen oder zu kriechen beginnen, für den Versuch auswählen. Wenn sich die Prüfbedingungen von den Kulturbedingungen unterscheiden (z. B. in Bezug auf Temperatur, Lichtverhältnisse und Überstandswasser) sollte eine Akklimatisierungsphase von beispielsweise 24 Stunden unter Testbedingungen bezüglich Temperatur, Lichtverhältnissen und Überstandswasser ausreichen, um die Anpassung der Würmer an die Prüfbedingungen zu ermöglichen. Die akklimatisierten Oligochaeten nach dem Zufallsprinzip auf die Prüfgefäße verteilen.

Fütterung

42. Da das Futter dem Sediment vor (oder während) der Applikation der Prüfchemikalie zugegeben wird, werden die Würmer während des Versuchs nicht weiter gefüttert.

Licht und Temperatur

43. Die Licht-/Dunkelphase bei Kultur und Prüfung beträgt gewöhnlich 16 Stunden (3)(7). Die Lichtintensität sollte gering gehalten werden (z. B. 100-500 lx), um auf der Oberfläche des Sediments natürliche Bedingungen zu simulieren; während der Exposition die Lichtintensität mindestens einmal messen. Die Temperatur sollte während der gesamten Prüfung 20 ± 2 °C betragen. An einem gegebenen Messtag sollte der Temperaturunterschied zwischen den Prüfgefäßen nicht mehr als ± 1 °C betragen. Die Prüfgefäße nach dem Zufallsprinzip in den Testinkubator oder auf die Testfläche stellen, um beispielsweise standortbedingte Reproduktionstrends auf ein Mindestmaß zu begrenzen.

Belüftung

44. Das Überstandswasser der Prüfgefäße vorsichtig belüften (z. B. mit 2-4 Blasen pro Sekunde); die dazu verwendete Pasteur-Pipette etwa 2 cm über der Oberfläche des Sediments ansetzen, um Perturbationen des Sediments zu minimieren. Dabei darauf achten, dass die Konzentration des gelösten Sauerstoffs nicht unter 30 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts (ASV) sinkt. Die Luftzufuhr kontrollieren und erforderlichenfalls an Werktagen mindestens einmal täglich korrigieren.

Messungen der Wasserqualität

45. Für das Überstandswasser sollten die folgenden Wasserqualitätsparameter gemessen werden:

Temperatur:	Einmal wöchentlich sowie am Anfang und am Ende der Expositionsdauer bei mindestens einem Prüfgefäß pro Konzentration und pro Kontrolle; wenn möglich, auch die Temperatur im umgebenden Medium (Umgebungsluft oder Wasserbad) z. B. stündlich messen.
Gehalt an gelöstem Sauerstoff:	Einmal wöchentlich sowie am Anfang und am Ende der Expositionsdauer bei mindestens einem Prüfgefäß pro Konzentration und pro Kontrolle; ausgedrückt in mg/l und als Luftsauerstoff-Sättigungswert (in %).
Luftzufuhr:	An Werktagen mindestens einmal täglich kontrollieren und erforderlichenfalls korrigieren.
pH-Wert:	Einmal wöchentlich sowie am Anfang und am Ende der Expositionsdauer bei mindestens einem Prüfgefäß pro Konzentration und pro Kontrolle.
Gesamt-wasserhärte:	Zu Beginn und am Ende der Expositionsdauer bei mindestens einem Kontrollreplik und einem Prüfgefäß bei höchster Konzentration; ausgedrückt in mg/l CaCO_3 .
Gesamt-ammoniakgehalt:	Zu Beginn der Expositionsdauer bei mindestens einem Kontrollreplik und einem Prüfgefäß für jede Konzentration und anschließend dreimal wöchentlich; ausgedrückt in mg/l NH_4^+ oder NH_3 oder als Ammoniak-N gesamt.

Wenn die Messung der Wasserqualitätsparameter die Entnahme umfangreicher Wasserproben aus den Gefäßen erforderlich macht, kann die Bereitstellung separater Gefäße für Wasserqualitätsmessungen sinnvoll sein, um das Wasser/Sediment-Volumenverhältnis nicht zu verändern.

Biologische Beobachtungen

46. Während der Expositionsdauer sollten die Prüfgefäße beobachtet werden, um Verhaltensunterschiede bei den Würmern (z. B. Meiden des Sediments, sichtbare Fäkalpellets auf der Sedimentoberfläche) feststellen zu können. Beobachtungen sind zu protokollieren.

47. Am Ende der Prüfung jedes Replikats untersuchen (für chemische Analysen vorgesehene zusätzliche Gefäße können hiervon ausgenommen werden). Alle Würmer nach einer geeigneten Methode möglichst unversehrt aus dem Prüfgefäß entnehmen. Eine Möglichkeit ist das Aussieben der Würmer aus dem Sediment. Dazu kann ein Edelstahlsieb mit geeigneter Maschenweite verwendet werden. Den Großteil des Überstandswasser vorsichtig abgießen und das verbleibende Sediment sowie das Restwasser zu einem Schlamm verrühren, der durch das Sieb passiert werden kann. Bei einer Maschenweite von 500 µm passieren die meisten Sedimentpartikel das Sieb sehr schnell. Das Sediment sollte jedoch sehr zügig gesiebt werden, damit die Würmer nicht in oder durch die Maschen kriechen können. Bei einer Maschenweite von 250 µm dürfte dies ausgeschlossen sein. Es ist jedoch darauf zu achten, dass möglichst wenig Sedimentpartikel auf den Maschen hängen bleiben. Der gesiebte Schlamm jedes Replikats kann noch ein zweites Mal gesiebt werden, um sicherzustellen, dass tatsächlich alle Würmer gefunden wurden. Alternativ könnte das Sediment auch aufgewärmt werden, indem es in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 50-60 °C gestellt wird; die Würmer kriechen dann hervor und können mit einer feuerpolierten Glaspipette mit breiter Öffnung von der Sedimentoberfläche aufgenommen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Herstellung eines Sedimentschlamm, der in eine flache Schale mit geeigneter Größe gegossen wird. Aus der flachen Schlammsschicht können die Würmer mit einer Stahlnadel oder einer Juwelierpinzette (die dann eher als Gabel denn als Pinzette zu verwenden ist, damit die Würmer nicht verletzt werden) aufgenommen und in sauberes Wasser gesetzt werden. Nach dem Entfernen aus dem Sedimentschlamm die Würmer mit Prüfmedium abspülen und zählen.
48. Unabhängig von der verwendeten Methode müssen die Labors nachweisen, dass ihre Mitarbeiter in der Lage sind, durchschnittlich mindestens 90 % der Organismen im Sediment wiederzufinden. Beispielsweise könnte eine bestimmte Anzahl Testorganismen in das Kontrollsediment oder in die Prüfsedimente eingesetzt und nach einer Stunde die Wiederfindungsrate ermittelt werden (7).
49. Die Gesamtzahl der lebenden und toten Würmer pro Replikat sollte erfasst und bewertet werden. Würmer der folgenden Kategorien gelten als tot:
- a) nach einem leichten mechanischen Reiz erfolgt keine Reaktion;
 - b) es zeigen sich Anzeichen von Zersetzung (in Verbindung mit Buchstabe a)
 - c) keine Wiederfindung.
- Als lebend gelten Würmer der folgenden Kategorien:
- a) große vollständige (adulte) Würmer ohne regenerierte Körperbereiche;
 - b) vollständige Würmer mit regenerierten, leicht helleren Körperbereichen (d. h. mit einem neuen hinteren Teil und/oder einem neuen vorderen Teil);
 - c) unvollständige Würmer (d. h. kürzlich fragmentierte Würmer mit nicht regenerierten Körperbereichen).
- Diese zusätzlichen Beobachtungen sind nicht verbindlich, können aber für die weitere Auswertung der biologischen Ergebnisse hilfreich sein. (Eine hohe Anzahl Würmer der Kategorie c kann beispielsweise auf eine behandlungsbedingt verzögerte Reproduktion oder Regeneration hindeuten.) Festgestellte Unterschiede im Aussehen der behandelten Würmer und der Kontrollwürmer (z. B. Läsionen des Integuments, ödematöse Körperbereiche) sollten protokolliert werden.
50. Unmittelbar nach dem Zählen/Bewerten die in den einzelnen Replikaten gefundenen lebenden Würmer in getrocknete, vorgewogene und beschriftete Waagschalen (jeweils eine pro Replikat) setzen und mit einem Tropfen Ethanol pro Waagschale töten. Die Waagschalen bei einer Temperatur von 100 ± 5 °C über Nacht in einem Trockenschrank trocknen und nach dem Abkühlen in einem Exsikkator wiegen; anschließend das Trockengewicht der Würmer (vorzugsweise in g bis auf mindestens 4 Dezimalstellen) bestimmen.
51. Zusätzlich zum Gesamttrockengewicht kann auch das aschefreie Trockengewicht bestimmt werden, wie in (49) beschrieben, um auch anorganische Bestandteile aus dem aufgenommenen Sedimentmaterial im Verdauungstrakt der Würmer zu berücksichtigen.
52. Die Biomasse wird als gesamte Biomasse pro Replikat (juvenile und adulte Würmer) ermittelt. Tote Würmer sollten zur Bestimmung der Biomasse pro Replikat nicht berücksichtigt werden.

Überprüfung der Prüfchemikalienkonzentrationen

Probenahmen

53. Zumindest am Ende der Äquilibrationsphase (d. h. vor Zugabe der Testorganismen) sowie bei Prüfungsende sollten zur chemischen Analytik Proben der Prüfchemikalie (und zwar zumindest in der höchsten und in einer niedrigeren Konzentration) entnommen werden. Untersucht werden sollten mindestens Proben des Sediments und des Überstandswassers. Pro Matrix und pro Behandlung sollten an jedem Probenahmetag jeweils mindestens zwei Proben entnommen werden. Eine der beiden Proben kann als Reserve aufbewahrt werden (die z. B. dann analysiert werden kann, wenn die erste Analyse einen Wert außerhalb des Bereichs von $\pm 20\%$ der nominalen Konzentration ergibt). Bei spezifischen chemischen Merkmalen, z. B. wenn ein rascher Abbau der Prüfchemikalie erwartet wird, können die Analysen je nach Expertenurteil verfeinert werden (z. B. häufigere Probenahmen oder Analyse weiterer Konzentrationen). Zwischenmessungen können dann vorgenommen werden (z. B. an Tag 7 nach Beginn der Exposition).
54. Das Überstandswasser vorsichtig abgießen oder absaugen, um das Sediment möglichst wenig zu perturbieren. Die entnommenen Probenvolumina protokollieren.
55. Nach dem Entfernen des Überstandswassers das Sediment homogenisieren und in ein geeignetes Behältnis geben. Das Gewicht der feuchten Sedimentprobe protokollieren.
56. Wenn zusätzlich die Prüfchemikalie im Porenwasser analysiert werden muss, homogenisierte und abgewogene Sedimentproben zentrifugieren, um das Porenwasser zu erhalten. Beispiel: Etwa 200 ml feuchtes Sediment in Zentrifugiergläser mit einem Füllinhalt von 250 ml geben. Danach die Proben ohne Filtration zentrifugieren, um das Porenwasser zu isolieren (z. B. 30-60 min. mit $10\,000 \pm 600 \times g$ höchstens bei Testtemperatur). Nach dem Zentrifugieren Überstand abgießen oder mit einer Pipette aufnehmen und das Volumen protokollieren; dabei darauf achten, dass keine Sedimentpartikel eingebracht werden. Das Gewicht der verbliebenen Sedimentpellets notieren. Die Schätzung der Massenbilanz oder die Wiederfindung der Prüfchemikalie im Wasser-Sediment-System können erleichtert werden, wenn das Trockengewicht des Sediments an jedem Probenahmetag ermittelt wird. Bei zu kleinen Probenvolumina kann es vorkommen, dass sich die Konzentrationen im Porenwasser nicht analysieren lassen.
57. Wenn die Analyse nicht sofort durchgeführt wird, sind alle Proben in geeigneter Weise zu lagern, z. B. unter den empfohlenen Bedingungen, bei denen die jeweilige Prüfchemikalie am wenigsten abgebaut wird. (Umweltproben beispielsweise bei -18 °C im Dunkeln lagern.) Vor Beginn der Prüfung sind Informationen über geeignete Lagerbedingungen für die jeweilige Prüfchemikalie (z. B. Dauer, Temperatur, Extraktionsverfahren usw.) einzuholen.

Analysemethode

58. Da Genauigkeit, Präzision und Reproduzierbarkeit der für die Prüfchemikalie angewandten Analysemethode entscheidend für das gesamte Verfahren sind, muss experimentell überprüft werden, ob Präzision und Reproduzierbarkeit der chemischen Analyse sowie die Wiederfindung der Prüfchemikalie in Wasser- und Sedimentproben für die jeweilige Methode zumindest bei der niedrigsten und der höchsten Konzentration akzeptabel sind. Außerdem muss gewährleistet werden, dass die Prüfchemikalie in den Prüfkammern nicht in Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze nachweisbar ist. Erforderlichenfalls sind die nominalen Konzentrationen für die Wiederfindung der Qualitätskontrolldotierungen zu korrigieren (z. B. wenn die Wiederfindungsrate außerhalb des Bereichs von 80-120 % des dotierten Volumens liegt). Alle Proben sind während des Tests stets so zu handhaben, dass Verunreinigungen und Verluste (z. B. infolge der Adsorption der Prüfchemikalie an das Probenahmegerät) auf ein Mindestmaß beschränkt werden.
59. Die Wiederfindung der Prüfchemikalie, die Bestimmungsgrenze und die Nachweisgrenze in Sediment und Wasser sollten protokolliert und angegeben werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

60. Die wichtigsten statistisch auszuwertenden obligatorischen Endpunkte der Prüfung sind die Biomasse und die Gesamtzahl der Würmer pro Replikat. Optional könnten auch Reproduktion (Vermehrung der Würmer) und Wachstum (Zunahme der trockenen Biomasse) bewertet werden. In diesem Fall sollte das Trockengewicht der Würmer zu Beginn der Exposition bestimmt werden (z. B. durch Messung des Trockengewichts einer repräsentativen Teilprobe der für die Prüfung zu verwendenden Charge synchronisierter Würmer).

61. Die Mortalität ist bei dieser Prüfung zwar kein Endpunkt, sollte möglichst aber dennoch bewertet werden. Zur Bestimmung der Mortalität sollten Würmer, die auf einen leichten mechanischen Reiz nicht reagieren oder die Anzeichen von Zersetzung zeigen, sowie nicht aufzufindende Würmer als tot gelten. Tote Würmer sollten zumindest protokolliert und bei der Auswertung der Testergebnisse berücksichtigt werden.
62. Wirkungskonzentrationen sind in mg/kg Sedimenttrockenmasse auszudrücken. Wenn die Wiederfindungsrate der im Sediment oder in Sediment und Überstandswasser zu Beginn der Exposition gemessenen Prüfchemikalie zwischen 80 und 120 % der nominalen Konzentrationen liegt, können die Wirkungskonzentrationen (EC_x , NOEC, LOEC) bezogen auf die nominalen Konzentrationen ausgedrückt werden. Weicht die Wiederfindungsrate um mehr als ± 20 % von den nominalen Konzentrationen ab, so sind die Wirkungskonzentrationen (EC_x , NOEC, LOEC) auf die zu Beginn der Exposition gemessenen Ausgangskonzentrationen zu beziehen, beispielsweise durch Berücksichtigung der Massenbilanz der Prüfchemikalie im Prüfsystem (siehe Nummer 30). In diesen Fällen können zusätzliche Informationen aus der Analyse der Stammlösungen und/oder der Applikationslösungen bezogen werden, um zu bestätigen, dass die Testsedimente ordnungsgemäß hergestellt wurden.

EC_x

63. Die EC_x -Werte der unter Nummer 60 beschriebenen Parameter werden nach geeigneten statistischen Methoden berechnet (z. B. durch Probit-Analysen, Logit- oder Weibull-Transformationen, mit der Trimmed-Spearman-Kärber-Methode oder durch einfache Interpolation). (15) und (50) enthalten Leitlinien für die statistische Auswertung. Ein EC_x -Wert wird ermittelt, indem ein x % des Kontroll-Mittelwertes entsprechender Wert in die Gleichung eingefügt wird. Zur Berechnung des EC_{50} -Wertes oder einen anderen EC_x -Wertes sind die Mittelwerte (\bar{X}) der jeweiligen Behandlungsgruppen einer Regressionsanalyse zu unterziehen.

NOEC/LOEC

64. Wenn die NOEC-/LOEC-Werte durch statistische Analyse bestimmt werden sollen, sind Ergebnisse aus den einzelnen Gefäßen erforderlich, (wobei die einzelnen Gefäße als Replikate zu betrachten sind). Es sollten geeignete statistische Methoden angewendet werden. Im Allgemeinen werden schädliche Wirkungen der Prüfchemikalie im Vergleich zur Kontrolle einer einseitigen (kleineren) Hypothesenprüfung bei $p \leq 0,05$ unterzogen. In den folgenden Absätzen werden einige Beispiele gegeben. Empfehlungen für geeignete statistische Methoden finden sich unter (15) und (50).
65. Die Normalverteilung von Daten kann z. B. anhand der Kolmogorov-Smirnov-Methode (*Goodness-of-Fit-Test*), anhand einer Prüfung zur Ermittlung des Quotienten aus Spannweite und Standardabweichung (*range to standard deviation ratio*, R/s-Test) oder anhand des Shapiro-Wilk-Tests (zweiseitig, $p \leq 0,05$) untersucht werden. Mit dem Cochran-Test, dem Levene-Test oder dem Bartlett-Test (zweiseitig, $p \leq 0,05$) kann die Varianzhomogenität geprüft werden. Wenn die Bedingungen parametrischer Testverfahren (Untersuchung auf Normalverteilung und Varianzhomogenität) erfüllt sind, können eine einseitige Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend multiple Vergleichstests durchgeführt werden. Mit paarweisen Vergleichstests (z. B. mit dem Dunnett-t-Test) oder Step-down-Trendtests (z. B. dem Williams-Test) kann berechnet werden, ob zwischen den Kontrollen und den verschiedenen Prüfchemikalienkonzentrationen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) bestehen. Andernfalls sollten nicht-parametrische Methoden (z. B. ein U-Test mit Bonferroni-/Holm-Korrektur oder ein Jonckheere-Terpstra-Trendtest) verwendet werden, um den NOEC- und LOEC-Wert zu bestimmen.

Limit-Test

66. Wenn ein Limit-Test (Vergleich der Kontrolle mit einer einzigen Prüfkonzentration) durchgeführt wurde und die Voraussetzungen für parametrische Testverfahren (Normalität und Homogenität) erfüllt sind, können metrische Antworten (Gesamtzahl der Würmer und Biomasse ausgedrückt als Trockengewicht der Würmer) mit einem Student-Test (t-Test) ausgewertet werden. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so kann ein t-Test für ungleiche Varianzen (Welch-Test) oder ein nicht-parametrischer Test wie der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test verwendet werden. Für Informationen zur statistischen Aussagekraft von Hypothesenprüfungen im Rahmen des Ringtests dieser Methode siehe Anlage 6.
67. Um signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen (Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle) zu ermitteln, können die Replikate der einzelnen Kontrollen wie beim Limit-Test geprüft werden. Werden bei diesen Tests keine signifikanten Unterschiede festgestellt, können alle Replikate (Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle) gepoolt werden. Andernfalls alle Behandlungen mit der Lösungsmittelkontrolle vergleichen.

Auswertung der Ergebnisse

68. Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren, wenn von dieser Prüfmethode abgewichen wurde und wenn gemessene Testkonzentrationen nahe an der Nachweisgrenze des angewandten Analyseverfahrens liegen. Jegliche Abweichung von dieser Prüfmethode ist zu protokollieren.

Prüfbericht

69. Der Prüfbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

— *Prüfchemikalie:*

- chemische Kenndaten (Common name, chemische Bezeichnung, Strukturformel, CAS-Nummer usw.) einschließlich Reinheitsgrad und Analyseverfahren zur Quantifizierung der Chemikalie, Herkunft der Prüfchemikalie, Identität und Konzentration etwa verwendeter Lösungsmittel;
- alle verfügbaren Informationen über die physikalische Beschaffenheit und die physikalisch-chemischen Eigenschaften, bei sie bei Beginn des Versuchs ermittelt wurden (z. B. Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Koeffizient der Verteilung im Boden (bzw. ggf. im Sediment), $\log K_{ow}$, Stabilität in Wasser usw.);

— *Testspezies:*

- wissenschaftlicher Name, Herkunft, etwaige Vorbehandlungen, Akklimatisierung, Kulturbedingungen usw.;

— *Prüfbedingungen:*

- angewandtes Testverfahren (z. B. statisch, semistatisch oder Durchfluss);
- Versuchsplan (z. B. Anzahl, Material und Größe der Prüfkammern, Wasservolumen pro Gefäß, Sedimentmasse und Volumen pro Gefäß (bei Durchflussverfahren und semistatischen Verfahren: Wasseraustauschrate), Belüftung vor und während des Versuchs, Anzahl Replikate, Anzahl Würmer je Replikat zu Beginn der Exposition, Anzahl Testkonzentrationen, Dauer der Konditionierung, Äquilibrierungs- und Expositionsdauer, Häufigkeit der Probennahmen);
- Tiefe des Sediments und des Überstandswassers;
- Methode der Vorbehandlung der Prüfchemikalie und der Dotierung/Applikation;
- nominelle Prüfkonzentrationen, Einzelheiten zur Entnahme von Proben für chemische Analysen und die Analysemethoden, mit denen die Konzentrationen der Prüfchemikalie ermittelt wurden;
- Sedimentmerkmale gemäß den Nummern 24 und 25; sonstige vorgenommene Messungen; Herstellung des formulierten Sediments;
- Aufbereitung des Prüfwassers vor Beginn des Versuchs (falls rekonstituiertes Wasser verwendet wird) und Merkmale des Wassers (Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Leitfähigkeit, Härte und andere vorgenommene Messungen);
- Angaben zur Fütterung, einschließlich Art des Futters, Präparation, Menge und Fütterungsregime;
- Lichtintensität und Hell-/Dunkelphase(n);
- Methoden zur Ermittlung aller biologischen Parameter (z. B. Probenahme, Kontrolle, Wiegen der Testorganismen) sowie aller abiotischen Parameter (z. B. Parameter für Wasser- und Sedimentqualität);
- Volumina und/oder Gewichte aller Proben für die chemische Analyse;
- genaue Informationen über die Behandlung aller Proben für die chemische Analyse einschließlich Angaben zu Aufbereitung, Lagerung, Dotierungsverfahren, Entnahme- und Analyseverfahren (einschließlich Genauigkeit) für die jeweilige Prüfchemikalie und Wiederfindungsraten der Prüfchemikalie.

- *Ergebnisse:*
 - Qualität des Wassers in den Prüfgefäßen (pH-Wert, Temperatur, Gehalt an gelöstem Kohlenstoff, Härte, Ammoniakkonzentrationen und andere vorgenommene Messungen);
 - gesamter organischer Kohlenstoff (TOC), Verhältnis Trockenmasse/Feuchtmasse, pH-Wert des Sediments und andere vorgenommene Messungen;
 - Gesamtzahl sowie — falls bestimmt — die Zahl der vollständigen und nicht mehr vollständigen Würmer in den einzelnen Prüfkammern am Ende des Versuchs;
 - Trockengewicht der Würmer in den einzelnen Prüfkammern am Ende des Versuchs und — falls gemessen — Trockengewicht einer Würmer-Teilprobe zu Beginn des Versuchs;
 - alle festgestellten anomalen Verhaltensweisen im Vergleich zu den Kontrollen (z. B. Meiden des Sediments, Vorkommen oder Fehlen von Fäkalpellets);
 - festgestellte Todesfälle;
 - Schätzwerte für toxische Endpunkte, z. B. EC₅₀, NOEC- und/oder LOEC-Werte und die für ihre Bestimmung angewandten statistischen Methoden;
 - die nominalen Prüfkonzentrationen, die gemessenen Prüfkonzentrationen und die Ergebnisse sämtlicher Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfchemikalie in den Prüfgefäßen;
 - jegliche Abweichungen von den Validitätskriterien.
- *Auswertung der Ergebnisse:*
 - Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Validitätskriterien gemäß in Nummer 13;
 - Diskussion der Ergebnisse einschließlich Auswirkungen auf das Testergebnis, die auf Abweichungen von dieser Prüfmethode zurückzuführen sind.

LITERATUR

- (1) EG (2003). Technischer Leitfaden zur Richtlinie 93/67/EWG der Kommission über die Bewertung der Risiken neu notifizierter Stoffe, zur Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission über die Bewertung der von Altstoffen ausgehenden Risiken und zur Richtlinie 98/8/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Biozid-Produkten; Teil I — IV. Amt für Veröffentlichungen der Europäischen Kommission), Luxemburg.
- (2) OECD (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs No. 60. Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD), Paris.
- (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Bd. 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Bd. 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A., und Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.
- (6) Kapitel C.27 dieses Anhangs, ‚Chironomiden-Toxizitätstest in Sediment-Wasser-Systemen mit dotiertem Sediment‘.
- (7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Zweite Ausgabe. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, März 2000.

- (8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Bericht SPE 1/RM/32. Dezember 1997.
- (9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (Hrsg.), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).
- (10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Hrsg. M. Streloke und H. Köpp. Berlin 1995.
- (11) Riedhammer, C., u. B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.
- (12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.
- (13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J., und Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. in Zusammenarbeit mit R. Nagel und B. Karaoglan. Bericht an das Umweltbundesamt Berlin, FKZ 202 67 429.
- (14) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Nr. 23.
- (15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; 5. Fassung, März 2003; Bericht EPS 1/RM/.
- (16) Nikkilä, A., Halme, A., Kukkonen, J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.
- (17) Baily, H.C., und Liu, D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. In J.C. Eaton, P.R. Parrish, und A.C. Hendricks (Hrsg.). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.
- (18) Chapman, K. K., Benton, M. J., Brinkhurst, R. O., und Scheuerman, P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.
- (19) Meyer, J.S., Boese, C.J. und Collyard, S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.
- (20) Schubauer-Berigan, M.K., Dierkes, J.R., Monson, P.D., und Ankley, G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 12(7):1261-1266.
- (21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps und G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.
- (22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J., und Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.
- (23) Kukkonen, J., und Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.
- (24) Leppänen, M.T., und Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

- (25) Leppänen, M.T. und Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
- (26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg, M.S., und Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 292-302.
- (27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J., und Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
- (28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty, J., und Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 872-885.
- (29) Rodriguez, P., und Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. In: A. Mudroch, J.M. Azcue und P. Mudroch (Hrsg.): *Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality*. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.
- (30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., und Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of ¹⁴C-17 α -ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. *Chemosphere* 59, 271-280.
- (31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann und R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Bd. 20, 2000-2007.
- (32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski und R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. Im Auftrag des Umweltbundesamtes Berlin, FKZ 360 12 001, März 2000.
- (33) Leppänen M.T., und Kukkonen, J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
- (34) Dermott R., und Munawar, M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 235/236: 407-414.
- (35) Drewes, C.D., und Fournier, C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
- (36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. *Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22*.
- (37) Kapitel C.1 dieses Anhangs, Akute Toxizität für Fische.
- (38) OECD (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
- (39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. und Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. *Chemosphere* 35, 835-852.
- (40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel und B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety*, 39, 10-20.
- (41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C., und Studinger, G. (1999). Workshop on 'Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes', 26.-27.4.1999, Hochheim/Main, Germany. Abschlussbericht zum F +E-Vorhaben 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlin.
- (42) Suedel, B.C., und Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1163-1175.
- (43) Naylor, C., und C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.
- (44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J., und Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. *Hydrobiologia* 11, 181-184.

- (45) Martinez-Madrid, M., Rodriguez, P., Perez-Iglesias, J.L., und Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. *Ecotoxicology* 8, 111-124.
- (46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Technol.* 23, 588-595.
- (48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J., und Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 223-228.
- (49) Mount, D.R., Dawson, T.D., und Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1244-1249.
- (50) OECD 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment, no. 54.
- (51) Liebig, M., Meller, M. und Egeler, P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Seminarunterlagen 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. 24./25. März 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Deutschland, S. 107-119.

Zusätzliche Literatur zu statistischen Verfahren:

- Dunnnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *Amer. Statist. Ass. J.* 50, 1096-1121.
- Dunnnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20, 482-491.
- Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis* (3rd ed.), S. 19-76. Cambridge Univ. Press.
- Finney, D.J. (1978). *Statistical Method in Biological Assay*. Charles Griffin & Company Ltd, London.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo und R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11(7), 714-719; Correction: *Environ. Sci. Technol.* 12 (1998), 417.
- Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Statist.* 6, 65-70.
- Sokal, R.R., und F.J. Rohlf. (1981) *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. New York.
- Miller, R.G., Jr. (1986). *Beyond ANOVA, basics of applied statistics*. John Wiley & Sons. New York.
- Shapiro, S.S., und Wilk, M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103-117.
- Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, 519-531.

Anlage 1

Begriffsbestimmungen

Für diese Prüfmethode gelten folgende Definitionen:

Äquilibrierungszeitraum: die für die Verteilung der Prüfchemikalie zwischen Festphase, Porenwasser und Überstandswasser vorgesehene Zeit; die Äquilibrierung erfolgt nach dem Dotieren des Sediments mit der Prüfchemikalie und vor Zugabe der Testorganismen.

Chemikalie: ein Stoff oder ein Gemisch.

Dotiertes Sediment: Sediment, dem die Prüfchemikalie hinzugefügt wurde.

EC_x: Konzentration der Prüfchemikalie im Sediment, bei der es innerhalb einer gegebenen Expositionsdauer zu einer X %-Wirkung (z. B. 50 %) auf einen biologischen Parameter kommt.

Expositionsphase/Expositionsdauer: die Zeit, während der die Testorganismen der Prüfchemikalie ausgesetzt sind.

Formuliertes Sediment oder rekonstituiertes/künstliches/synthetisches Sediment: ein Gemisch aus Stoffen, das die physikalischen Bestandteile eines natürlichen Sediments simulieren soll.

Konditionierungszeitraum: die für die Stabilisierung des Mikrobenbestands des Sediments und die Abtrennung von beispielsweise aus Sedimentbestandteilen stammendem Ammoniak vorgesehene Zeit; die Konditionierung erfolgt vor dem Dotieren des Sediments mit der Prüfchemikalie. Gewöhnlich wird das Überstandswasser nach dem Konditionieren verworfen.

LOEC (Niedrigste messbare Konzentration mit statistisch signifikanter Wirkung): niedrigste geprüfte Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der beobachtet wird, dass sie im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante toxische Wirkung hat ($p \leq 0,05$); allerdings müssen alle Testkonzentrationen über der LOEC eine Wirkung zeigen, die der LOEC-Wirkung gleichwertig ist oder darüber liegt. Sind diese beiden Bedingungen nicht erfüllt, ist genau zu begründen, warum die LOEC (und entsprechend die NOEC) gewählt wurde.

NOEC (Höchste messbare Konzentration ohne statistisch signifikante Wirkung): Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, die im Vergleich zur Kontrolle während einer bestimmten Expositionsdauer keine statistisch signifikante Wirkung ($p \leq 0,05$) zeigt.

Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{ow} ; manchmal auch ausgedrückt als P_{ow}): bezeichnet das Verhältnis der Löslichkeit einer Chemikalie in n-Octanol und Wasser im Gleichgewicht und zeigt die Fettlöslichkeit einer Chemikalie an (Kapitel A.24 in diesem Anhang). K_{ow} oder der Logarithmus von K_{ow} ($\log K_{ow}$) gilt als Maß für das Potenzial einer Chemikalie zur Anreicherung in aquatischen Organismen.

Organischer Kohlenstoff/Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{oc}): bezeichnet das Verhältnis zwischen der Konzentration der Chemikalie im/am organischen Kohlenstoff im Sediment und der Konzentration der Chemikalie im Wasser im Gleichgewicht.

Porenwasser oder Interstitialwasser: Wasser in den Hohlräumen zwischen Sediment- oder Bodenpartikeln.

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

Überstandswasser: das im Prüfgefäß über dem Sediment stehende Wasser.

—

Anlage 2

Zusammensetzung des empfohlenen rekonstituierten Wassers

(übernommen aus Kapitel C.1 dieses Anhangs (1))

- a) *Calciumchloridlösung*
11,76 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in entionisiertem Wasser lösen; anschließend mit entionisiertem Wasser bis auf 1 Liter auffüllen.
- b) *Magnesiumsulfatlösung*
4,93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in entionisiertem Wasser lösen; anschließend mit entionisiertem Wasser bis auf 1 Liter auffüllen.
- c) *Natriumbicarbonatlösung*
2,59 g NaHCO_3 in entionisiertem Wasser lösen; anschließend mit entionisiertem Wasser bis auf 1 Liter auffüllen.
- d) *Kaliumchloridlösung*
0,23 g KCl in entionisiertem Wasser lösen; anschließend mit entionisiertem Wasser bis auf 1 Liter auffüllen.

Alle Chemikalien müssen Analysequalität haben.

Die Leitfähigkeit des destillierten oder entionisierten Wassers darf höchstens $10 \mu\text{Scm}^{-1}$ betragen.

Von den Lösungen a bis d jeweils 25 ml mischen und das Gesamtvolumen mit entionisiertem Wasser bis auf 1 Liter auffüllen. Die Summe der Ca- und Mg-Ionen in diesen Lösungen beträgt 2,5 mmol/l.

Das Verhältnis der Ca- zu den Mg-Ionen beträgt 4:1 und das der Na- zu den K-Ionen 10:1. Die Gesamtalkalinität $K_{\text{S}_{4,3}}$ dieser Lösung beträgt 0,8 mmol/l.

Das Wasser bis zur Sauerstoffsättigung belüften und anschließend ohne weitere Belüftung bis zur Verwendung zwei Tage lagern.

BEZUGSQUELE

- (1) Kapitel C.1 dieses Anhangs, Akute Toxizität für Fische.
-

Anlage 3

Physikalisch-Chemische Eigenschaften eines geeigneten Testwassers

Bestandteil	Konzentrationen
Partikel	< 20 mg/l
Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff	< 2 µg/l
Nichtionisierter Ammoniak	< 1 µg/l
Restchlor	< 10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	< 25 ng/l

(übernommen aus OECD (1992) (1))

BEZUGSQUELLE

- (1) OECD (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris.
-

Anlage 4

Empfohlenes künstliches Sediment — Empfehlungen für Herstellung und Lagerung**Bestandteile des Sediments**

Bestandteil	Beschreibung	in % des Sediment-trockengewichts
Torf	Sphagnum-Torf, Zersetzungsgrad: ‚mittel‘, luftgetrocknet, ohne sichtbare Pflanzenreste, fein gemahlen (Partikelgröße $\leq 0,5$ mm).	$5 \pm 0,5$
Quarzsand	Korngröße: ≤ 2 mm, aber > 50 % der Partikel sollten eine Größe im Bereich 50-200 μm haben.	75-76
Kaolin-Ton	Kaolinitgehalt ≥ 30 %	20 ± 1
Futter	z. B. Nesselpulver (Folia urticae), Blätter von Urtica dioica (Brennnessel), fein gemahlen (Partikelgröße $\leq 0,5$ mm); nach Arzneimittelstandards, zum menschlichen Verzehr geeignet; zusätzlich zum trockenen Sediment	0,4-0,5 %
Organischer Kohlenstoff	eingestellt durch Zugabe von Torf und Sand	$2 \pm 0,5$
Calciumcarbonat	CaCO_3 , in Pulverform, chemisch rein, zusätzlich zum trockenen Sediment	0,05-1
Entionisiertes Wasser	Leitfähigkeit $\leq 10 \mu\text{S/cm}$, zusätzlich zum trockenen Sediment	30-50

Hinweis: Ist mit hohen Ammoniakkonzentrationen zu rechnen (wenn beispielsweise bekannt ist, dass die Prüfchemikalie die Nitrifikation hemmt), kann es sinnvoll sein, 50 % des stickstoffreichen Nesselpulvers durch Cellulose (z. B. α -Cellulosepulver, chemisch rein, Partikelgröße $\leq 0,5$ mm (1) (2)) zu ersetzen.

Herstellung

Den Torf lufttrocknen und zu feinem Pulver vermahlen. Mithilfe eines leistungsstarken Homogenisierapparats eine Suspension der erforderlichen Menge Torfpulver in entionisiertem Wasser herstellen. Den pH-Wert dieser Suspension mit CaCO_3 auf $5,5 \pm 0,5$ einstellen. Die Suspension bei 20 ± 2 °C für mindestens zwei Tage unter sanftem Rühren konditionieren, um den pH-Wert zu stabilisieren und einen stabilen mikrobiellen Anteil zu sichern. Den pH-Wert erneut messen; er sollte bei $6,0 \pm 0,5$ liegen. Anschließend die anderen Bestandteile (Sand und Kaolin-Ton) sowie entionisiertes Wasser zur Torf-Suspension hinzugeben und zu einem homogenen Sediment vermischen, dessen Wassergehalt 30-50 % des Trockengewichts des Sediments ausmachen sollte. Den pH-Wert der fertigen Mischung erneut messen und erforderlichenfalls mit CaCO_3 auf 6,5-7,5 einstellen. Ist jedoch mit Ammoniakbildung zu rechnen, kann es sinnvoll sein, den pH-Wert des Sediments unter 7,0 zu halten (z. B. zwischen 6,0 und 6,5). Sedimentproben entnehmen, um das Trockengewicht und den Gehalt an organischem Kohlenstoff zu bestimmen. Ist mit Ammoniakbildung zu rechnen, kann das formulierte Sediment sieben Tage lang unter Testbedingungen

konditioniert werden (z. B. Sediment/Wasser-Verhältnis von 1:4, Tiefe der Sedimentschicht wie in den Prüfgefäßen), bevor es mit der Prüfchemikalie dotiert wird, d. h. das Sediment ist mit belüftetem Wasser aufzufüllen. Nach dieser Konditionierung das Überstandswasser entfernen und verwerfen. Anschließend den dotierten Quarzsand mit dem Sediment in den verschiedenen Konzentrationen mischen; das Sediment auf die Replikatgefäße verteilen und mit Testwasser auffüllen. Die Gefäße unter den Testbedingungen inkubieren. Hier beginnt die Äquilibrierzeit. Das Überstandswasser sollte belüftet werden.

Das gewählte Futter hingegeben, bevor oder während das Sediment mit der Prüfchemikalie dotiert wird. Es kann anfänglich mit der Torfsuspension gemischt werden (s. o.). Eine allzu starke Verschlechterung der Futterqualität vor dem Einsetzen der Testorganismen (z. B. bei langer Äquilibrierzeit) kann vermieden werden, indem der Zeitraum zwischen der Futterzugabe und dem Beginn der Exposition so kurz wie möglich gehalten wird. Um sicherzustellen, dass das Futter mit der Prüfchemikalie dotiert wird, sollte das Futter spätestens am Tag der Dotierung mit dem Sediment vermischt werden.

Lagerung

Die trockenen Bestandteile des künstlichen Sediments können an einem trockenen und kühlen Ort oder bei Raumtemperatur gelagert werden. Aufbereitetes und mit der Prüfchemikalie dotiertes Sediment ist umgehend im Versuch zu verwenden. Proben des dotierten Sediments können bis zur Analyse unter den für die jeweilige Prüfchemikalie empfohlenen Testbedingungen gelagert werden.

LITERATUR

- (1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J., und Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. In Zusammenarbeit mit R. Nagel und B. Karaoglan. Bericht an das Umweltbundesamt Berlin, FKZ 202 67 429, R&D Nr. 202 67 429.
 - (2) Liebig, M., Meller, M. und Egeler, P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Seminarunterlagen 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. 24./25. März 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Koblenz, Deutschland, S. 107-119.
-

Anlage 5

Kulturmethode für *Lumbricus variegatus*

Der Glanzwurm *Lumbricus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta, lebt in Süßwassersedimenten und wird häufig in Ökotoxizitätsprüfungen verwendet. Er kann unter Laborbedingungen kultiviert werden. Im Folgenden werden die Kulturmethode beschrieben.

Kulturmethode

Die Kulturbedingungen für *Lumbricus variegatus* sind in Phipps et al. (1993) (1), Brunson et al. (1998) (2), ASTM (2000) (3) und U.S. EPA (2000) (4) eingehend beschrieben und werden nachstehend kurz zusammengefasst. Ein großer Vorteil von *L. variegatus* ist seine rasche Vermehrung, die dazu führt, dass die Biomasse in laborgezogenen Populationen schnell zunimmt (z. B. (1)(3)(4)(5)).

Die Würmer können in großen Aquarien (57-80 l) bei 23 °C mit Hell-/Dunkelphasen von 16 L: 8 D (100 – 1 000 lx) in täglich erneuertem natürlichem Wasser (45-50 l pro Aquarium) gezüchtet werden. Das Substrat wird hergestellt, indem ungebleichte braune Papiertücher in Streifen geschnitten und einige Sekunden mit Kulturwasser befeuchtet werden, so dass ein Substrat aus kleinen Papierteilchen entsteht, das unverzüglich in auf dem Boden des *Lumbricus*-Zuchtaquariums verteilt werden kann; es kann aber auch in entionisiertem Wasser bis zur späteren Verwendung gefrierengelagert werden. Im Aquarium hält sich das frische Substrat für etwa zwei Monate.

Jede Wurmkultur wird mit 500-1 000 Würmern angesetzt, die unter Wasseraustausch- oder -durchflussbedingungen dreimal wöchentlich mit einer 10 ml-Suspension aus 6 g Forellen-Starterfutter gefüttert werden. Um Bakterien- und Pilzwachstum entgegenzuwirken, werden statische und semistatische Kulturen seltener gefüttert.

Unter diesen Bedingungen verdoppelt sich die Zahl der Tiere in der Kultur gewöhnlich in 10-14 Tagen.

Alternativ kann *Lumbricus variegatus* auch in einem System bestehend aus einer 1-2 cm tiefen Schicht Quarzsand (wie im künstlichen Sediment verwendet) und rekonstituiertem Wasser kultiviert werden. Als Kulturgefäße kommen 12-20 cm hohe Glas- oder Edelstahlbehälter in Frage. Der Wasserkörper ist mit einer Pasteur-Pipette, die etwa 2 cm über der Sedimentoberfläche positioniert wird, sanft zu belüften (z. B. 2 Blasen pro Sekunde). Um eine Akkumulation z. B. von Ammoniak zu vermeiden, ist das Überstandswasser über ein Durchflusssystem zu erneuern oder mindestens zweimal wöchentlich manuell auszutauschen. Die Oligochaeten können bei Raumtemperatur mit Hell-/Dunkelphasen von 16 Stunden (Lichtintensität 100-1 000 lx) bzw. 8 Stunden gehalten werden. In der semistatischen Kultur (Wasseraustausch einmal pro Woche) werden die Würmer zweimal wöchentlich mit TetraMin gefüttert (z. B. 0,6-0,8 mg pro cm² Sedimentoberfläche); das Futter kann als Suspension aus 50 mg TetraMin pro ml entionisiertem Wasser verabreicht werden.

Lumbricus variegatus können beispielsweise durch Sieben des Substrats durch ein feinmaschiges Sieb in ein separates Becherglas oder durch Aufnahme (mit einer feuerpolierten Glaspipette mit weiter Öffnung von ca. 5 mm Durchmesser) aus den Kulturen entnommen werden und in ein Becherglas eingesetzt werden. Wenn gleichzeitig auch das Substrat in das Becherglas gegeben wird, dieses wurmer- und substrathaltige Glas über Nacht bei kontinuierlichem Wasserdurchfluss ruhen lassen, um das Substrat auszuspülen; die Würmer bleiben auf dem Gefäßboden zurück. Anschließend können die Würmer in neu aufbereitete Kulturgefäße gesetzt oder im Test weiterverwendet werden, wie unter (3) und (4) oder in den folgenden Absätzen beschrieben.

Ein Punkt, der bei der Verwendung von *L. variegatus* in Sedimenttests kritisch zu bewerten ist, betrifft die Reproduktionsform der Art (Architomie oder Morphallaxis, z. B. (6)). Diese geschlechtslose Vermehrung führt zur Entstehung von zwei Fragmenten, die so lange keine Nahrung aufnehmen, bis sich das Kopf- bzw. das Schwanzende regeneriert hat (z. B. (7)(8)), d. h. es kommt nicht zur kontinuierlichen Exposition durch Aufnahme kontaminierten Sediments.

Folglich sollte eine Synchronisierung vorgenommen werden, um eine unkontrollierte Reproduktion und Regeneration und sich daraus ergebende stark variierende Testergebnisse auf ein Mindestmaß zu begrenzen. Derartige Variationen können auftreten, wenn einzelne Exemplare fragmentiert haben und über einen bestimmten Zeitraum keine Nahrung aufnehmen und der Prüfchemikalie deshalb weniger stark ausgesetzt sind als andere Exemplare, bei denen es während des Tests nicht zur Fragmentierung kam (9)(10)(11). 10-14 Tage vor Beginn der Exposition sollten die Würmer künstlich zerteilt werden (Synchronisierung). Für die Synchronisierung werden große (adulte) Würmer ausgewählt, die vorzugsweise keine Anzeichen einer kürzlich erfolgten Morphallaxis aufweisen sollten. Diese Würmer können auf einen Glasträger in einen Tropfen Kulturwasser gesetzt und in der Körpermitte

mit einem Skalpell zerteilt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die hinteren Enden ähnlich groß sind. Es bleibt abzuwarten, bis die hinteren Enden in einem Kulturgefäß, das dasselbe Substrat wie die Testkultur und rekonstituiertes Wasser enthält, neue Köpfe bilden. Erst dann kann mit der Exposition begonnen werden. Die Kopfteile gelten dann als regeneriert, wenn die synchronisierten Würmer sich im Substrat eingraben. (Ob sich Kopfteile regeneriert haben, kann auch durch Sichtprüfung einer repräsentativen Teilprobe unter einem binokularen Mikroskop festgestellt werden.) Danach kann davon ausgegangen werden, dass sich die Testorganismen in einem physiologisch ähnlichen Zustand befinden. Wenn sich die synchronisierten Würmern dann während des Versuchs durch Morphallaxis reproduzieren, bedeutet dies, dass praktisch alle Tiere dem dotierten Sediment gleichermaßen ausgesetzt waren. Die synchronisierten Würmer sollten einmal gefüttert werden, sobald sie beginnen, sich in das Substrat einzugraben, oder 7 Tage nach dem Zerteilen. Das Fütterungsregime sollte jedoch in etwa das gleiche sein wie bei regulären Kulturen; es kann jedoch sinnvoll sein, dasselbe Futter zu verwenden wie im eigentlichen Test. Die Würmer sollten bei Testtemperatur gehalten werden (d. h. bei 20 ± 2 °C). Nach der Regeneration werden unversehrte, intakte Würmer, die nach einem leichten mechanischen Reiz aktiv schwimmen oder zu kriechen beginnen, für die Prüfung verwendet. Verletzungen und Autotomie sind zu vermeiden, indem zum Hantieren der Würmer beispielsweise Pipetten mit feuerpolierten Kanten oder Edelstahl-Zahnstocher verwendet werden.

Bezugsquellen für Starterkulturen von *Lumbriculus variegatus* (Anschriften in den USA übernommen aus (4))

Europa

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Deutschland

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Deutschland

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finnland

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommstr. 13
D-01062 Dresden
Deutschland

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

USA.

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research
Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

LITERATUR

- (1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A., und Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ.Toxicol. Chem.* 12, 269-279.
 - (2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J., und Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 191-201.
 - (3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. In ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
 - (4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, März 2000.
 - (5) Kukkonen, J., und Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1457-1468.
 - (6) Drewes, C.D., und Fournier, C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. *Develop. Biol.* 138: 94-103.
 - (7) Leppänen, M.T. und Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2196-2202.
 - (8) Leppänen, M.T. und Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). *Hydrobiologia* 377: 183-194.
 - (9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann und R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. *Environ. Toxicol. Chemistry*, Bd. 20, 2000-2007.
 - (10) Oetken, M., K.-U. Ludwigowski und R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. Im Auftrag des Umweltbundesamts Berlin, FKZ 360 12 001, März 2000.
 - (11) Leppänen M.T., und Kukkonen, J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). *Environ. Sci. Toxicol.* 32, 1503-1508.
-

Anlage 6

**Zusammenfassung der Ergebnisse des Ringtests
,Sedimenttoxizitätsprüfung mit *Lumbriculus variegatus*'**

Tabelle 1

Ergebnisse der einzelnen Ringtestdurchläufe: durchschnittliche Anzahl Würmer in den Kontrollen und in den Lösungsmittelkontrollen bei Testende; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient

	Durchschnittliche Anzahl Würmer in den Kontrollen	SD	CV (%)	N	Durchschnittliche Anzahl Würmer in den Lösungsmittelkontrollen	SD	CV (%)	N
	32,3	7,37	22,80	3	39,0	3,61	9,25	3
	40,8	6,55	16,05	6	36,0	5,29	14,70	3
	41,5	3,54	8,52	2	38,5	7,05	18,31	4
	16,3	5,99	36,67	6	30,8	6,70	21,80	4
	24,3	10,69	43,94	3	26,3	3,06	11,60	3
	28,5	8,29	29,08	4	30,7	1,15	3,77	3
	28,3	3,72	13,14	6	28,8	2,56	8,89	6
	25,3	5,51	21,74	3	27,7	1,53	5,52	3
	23,8	2,99	12,57	4	21,3	1,71	8,04	4
	36,8	8,80	23,88	6	35,0	4,20	11,99	6
	33,0	3,58	10,84	6	33,5	1,73	5,17	4
	20,7	2,73	13,22	6	15,0	6,68	44,56	4
	42,0	7,07	16,84	6	43,7	0,58	1,32	3
	18,2	3,60	19,82	6	21,7	4,04	18,65	3
	32,0	3,95	12,34	6	31,3	4,79	15,32	4
Durchschnittswerte der beteiligten Labors	29,59		20,10		30,61		13,26	
SD	8,32		10,03		7,57		10,48	
N	15				15			
Min	16,3				15,0			
Max	42,0				43,7			
CV (%)	28,1				24,7			

Tabelle 2

Ergebnisse der einzelnen Ringtestdurchläufe: durchschnittliches Gesamttrockengewicht der Würmer pro Replikat in den Kontrollen und in den Lösungsmittelkontrollen bei Testende; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient

	Gesamttrocken- gewicht der Würmer pro Replikat (Kontrollen)	SD	CV (%)	N	Gesamttrocken- gewicht der Würmer pro Replikat (Lösungsmittel- kontrollen)	SD	CV (%)	N
	24,72	6,31	25,51	3	27,35	4,08	14,93	3
	30,17	2,04	6,75	6	33,83	10,40	30,73	3
	23,65	3,61	15,25	2	28,78	4,68	16,28	4
	12,92	6,83	52,91	6	24,90	6,84	27,47	4
	21,31	4,17	19,57	3	25,87	5,30	20,49	3
	22,99	4,86	21,16	4	24,64	5,09	20,67	3
	18,91	1,91	10,09	6	19,89	1,77	8,89	6
	24,13	1,63	6,75	3	25,83	2,17	8,41	3
	22,15	3,18	14,34	4	22,80	2,60	11,40	4
	35,20	8,12	23,07	6	31,42	8,45	26,90	6
	41,28	5,79	14,02	6	41,42	4,37	10,55	4
	15,17	5,78	38,09	6	10,50	3,42	32,53	4
	35,69	8,55	23,94	6	38,22	1,23	3,21	3
	19,57	5,21	26,65	6	28,58	6,23	21,81	3
	29,40	2,16	7,34	6	31,15	2,70	8,67	4
Durchschnittswerte der beteiligten Labors	25,15		20,36		27,68		17,53	
SD	7,87		12,56		7,41		9,10	
N	15				15			
Min	12,9				10,5			
Max	41,3				41,4			
CV (%)	31,3				26,8			

Tabelle 3

PCP-Toxizität: Zusammenfassung der Endpunkte im Ringtest; Durchschnittswerte der beteiligten Labors für EC₅₀, NOEC und LOEC; SD = Standardabweichung; CV = Variationskoeffizient

Biologischer Parameter		Durchschnittswert der beteiligten Labors (mg/kg)	min	max	Faktor der beteiligten Labors	SD	CV (%)	Geometr. Mittelwert (mg/kg)
Gesamtzahl der Würmer	EC ₅₀	23,0	4,0	37,9	9,4	10,7	46,3	19,9
	NOEC	9,9	2,1	22,7	10,7	7,2	72,3	7,6
	LOEC	27,9	4,7	66,7	14,2	19,4	69,4	20,9
	MDD (%)	22,5	7,1	39,1				
Gesamt-Trockengewicht Würmer	EC ₅₀	20,4	7,3	39,9	5,5	9,1	44,5	18,2
	NOEC	9,3	2,1	20,0	9,4	6,6	70,4	7,4
	LOEC	25,7	2,1	50,0	23,5	16,8	65,5	19,4
	MDD (%)	24,8	10,9	44,7				
Mortalität/Überlebensrate	LC ₅₀	25,3	6,5	37,2	5,7	9,4	37,4	23,1
	NOEC	16,5	2,1	40,0	18,8	10,3	62,4	12,8
	LOEC	39,1	4,7	66,7	14,2	18,1	46,2	32,6
Reproduktion (Zunahme der Anzahl Würmer pro Replikat)	EC ₅₀	20,0	6,7	28,9	4,3	7,6	37,9	18,3
	NOEC	7,9	2,1	20,0	9,4	5,2	66,0	6,4
	LOEC	22,5	2,1	50,0	23,5	15,4	68,6	16,0
	MDD (%)	29,7	13,9	47,9				
Wachstum (Zunahme der Biomasse pro Replikat)	EC ₅₀	15,3	5,7	29,9	5,2	7,1	46,5	13,7
	NOEC	8,7	2,1	20,0	9,4	6,0	68,1	6,9
	LOEC	24,0	2,1	50,0	23,5	15,7	65,5	17,3
	MDD (%)	32,2	13,6	65,2				

MDD: *Minimum Detectable Difference* (kleinster nachweisbarer Unterschied) bei den Kontrollwerten während der Hypothesenprüfung; wird als Maßstab für die statistische Aussagekraft verwendet.

LITERATUR

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. und Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test (Validierung eines endobenthischen Sedimenttests durch einen internationalen Ringtest). In Zusammenarbeit mit R. Nagel und B. Karaoglan. Bericht an das Umweltbundesamt Berlin, FKZ 202 67 429.

C.36 REPRODUKTIONSTEST MIT RAUBMILBEN (HYPOASPIS (GEOLAE LAPS) ACULEIFER) IN BODENPROBEN

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 226 (2008). Sie wird zur Bewertung der Wirkung von im Boden befindlichen Chemikalien auf die Reproduktionsleistung der Bodenmilbenart *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* CANESTRINI (Acari: Laelapidae) verwendet und ermöglicht die Bestimmung der Hemmung der spezifischen Populationswachstumsrate (1,2). Als Reproduktionsleistung wird hier die Anzahl der juvenilen Tiere am Ende des Versuchs bezeichnet. *H. aculeifer* stellt eine zusätzliche trophische Ebene dar für die Art, für die Prüfmethode bereits verfügbar sind. Ein Reproduktionstest ohne Unterscheidung und Quantifizierung der verschiedenen Stufen des Reproduktionszyklus wird für den Zweck dieser Prüfmethode als angemessen betrachtet. Für Chemikalien mit einem anderen Expositionsszenarium als die Exposition über den Boden könnten andere Ansätze geeignet sein (3).
2. *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* wird als relevanter Vertreter der Bodenfauna im Allgemeinen und der Raubmilben im Besonderen betrachtet. Die Art kommt weltweit vor (5) und ist leicht zu beschaffen und im Labor zu züchten. Anlage 7 enthält eine Zusammenfassung zur Biologie von *H. aculeifer*. Für Hintergrundinformationen zur Ökologie der Milbenart und zu ihrer Verwendung in Ökotoxizitätsprüfungen siehe (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11) und (12).

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

3. Adulte weibliche Tiere werden verschiedenen Konzentrationen der in den Boden gemischten Prüfchemikalie ausgesetzt. Der Versuch wird mit 10 adulten Weibchen pro Replikatgefäß begonnen. Männliche Tiere werden im Test nicht verwendet, weil sich gezeigt hat, dass sich weibliche Tiere unmittelbar oder kurz nachdem sie dem Deutonymphenstadium entwachsen sind, paaren, wenn männliche Tiere verfügbar sind. Außerdem würde die Einbeziehung männlicher Tiere den Test so verzögern, dass eine (schwierige) Unterscheidung der Altersstufen erforderlich wäre. Daher ist die Paarung der Tiere nicht Teil dieses Tests. Die weiblichen Tiere werden 28-35 Tage nach Beginn der Eiablage in der Synchronisierung in den Test eingesetzt (siehe Anlage 4); zu diesem Zeitpunkt kann nämlich davon ausgegangen werden, dass die weiblichen Tiere sich bereits gepaart und die Präovipositionsperiode bereits durchlaufen haben. Bei einer Temperatur von 20 °C endet der Test an Tag 14 nach dem Einsetzen der weiblichen Tiere (Tag 0); zu diesem Zeitpunkt können die ersten juvenilen Tiere der Kontrollgruppe bereits das Deutonymphen-Stadium durchlaufen haben (siehe Anlage 4). Als wichtigste Messgrößen werden die Zahl der juvenilen Tiere pro Prüfgefäß und zusätzlich die Zahl der überlebenden weiblichen Tiere bestimmt. Die Reproduktionsleistung der Milben, die der Prüfchemikalie ausgesetzt waren, wird mit der Reproduktionsleistung der Kontrollen verglichen, um je nach Prüfprotokoll (siehe Nummer 29) den EC_x-Wert (z. B. EC₁₀ oder EC₅₀) oder die höchste messbare Konzentration ohne statistisch signifikante Wirkung (NOEC — Begriffsbestimmungen siehe Anlage 1) zu ermitteln. Anlage 8 enthält einen Überblick über das Prüfprotokoll.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

4. Die Wasserlöslichkeit, der log K_{ow}-Wert, der Boden/Wasser-Verteilungskoeffizient und der Dampfdruck der Prüfchemikalie sollten möglichst bekannt sein. Wünschenswert sind zudem Informationen über den Verbleib der Chemikalie im Boden (z. B. biotischer und abiotischer Abbau).
5. Diese Prüfmethode kann für wasserlösliche oder nicht wasserlösliche Chemikalien verwendet werden. Allerdings ist die Prüfchemikalie je nach Chemikaliertyp unterschiedlich einzubringen. Für flüchtige Chemikalien (d. h. für Chemikalien, bei denen die Henry-Konstante oder der Luft-Wasser-Verteilungskoeffizient größer als eins ist) oder für Chemikalien, bei denen der Dampfdruck bei 25 °C mehr als 0,0133 Pa beträgt, ist die Prüfmethode nicht geeignet.

VALIDITÄT DES TESTS

6. Damit ein Testergebnis als gültig gewertet werden kann, müssen die unbehandelten Kontrollen die folgenden Kriterien erfüllen:
 - Die mittlere Mortalität adulter weiblicher Tiere sollte am Ende des Tests höchstens 20 % betragen.
 - Die mittlere Anzahl an juvenilen Tieren pro Replikat (in die jeweils 10 adulte weibliche Tiere eingesetzt wurden), sollte am Ende des Tests mindestens 50 betragen.
 - Der berechnete Variationskoeffizient für die Anzahl juveniler Tiere pro Replikat sollte am Ende des Reproduktionstests höchstens 30 % betragen.

REFERENZCHEMIKALIE

7. Der ECx-Wert und/oder die NOEC einer Referenzchemikalie sind zu ermitteln, um angemessene Bedingungen für den Labortest sicherzustellen und um gewährleisten zu können, dass sich die Reaktion der Testorganismen im Laufe der Zeit nicht geändert hat. Dimethoat (CAS 60-51-5) ist eine geeignete Referenzchemikalie, die sich nachweislich auf die Populationsgröße auswirkt (4). Alternativ kann als Referenzchemikalie auch Borsäure (CAS 10043-35-3) verwendet werden, für die allerdings weniger Erfahrungen vorliegen. Zwei Versuchspläne kommen in Betracht:
- Die Referenzchemikalie kann parallel zur Toxizitätsprüfung der einzelnen Prüfchemikalien in einer einzigen Konzentration getestet werden, die zuvor in einer Dosis-Wirkungs-Studie nachweislich zu einer Reduzierung der Anzahl juveniler Tiere um > 50 % geführt hat. In diesem Fall muss die Zahl der Replikate mit der Zahl der Kontrollen übereinstimmen (siehe Nummer 29).
 - Alternativ kann die Referenzchemikalie ein- bis zweimal jährlich in einem Dosis-Wirkungs-Test geprüft werden. Je nach Versuchsplan können sich die Zahl der Konzentrationen und der Replikate sowie der Abstandsfaktor (siehe Nummer 29) unterscheiden; es sollte jedoch eine Wirkung im Bereich von 10-90 % erzielt werden (Abstandsfaktor 1,8). Der EC₅₀-Wert für Dimethoat basierend auf der Anzahl juveniler Tiere muss zwischen 3,0 und 7,0 mg Wirkstoff/kg Boden (bezogen auf das Trockengewicht) liegen. Nach den bislang erzielten Ergebnissen mit Borsäure sollte der EC₅₀-Wert für die Anzahl juveniler Tiere zwischen 100 und 500 mg/kg Boden (bezogen auf das Trockengewicht) liegen.

BESCHREIBUNG DES TESTS

Prüfgefäße und Apparatur

8. Für den Versuch sollten Prüfgefäße aus Glas oder einem sonstigen chemisch inerten Material mit einem Durchmesser von 3-5 cm (bis zu einer Höhe von $\geq 1,5$ cm mit Bodensubstrat befüllt) und mit dicht schließendem Deckel verwendet werden. Vorzugsweise sollten die Gefäße einen Schraubverschluss besitzen, da diese Gefäße zweimal wöchentlich belüftet werden können. Alternativ können Abdeckungen verwendet werden, die einen direkten Gasaustausch zwischen dem Substrat und der Atmosphäre zulassen (z. B. Gaze). Da während des gesamten Tests ein hinreichend hoher Feuchtegehalt gewährleistet sein muss, muss das Gewicht der einzelnen Prüfgefäße im Laufe des Tests kontrolliert und gegebenenfalls Wasser nachgefüllt werden. Besonders bei Gefäßen ohne Schraubverschluss kann dies wichtig sein. Wenn ein nicht transparentes Prüfgefäß verwendet wird, muss die Abdeckung aus einem lichtdurchlässigen Material bestehen (z. B. einer perforierten transparenten Abdeckung) und gleichzeitig dafür sorgen, dass die Milben nicht aus dem Gefäß entweichen können. Größe und Typ der Prüfgefäße hängen von der Extraktionsmethode ab (siehe Anlage 5). Wenn die Extraktion unter Wärmezufuhr unmittelbar aus dem Prüfgefäß erfolgt, kann ein Bodensieb mit geeigneter Maschenweite verwendet werden (das bis zur Extraktion verschlossen ist); der Boden muss tief genug sein, um das nötige Temperatur- und Feuchtegefälle zu gewährleisten.
9. Es wird die übliche Laborausrüstung insbesondere mit folgenden Bestandteilen benötigt:
- vorzugsweise Glasgefäße mit Schraubdeckeln;
 - Trockenschrank;
 - Stereomikroskop;
 - Pinsel zum Aufnehmen der Milben
 - pH-Messgerät und Luxmeter;
 - Waagen mit geeigneter Genauigkeit;
 - geeignete Vorrichtungen zur Temperaturregelung;
 - geeignete Ausrüstung zur Feuchtigkeitsregelung (nicht erforderlich, wenn die Expositionsgefäße mit Deckeln verschlossen werden);
 - Inkubator mit Temperaturregelung oder kleiner Raum;
 - Extraktionsvorrichtung (siehe Anlage 5) (13);
 - Beleuchtung von oben mit Regelung;
 - Gefäße zur Aufnahme der extrahierten Milben.

Herstellung des künstlichen Bodens

10. Für diesen Test wird ein künstlicher Boden mit folgenden Bestandteilen verwendet (alle Angaben bezogen auf die Trockenmasse):
- 5 % Sphagnum-Torf, luftgetrocknet und fein gemahlen (eine Partikelgröße von 2 ± 1 mm ist annehmbar);
 - 20 % Kaolin-Ton (mit einem Kaolinit-Anteil vorzugsweise von mehr als 30 %);
 - ca. 74 % luftgetrockneter Industriesand (je nach erforderlichem CaCO_3 -Anteil), hauptsächlich feiner Sand mit mehr als 50 % Partikeln mit einer Größe von 50-200 μm ; die genaue Menge des Sands hängt vom CaCO_3 -Gehalt ab (s. u.); insgesamt muss ein Anteil von 75 % erreicht werden.
 - < 1,0 % Calciumcarbonat (CaCO_3 , pulverisiert, Analysequalität), um einen pH-Wert von $6,0 \pm 0,5$ zu erzielen; wie viel Calciumcarbonat hinzugegeben ist, kann vor allem von der Qualität/Beschaffenheit des Torfs abhängen (siehe Hinweis 1).

Hinweis 1: Wie viel CaCO_3 zu verwenden ist, hängt von den Bestandteilen des Bodensubstrats ab und ist unmittelbar vor Testbeginn durch Messung des pH-Werts der Unterproben des Bodens zu ermitteln (14).

Hinweis 2: Bei diesem Test hat der künstliche Boden einen anderen Torfgehalt als bei anderen Prüfmethode mit terrestrisch lebenden Organismen, wo der Torfanteil in der Regel bei 10 % liegt (z. B. (15)). Nach EPP0 (16) enthält ein typischer landwirtschaftlich genutzter Boden höchstens 5 % organische Bestandteile; die Reduzierung des Torfgehalts entspricht somit der eingeschränkten Fähigkeit eines Naturbodens zur Sorption der Prüfchemikalie an organischen Kohlenstoff.

Hinweis 3: Falls erforderlich (z. B. für spezifische Testanforderungen), können auch natürliche Böden von nicht verunreinigten Bezugsarten als Test- und/oder Kultursubstrate dienen. Wird natürlicher Boden verwendet, sollten mindestens die Herkunft (Entnahmeort), der pH-Wert, die Textur (Partikelgrößenverteilung) und der Gehalt an organischen Bestandteilen charakterisiert werden. Soweit verfügbar, sind auch Typ und Name des Bodens nach der Bodenklassifikation anzugeben, und der Boden darf nicht kontaminiert sein. Handelt es sich bei der Prüfchemikalie um ein Metall oder eine metallorganische Verbindung, sollte auch die Kationenaustauschkapazität (KAK) des natürlichen Bodens ermittelt werden. Da in der Regel kaum Hintergrundinformationen über natürliche Böden vorliegen, sollte den Validitätskriterien besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden.

11. Die trockenen Bestandteile des Bodens werden gründlich gemischt (z. B. in einem großen Labormischer). Zur Bestimmung des pH-Werts wird eine Mischung aus Boden und 1 M Calciumchlorid- (KCl) oder 0,01 M Calciumchlorid-Lösung (CaCl_2) im Verhältnis 1:5 verwendet (siehe (14) und Anlage 3). Wenn der Boden saurer als erforderlich ist (siehe Nummer 10), kann der pH-Wert durch Zugabe einer geeigneten Menge CaCO_3 korrigiert werden. Ist der Boden zu alkalisch, kann der pH-Wert durch Zugabe einer größeren Menge der Mischung mit den ersten drei der unter Nummer 10 beschriebenen Bestandteile (aber ohne CaCO_3) korrigiert werden.
12. Die maximale Wasserhaltefähigkeit des künstlichen Bodens wird nach den in Anlage 2 beschriebenen Verfahren ermittelt. 2 bis 7 Tage vor Beginn der Prüfung wird der trockene künstliche Boden angefeuchtet, indem so viel destilliertes oder entionisiertes Wasser hinzugegeben wird, bis etwa die Hälfte des endgültigen Wasservolumens erreicht ist (40-60 % der maximalen Wasserhaltefähigkeit). Der Feuchtegehalt wird auf 40-60 % der maximalen Wasserhaltefähigkeit eingestellt, indem die Lösung mit der Prüfchemikalie und/oder destilliertes oder entionisiertes Wasser hinzugegeben wird (siehe Nummern 16-18). Eine zusätzliche grobe Prüfung des Feuchtegehalts des Bodens wird vorgenommen, indem der Boden vorsichtig in der Hand gedrückt wird; bei richtigem Feuchtegehalt sollten Wassertropfen zwischen den Fingern austreten.
13. Der Feuchtegehalt des Bodens wird zu Beginn und am Ende der Prüfung durch Trocknung bei 105 °C auf ein konstantes Gewicht gemäß ISO 11465 (17) gemessen; die Messung des pH-Werts erfolgt gemäß Anlage 3 oder ISO 10390 (14). Diese Messungen sind an zusätzlichen milbenfreien Proben sowohl aus den Kontrollböden als auch aus den einzelnen Böden mit Testkonzentrationen vorzunehmen. Wenn saure oder basische Chemikalien geprüft werden, sollte der pH-Wert des Bodens nicht justiert werden. Der Feuchtegehalt ist während der gesamten Prüfung durch regelmäßiges Wiegen der Gefäße zu überwachen (siehe Nummern 20 und 24).

Auswahl und Vorbereitung der Testtiere

14. In diesem Versuch wird die Art *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883) verwendet. Für den Teststart werden adulte weibliche Milben aus einer synchronisierten Gruppe benötigt. Die Milben sind etwa 7-14 Tage nach Erreichen des adulten Stadiums, d. h. 28-35 Tage nach Beginn der Eiablage in der Synchronisation einzusetzen (siehe Nummer 3 und Anlage 4). Die Herkunft der Milben bzw. die Anbieter und die Kultivierungsbedingungen im Labor sind zu protokollieren. Wird eine Milbenkultur im Labor gehalten, sollte die Identität der jeweiligen Art mindestens einmal jährlich bestätigt werden. Ein Identifikationsblatt liegt als Anlage 6 bei.

Herstellung der Testkonzentrationen

15. Die Prüfchemikalie wird in den Boden gemischt. Organische Lösungsmittel, die als Hilfsmittel zur Behandlung des Bodens mit der Prüfchemikalie verwendet werden, sollten aufgrund ihrer geringen toxischen Wirkung auf die Milben gewählt werden, und im Versuchsplan ist eine angemessene Lösungsmittelkontrolle vorzusehen (siehe Nummer 29).

Wasserlösliche Prüfchemikalien

16. Eine Lösung der Prüfchemikalie wird in einer für alle Replikate einer Testkonzentration ausreichenden Menge in entionisiertem Wasser hergestellt. Dabei sollte möglichst so viel Wasser verwendet werden, dass der erforderliche Feuchtegehalt (d. h. 40-60 % der maximalen Wasserhaltefähigkeit (siehe Nummer 12)) erreicht wird. Jede Lösung der Prüfchemikalie wird gründlich mit einer Charge des befeuchteten Bodens gemischt und anschließend in das Prüfgefäß gegeben.

Nicht wasserlösliche Prüfchemikalien

17. Prüfchemikalien, die nicht in Wasser, sondern nur in organischen Lösungsmitteln löslich sind, können in der kleinstmöglichen Menge eines geeigneten Lösungsmittels (z. B. Aceton) gelöst werden. Es sollten jedoch nur flüchtige Lösungsmittel verwendet werden. Werden derartige Lösungsmittel verwendet, müssen alle Testkonzentrationen und die Kontrolle dieselbe Mindestmenge dieses Lösungsmittels enthalten. Das Lösungsmittel wird aufgesprüht oder mit einer kleinen Menge (z. B. 10 g) Quarzsand gemischt. Der gesamte Sandgehalt des Substrats ist auf diese Menge zu korrigieren. Anschließend wird das Lösungsmittel mindestens eine Stunde lang unter einer Abzugshaube verdunstet. Diese Mischung aus Quarzsand und Prüfchemikalie wird zum angefeuchteten Boden hinzugegeben und mit einer angemessenen Menge entionisierten Wassers gründlich vermischt, um den erforderlichen Feuchtegehalt zu erhalten. Die endgültige Mischung wird in die Prüfgefäße gegeben. Zu beachten ist, dass manche Lösungsmittel für Milben toxisch sein können. Wenn über die Toxizität des Lösungsmittels bei Milben nichts bekannt ist, wird empfohlen, eine zusätzliche Wasserkontrolle ohne Trägerstoff zu verwenden. Wird angemessen nachgewiesen, dass das Lösungsmittel (in den zu verwendenden Konzentrationen) keine Wirkung zeigt, braucht die Wasserkontrolle nicht berücksichtigt zu werden.

In Wasser und organischen Lösungsmitteln schlecht lösliche Prüfchemikalien

18. Bei in Wasser und in organischen Lösungsmitteln schlecht löslichen Chemikalien werden 2,5 g fein gemahlener Quarzsand pro Prüfgefäß (z. B. 10 g feiner Quarzsand für vier Replikate) mit der benötigten Menge Prüfchemikalie gemischt, um die gewünschte Testkonzentration zu erhalten. Der gesamte Sandanteil des Substrats sollte auf diese Menge korrigiert werden. Diese Mischung aus Quarzsand und Prüfchemikalie wird zum angefeuchteten Boden hinzugegeben und mit einer angemessenen Menge entionisierten Wassers gründlich vermischt, um den erforderlichen Feuchtegehalt zu erhalten. Die endgültige Mischung wird auf die Prüfgefäße verteilt, das Verfahren wird für alle Testkonzentrationen wiederholt und es wird eine geeignete Kontrolle hergestellt.

VERFAHREN

Testgruppen und Kontrollen

19. Für jedes Kontroll- und Prüfgefäß werden jeweils zehn adulte weibliche Tiere in 20 g künstlichem Boden (bezogen auf die Trockenmasse) empfohlen. Die Testorganismen sind innerhalb von zwei Stunden nach der Herstellung des fertigen Testsubstrats (d. h. nach Applikation der Prüfchemikalie) einzusetzen. In besonderen Fällen (z. B. wenn die Alterung ein entscheidender Faktor ist) kann die Zeitspanne zwischen der Herstellung des fertigen Testsubstrats und dem Einsetzen der Milben verlängert werden (für Einzelheiten zur Alterung siehe (18)); dies ist jedoch wissenschaftlich zu begründen.

20. Nach dem Einsetzen in den Boden werden die Milben gefüttert und das Anfangsgewicht eines jeden Testgefäßes bestimmt, welches als Bezugsgröße zur Überwachung des Feuchtegehalts des Bodens während der gesamten Prüfung dient; siehe Nummer 24. Anschließend werden die Prüfgefäße verschlossen, wie unter Nummer 8 beschrieben, und in die Prüfkammer gestellt.
21. Für jede der unter den Nummern 15-18 beschriebenen Methoden für die Applikation der Prüfchemikalie sind entsprechende Kontrollen herzustellen. Die beschriebenen Verfahren sind dieselben wie für die Herstellung der Kontrollen, außer dass keine Prüfchemikalie zugegeben wird. Folglich werden den Kontrollen gegebenenfalls organische Lösungsmittel, Quarzsand oder sonstige Trägerstoffe in denselben Konzentrationen/Mengen wie in den Prüfgefäßen zugegeben. Wird ein Lösungsmittel oder ein sonstiger Trägerstoff zur Prüfchemikalie hinzugegeben, von dem die Toxizität nicht bekannt ist, so ist eine zusätzliche Kontrolle ohne Trägerstoff bzw. ohne Prüfchemikalie herzustellen und zu testen (siehe Nummer 17).

Prüfbedingungen

22. Die Prüftemperatur beträgt 20 ± 2 °C und sollte mindestens täglich erfasst und gegebenenfalls korrigiert werden. Der Test wird in kontrollierten Hell-/Dunkel-Zyklen (vorzugsweise 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit) mit einer Beleuchtungsstärke von 400-800 lux im Umfeld der Prüfgefäße durchgeführt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit gelten dieselben Bedingungen wie in anderen Tests zur Bestimmung der Ökotoxizität in Böden (z. B. (15)).
23. Gasaustausch sollte gewährleistet werden, indem die (mit Schraubverschlüssen versehenen) Prüfgefäße mindestens zweimal wöchentlich belüftet werden. Sind die Gefäße mit Gaze verschlossen, muss besonders auf den Feuchtegehalt des Bodens geachtet werden (siehe Nummern 8 und 24).
24. Der Wassergehalt des Bodensubstrats in den Prüfgefäßen wird während der gesamten Prüfung durch Wiegen kontrolliert und gegebenenfalls durch regelmäßiges Nachwässern der Gefäße (z. B. einmal wöchentlich) aufrechterhalten. Verluste werden gegebenenfalls mit entionisiertem Wasser ausgeglichen. Der Feuchtegehalt während der Prüfung darf höchstens um 10 % vom Ausgangswert abweichen.

Fütterung

25. Käsemilben (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)) haben sich nachweislich als geeignete Futterquelle erwiesen. Kleine Collembolen (z. B. juvenile *Folsomia candida* Willem, 1902, oder *Onychiurus fimatus* (19), (20), Enchytraeen (z. B. *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) oder Nematoden (z. B. *Turbatrix silusiae* de Man, 1913)) könnten ebenfalls geeignet sein (21). Es wird empfohlen, das vorgesehene Futter vor Verwendung im Test zu prüfen. Um die Validitätskriterien zu erfüllen, müssen Art und Menge des Futters gewährleisten, dass sich eine angemessene Anzahl juveniler Tiere entwickelt (Nummer 6). Bei der Auswahl der Futtertiere sollte auch die Wirkungsweise der Prüfchemikalie berücksichtigt werden (beispielsweise kann ein Akarizid auch für die Futtermilben giftig sein; siehe Nummer 26).
26. Futter ist *ad libitum* bereitzustellen (d. h. jedes Mal eine kleine Menge, etwa eine Spatelspitze). Dazu kann auch ein Sauger mit geringer Saugwirkung, wie er für den Collembolen-Test vorgeschlagen wird, oder ein feiner Pinsel verwendet werden. Gewöhnlich reicht es, das Futter zu Beginn der Prüfung und danach zwei- bis dreimal wöchentlich anzubieten. Wenn die Prüfchemikalie für die Futtertiere eindeutig toxisch ist, sollte häufigeres Füttern und/oder ein anderes Futter in Betracht gezogen werden.

Wahl der Testkonzentrationen

27. Vorkenntnis der Toxizität der Prüfchemikalie (z. B. aus Vorversuchen) erleichtert die Wahl geeigneter Testkonzentrationen. Falls erforderlich, wird ein Vorversuch mit fünf Konzentrationen der Prüfchemikalie im Bereich 0,1-1 000 mg/kg trockener Boden mit jeweils mindestens einem Replikat für die Prüf- und die Kontrollgefäße durchgeführt. Der Vorversuch dauert 14 Tage; anschließend werden die Mortalität der adulten Milben und die Zahl der juvenilen Tiere ermittelt. Der Konzentrationsbereich im endgültigen Test sollte vorzugsweise so gewählt werden, dass er Konzentrationen umfasst, die die Zahl der juvenilen Tiere beeinflussen, nicht jedoch das Überleben der Muttertiere. Bei Chemikalien, die bei fast gleichen Konzentrationen letal und subletal wirken, ist dies unter Umständen nicht möglich. Die im Test verwendeten Konzentrationen sollten in jedem Fall die Wirkungskonzentration (z. B. EC₅₀, EC₂₅ und EC₁₀) und den Konzentrationsbereich, in dem die Wirkung der Prüfchemikalie von Interesse ist, einschließen. Eine Extrapolation deutlich unterhalb der niedrigsten Konzentration, bei der eine Wirkung auf die Testorganismen auftritt, oder oberhalb der höchsten geprüften Konzentration sollte nur in Ausnahmefällen stattfinden und ist im Bericht umfassend zu begründen.

Versuchsplan

Dosis-Wirkung-Tests

28. Gestützt auf die Empfehlungen aus einem anderen Ringtest (Enchytraeen-Reproduktionstest, (22)) werden drei Versuchspläne vorgeschlagen. Die generelle Eignung aller drei Pläne wurde durch das Ergebnis der *H. aculeifer*-Validierung bestätigt.
29. Bei der Festlegung der Konzentrationsspanne sollten die folgenden Aspekte berücksichtigt werden:
 - Zur Ermittlung des EC_x -Wertes (z. B. EC_{10} oder EC_{50}) sind zwölf Konzentrationen zu prüfen. Empfohlen werden mindestens zwei Replikate pro Testkonzentration und sechs Replikate pro Kontrolle. Der Abstandsfaktor kann variieren, d. h. im erwarteten Wirkungsbereich maximal 1,8 und bei den höheren und niedrigeren Konzentrationen über 1,8).
 - Zur NOEC-Bestimmung sollten mindestens fünf Konzentrationen in einer geometrischen Reihe geprüft werden. Empfohlen werden vier Replikate pro Testkonzentration plus acht Kontrollen. Die Konzentrationen dürfen sich maximal um den Faktor 2,0 unterscheiden.
 - Ein kombinierter Ansatz ermöglicht die Bestimmung sowohl des NOEC- als auch des EC_x -Wertes. Empfohlen werden acht Prüfkonzentrationen in einer geometrischen Reihe sowie vier Replikate pro Prüfkonzentration plus acht Kontrollen. Die Konzentrationen dürfen sich maximal um den Faktor 1,8 unterscheiden.

Limit-Test

30. Zeigen sich im Vorversuch bei der höchsten Konzentration (1 000 mg/kg trockener Boden) keine Wirkungen, kann der endgültige Reproduktionstest als Limit-Test mit der Testkonzentration 1 000 mg/kg durchgeführt werden. Mit einem Limit-Test lässt sich nachweisen, dass der NOEC- oder der EC_{10} -Wert für die Reproduktionsleistung über der Limit-Konzentration liegt, während die Zahl der für den Test verwendeten Milben gleichzeitig auf ein Minimum begrenzt ist. Sowohl für den behandelten Boden als auch für die Kontrolle sind jeweils acht Replikate vorzusehen.

Testdauer und Messungen

31. Alle beobachteten Unterschiede in Verhalten und Morphologie zwischen den Milben in der Kontrolle und den Milben in den Prüfgefäßen sind aufzuzeichnen.
32. An Tag 14 werden die überlebenden Milben unter Licht-/Wärmeeinfluss oder nach einer anderen geeigneten Methode (siehe Anlage 5) extrahiert. Juvenile (d. h. Larven, Protonymphen und Deutonymphen) und adulte Tiere werden separat gezählt. Adulte Milben, die zu diesem Zeitpunkt nicht gefunden werden, gelten als tot, wobei davon ausgegangen wird, dass die Milben vor der Bewertung abgestorben sind und sich zersetzt haben. Die Wirksamkeit der Extraktion ist ein- oder zweimal jährlich in Kontrollen mit einer bekannten Anzahl adulter und juveniler Tiere zu validieren. Sie sollte im Schnitt bei allen Entwicklungsstadien bei über 90 % liegen (siehe Anlage 5). Die Zählungen der Adulten und Juvenilen dürfen nicht mit Blick auf die Erfüllung des Wirksamkeitskriteriums angepasst werden.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

33. Für Informationen über die statistischen Methoden für die Auswertung der Testergebnisse siehe Nummern 36 bis 41 sowie OECD-Dokument 54 ‚*Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*‘ (31).
34. Hauptendpunkt des Tests ist die Reproduktionsleistung, in diesem Fall die Zahl der pro Prüfgefäßreplikate (mit jeweils 10 eingesetzten adulten Weibchen) produzierten juvenilen Tiere. Für die statistische Analyse müssen für jede Testkonzentration und für jede Kontrolle das arithmetische Mittel (\bar{X}) und die Varianz (s^2) der Reproduktionsleistung berechnet werden. \bar{X} und s^2 werden für ANOVA-Verfahren wie den Student-, den Dunnett- oder den Williams-Test sowie für die Berechnung der 95 %-Konfidenzgrenzen verwendet.

Hinweis: Dieser Hauptendpunkt entspricht der Fruchtbarkeit, gemessen als Zahl der während der Prüfung produzierten lebenden juvenilen Tiere geteilt durch die Zahl der bei Prüfungsbeginn eingesetzten weiblichen Elterntiere.

35. Die Zahl der in den unbehandelten Kontrollen ist ein Hauptvaliditätskriterium und muss aufgezeichnet werden. Wie schon beim Vorversuch sind im Schlussbericht auch alle anderen Anzeichen von Schadwirkungen festzuhalten.

EC_x

36. EC_x-Werte, einschließlich ihrer entsprechenden oberen und unteren 95 %-Konfidenzgrenzen, für den Parameter gemäß Nummer 34 sind nach geeigneten statistischen Methoden (z. B. Probit-Analysen, Logit- oder Weibull-Modell, Trimmed Spearman-Kärber-Methode oder einfache Interpolation (11)) zu berechnen. Ein EC_x-Wert wird ermittelt, indem ein x % des Kontrollmittelwertes entsprechender Wert in die entstandene Gleichung eingesetzt wird. Um den EC₅₀-Wert oder einen beliebigen anderen EC_x-Wert zu ermitteln, sollten die für die einzelnen Prüfgefäße berechneten Mittelwerte (x) einer Regressionsanalyse unterzogen werden.

NOEC/LOEC

37. Zur Bestimmung der NOEC-/LOEC-Werte durch statistische Analyse sind statistische Auswertungen für jedes Gefäß erforderlich (wobei einzelne Gefäße als Replikate gelten.) Es sollten geeignete statistische Methoden angewendet werden (gemäß OECD-Dokument 54 *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*). Grundsätzlich gilt, dass Schadwirkungen der Prüfchemikalie im Vergleich zur Kontrolle mit einer einseitigen (kleineren) Hypothesenprüfung bei $p \leq 0,05$ zu untersuchen sind. Siehe Beispiele in den folgenden Absätzen.
38. Die Normalverteilung der Daten kann z. B. anhand der Kolmogorov-Smirnov-Methode (*Goodness-of-Fit-Test*), anhand einer Prüfung zur Ermittlung des Quotienten aus Spannweite und Standardabweichung (*range to standard deviation ratio*, R/s-Test) oder anhand des Shapiro-Wilk-Tests (zweiseitig, $p \leq 0,05$) untersucht werden. Mit dem Cochran-Test, dem Levene-Test oder dem Bartlett-Test (zweiseitig, $p \leq 0,05$) kann die Varianzhomogenität geprüft werden. Wenn die Bedingungen parametrischer Testverfahren (Untersuchung auf Normalverteilung und Varianzhomogenität) erfüllt sind, können eine einseitige Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend Multi-Comparison-Tests durchgeführt werden. Mit paarweisen Vergleichstests (z. B. dem Dunnett-Test) oder Step-down-Trendtests (z. B. mit dem Williams-Test bei monotoner Dosis-Wirkung-Beziehung) kann berechnet werden, ob zwischen den Kontrollen und den verschiedenen Prüfkonzentrationen signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) bestehen (Auswahl des empfohlenen Tests gemäß OECD-Dokument 54 *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*). Andernfalls sollten nicht parametrische Methoden (z. B. ein U-Test mit Bonferroni-/Holm-Korrektur oder ein Jonckheere-Terpstra-Trendtest) verwendet werden, um den NOEC- und den LOEC-Wert zu bestimmen.

Limit-Test

39. Wurde ein Limit-Test (Vergleich der Kontrolle mit einer einzigen Testkonzentration) durchgeführt und sind die Bedingungen für parametrische Prüfverfahren (Normalität, Homogenität) erfüllt, können metrische Reaktionen mit dem Student-t-Test ausgewertet werden. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so kann ein t-Test für ungleiche Varianzen (Welch-Test) oder ein nicht-parametrischer Test wie der U-Test nach Mann und Whitney verwendet werden.
40. Um signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen (Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen) zu ermitteln, können die Replikate der einzelnen Kontrollen wie für den Limit-Test beschrieben geprüft werden. Werden bei diesen Tests keine signifikanten Unterschiede festgestellt, können alle Replikate der Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle gepoolt werden. Andernfalls sind alle Testkonzentrationen mit der Lösungsmittelkontrolle zu vergleichen.

Prüfbericht

40. Der Prüfbericht sollte zumindest folgende Angaben enthalten:
- *Prüfchemikalie*
 - Identität der Prüfchemikalie (Charge, Los, CAS-Nummer und Reinheit);
 - physikalisch-chemische Eigenschaften der Prüfchemikalie (z. B. $\log K_{ow}$, Wasserlöslichkeit, Dampfdruck und Henry-Konstante (H) sowie vorzugsweise Angaben zum Verbleib der Prüfchemikalie im Boden).
 - *Testorganismen*
 - Identifizierung und Bezugsquelle der Testorganismen, Beschreibung der Aufzuchtbedingungen;
 - Altersspanne der Testorganismen;

- Prüfbedingungen
 - Beschreibung des Prüfprotokolls und des Prüfverfahrens;
 - Angaben zur Herstellung des Testbodens; detaillierte Spezifikation, wenn natürlicher Boden verwendet wird (Herkunft, Geschichte, Partikelgrößenverteilung, pH-Wert, organische Bestandteile und — falls verfügbar — Einstufung);
 - maximale Wasserhaltekapazität des Bodens;
 - Beschreibung des Verfahrens zur Einbringung der Prüfchemikalie in den Boden;
 - nähere Angaben zu chemischen Hilfsstoffen, die zur Applikation der Prüfchemikalie verwendet wurden;
 - Größe der Prüfgefäße und Trockenmasse des Testbodens pro Gefäß;
 - Prüfbedingungen: Lichtintensität, Dauer der Hell-/Dunkel-Zyklen, Temperatur;
 - Beschreibung des Fütterungsregimes; Typ und Menge des im Versuch verwendeten Futters; Zeitpunkte der Fütterung;
 - pH-Wert und Wassergehalt des Bodens zu Beginn und während der Prüfung (Kontrolle und jede einzelne Testkonzentration);
 - detaillierte Beschreibung des Extraktionsverfahrens und der Wirksamkeit des Verfahrens.
- Prüfergebnisse
 - Zahl der in den einzelnen Prüfbehältern ermittelten juvenilen Tiere am Ende der Prüfung;
 - Zahl der am Ende der Prüfung in den einzelnen Prüfbehältern ermittelten adulten Weibchen und abgestorbenen adulten Tiere (%);
 - Beschreibung deutlicher Symptome oder ausgeprägter Verhaltensänderungen;
 - Ergebnisse mit der Referenzchemikalie;
 - zusammenfassende Statistik (EC_x -Werte und/oder NOEC) einschließlich der 95 %-Konfidenzintervalle und einer Erläuterung der Berechnungsmethode;
 - grafische Darstellung der Dosis-Wirkung-Beziehung;
 - Abweichungen von den für diese Prüfmethode beschriebenen Verfahren und außergewöhnliche Vorkommnisse während der Prüfung.

LITERATUR

- (1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). *Gayana Zool.* 57, 21-46.
- (2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. *Pacific Insects* 24, 259-274.
- (3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. und van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. *JSS — Journal of Soils and Sediments* 3, 73-77.
- (4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. 2. Auflage, in: Dahl, F. (Hrsg.): *Die Tierwelt Deutschlands* 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 S.
- (5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the population development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). In: F. Dusbabek und V. Bukva (Hrsg.): *Modern Acarology*. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492.
- (6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). *Proc. 2nd Symp. EURAAC*: S. 241-249.
- (7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. *Proc. IXth Internat. Congr. Acarol.* 1994, Columbus, Ohio: S. 621-628.
- (8) Krogh, P.H. und Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. und van Gestel, C.A.M.: *Handbook of soil invertebrate toxicity tests*. John Wiley Sons, Chichester, S. 239-251.

- (9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Rømbke, J., Rundgren, S. und Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. In: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. und Tarazona, J.V. (Hrsg.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 S.
- (10) Schlosser, H.-J. und Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.
- (11) Schlosser, H.-J. und Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.
- (12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. und Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.
- (13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.
- (14) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1994). Bodenbeschaffenheit; Bestimmung des pH-Wertes, Nr. 10390. ISO, Genf.
- (15) Kapitel C.8 dieses Anhangs: Toxizität für Regenwürmer.
- (16) EPPO (2003): EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.
- (17) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1993). Bodenbeschaffenheit; Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehaltes auf Grundlage der Masse; Gravimetrisches Verfahren, Nr. 11465. ISO, Genf.
- (18) Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. und Tarazona, J.V. 2002. Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. SETAC Press, Pensacola, FL, USA.
- (19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit *Onychiurus fimbriatus* Gisin (Collenbola). Ges.allg.angew. Ent. 3:122-125.
- (20) Schlosser, H.J. und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Zool. Beitr. N.F. 34(3):395-433.
- (21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. u Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.
- (22) Kapitel C.32 dieses Anhangs — Enchyträen-Reproduktionstest.
- (23) ISO (Internationale Organisation für Normung) (1994). Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer — Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*, Nr. 11268-2. ISO, Genf.
- (24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2. Auflage). Chapman & Hall, London, 524 S.
- (25) Dunger, W. und Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2. Aufl.). G. Fischer, Jena, 539 S.
- (26) Lesna, I. und Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with 'good genes' in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.
- (27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.
- (28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Dissertation, Universität Bremen.

-
- (29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of *Hypoaspis aculeifer* Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). *Zoologica Poloniae* 24, 11-59.
- (30) Kevan, D.K. McE. und Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini, 1884), in Nordamerika scheinbar neu aufgetreten (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). *Acarologia* 6, 647-658.
- (31) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD-Veröffentlichungen zu Gesundheit und Arbeitsschutz, Reihe 'Testing and Assessment', Nr. 54, ENV/JM/MONO(2006)18
-

*Anlage 1***Begriffsbestimmungen**

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

Chemikalie: Stoff oder ein Gemisch.

EC_x (Konzentration für eine Wirkung von x %): die Konzentration, die im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines bestimmten Expositionszeitraums eine x %ige Wirkung auf die Testorganismen zeigt. Ein EC₅₀-Wert ist beispielsweise eine Konzentration, bei der davon ausgegangen wird, dass sie sich innerhalb eines bestimmten Expositionszeitraums bei 50 % einer exponierten Population auf einen Prüfungsendpunkt auswirkt.

LOEC (Niedrigste messbare Konzentration mit statistisch signifikanter Wirkung): niedrigste Konzentration einer Prüfchemikalie, die im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines bestimmten Expositionszeitraums eine statistisch signifikante Wirkung ($p \leq 0,05$) zeigt.

NOEC (Höchste messbare Konzentration ohne statistisch signifikante Wirkung): die Konzentration der Prüfchemikalie, bei der keine Wirkung gemessen wird. Für diesen Test zeigt die dem NOEC-Wert entsprechende Konzentration im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines bestimmten Expositionszeitraums keine statistisch signifikante Wirkung ($p \leq 0,05$).

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

Anlage 2

Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität des künstlichen Bodens

Die folgende Methode hat sich zur Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens bewährt. Sie ist in Anhang C von ISO DIS 11268-2 (Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*)). Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung (23) beschrieben.

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

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

Dabei sind:

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

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

D = Trockenmasse des Substrats

—

*Anlage 3***Bestimmung des pH-Wertes von Böden**

Die folgende Methode zur Bestimmung des pH-Wertes von Böden beruht auf ISO DIS 10390: Bodenbeschaffenheit; Bestimmung des pH-Wertes (16).

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

Anlage 4

Anzucht von *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* und Lebensmittelmilben und Synchronisation der Kulturen

Anzucht von *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:

Die Kulturen können in Kunststoffgefäßen oder in Glasgefäßen in einer Mischung aus Gips- und Holzkohlepulver im Verhältnis 9:1 gehalten werden. Der Gips kann erforderlichenfalls durch Zugabe einiger Tropfen destillierten oder entionisierten Wassers feucht gehalten werden. Die optimale Temperatur der Kultur liegt bei 20 ± 2 °C; die Photoperiode (Hell-/Dunkel-Phasen) ist für diese Art nicht von Bedeutung. Als Futter können Milben der Arten *Tyrophagus putrescentiae* oder *Caloglyphus sp.* verwendet werden. (Lebensmilben sind mit Vorsicht zu handhaben, da sie bei Menschen Allergien auslösen können.) Nematoden, Enchytraeen und Collembolen sind als Futter ebenfalls geeignet. Ihre Bezugsquelle sollte protokolliert werden. Die Entwicklung der Population kann mit einem einzigen weiblichen Tier gestartet werden, denn männliche Tiere entwickeln sich in unbefruchteten Eiern. Die Generationen überschneiden sich weitgehend. Ein weibliches Tier kann mindestens 100 Tage lang leben und in diesem Zeitraum etwa 100 Eier ablegen. Die höchste Ablegeleistung wird erreicht zwischen Tag 10 und Tag 40 (nach Erreichen des adulten Stadiums) und beträgt 2,2 Eier pro Weibchen⁻¹ und Tag⁻¹. Die Ausreifung eines Eis zum adulten Weibchen dauert bei einer Temperatur von 20 °C etwa 20 Tage. Es empfiehlt sich, mehrere Kulturen anzulegen und vorrätig zu halten.

Anzucht von *Tyrophagus putrescentiae*:

Die Milben werden in Glasgefäßen mit feinem Bierhefepulver gehalten, die wiederum in einen mit KNO₃-Lösung gefüllten Plastikeimer gestellt werden, damit die Milben nicht entweichen können. Futtermilben werden auf das Pulver gesetzt und anschließend mit einem Spatel vorsichtig unter das Pulver gemischt. Das Pulver ist zweimal wöchentlich zu wechseln.

Synchronisation der Kultur:

Die Testorganismen sollten gleich alt sein (ca. 7 Tage nach Erreichen des adulten Stadiums). Bei einer Kulturtemperatur von 20 °C wird dies erreicht durch

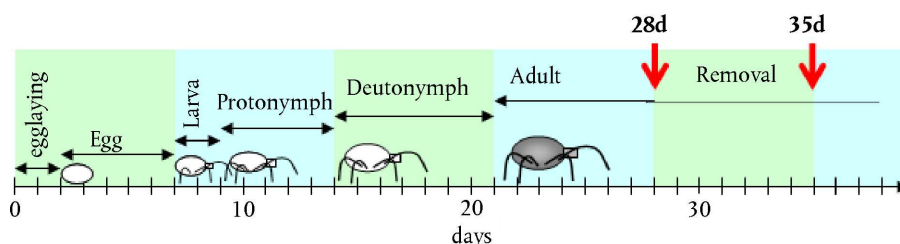
Übertragung der weiblichen Tiere in ein sauberes Kulturgefäß mit anschließender Zugabe von Futter in ausreichender Menge;

- Entnahme der weiblichen Tiere nach zwei bis drei Tagen Zeit für die Eiablage;
- Entnahme adulter Testweibchen zwischen Tag 28 und Tag 35 und Übertragung adulter Weibchen in saubere Kulturgefäße.

Adulte weibliche Tiere sind von männlichen Tieren und von anderen Entwicklungsstadien leicht zu unterscheiden — sie sind größer, aufgebläht und haben einen braunen Rückenschild (männliche Tiere sind schlanker und platter). Noch nicht ausgereifte Tiere sind weiß bis cremefarbig. Die Entwicklungsstadien der Milben verlaufen bei einer Temperatur 20 °C etwa wie folgt (Abbildung): Eier 5d, Larven 2d, Protonymphen 5d, Deutonymphen 7d, Präovipositionsperiode der Weibchen 2d. Danach haben die Milben das adulte Stadium erreicht.

Abbildung

Entwicklung von *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* bei 20 °C (Entnahme = weibliche Testexemplare)



Die adulten Testorganismen werden aus der synchronisierten Kultur entnommen und 28-35 Tage nach Beginn der Eiablage durch die Muttertiere (d. h. 7-14 Tage nach Erreichen des adulten Stadiums) in die Prüfgefäße gesetzt. Dies gewährleistet, dass die Testtiere die Präovipositionsperiode bereits durchlaufen und sich mit ebenfalls im Kulturgefäß vorhandenen männlichen Tieren gepaart haben. Beobachtungen an Laborkulturen lassen darauf schließen, dass sich weibliche Tiere unmittelbar oder kurz nach Erreichen des adulten Stadiums paaren, sofern männliche Tiere vorhanden sind (Ruf, Vaninnen, pers. Beob.). Der 7-Tage-Zeitraum wurde gewählt, um die Laborarbeit zu erleichtern und unterschiedliche Entwicklungen einzelner Exemplare abfedern zu können. Die Eiablage sollte mit mindestens ebenso vielen weiblichen Tieren begonnen werden, wie letztlich für die Prüfung benötigt werden. (Werden beispielsweise 400 weibliche Tiere benötigt, sollten auch mindestens 400 weibliche Tiere zwei bis drei Tage Zeit für die Eiablage gehabt haben.) Ausgangspunkt für die synchronisierte Population sollten mindestens 1 200 Eier sein (Geschlechterverhältnis ca. 0,5, Mortalität ca. 0,2). Um Kannibalismus zu vermeiden, sollten pro Gefäß nicht mehr als 20-30 Eier legende weibliche Tiere gehalten werden.

Anlage 5

Extraktionsverfahren

Bei Mikroarthropoden ist Extraktion unter Wärmeeinfluss eine geeignete Methode, um die Milben aus dem Boden/ dem Substrat zu locken (siehe folgende Abbildung). Da diese Methode auf der Aktivität der Organismen beruht, können ausschließlich bewegungsfähige Exemplare erfasst werden. Bei der Extraktion unter Wärmeeinfluss werden die Lebensbedingungen für die Organismen in den Gefäßen allmählich so verschlechtert, dass sie das Substrat verlassen und in eine Fixierflüssigkeit fallen (z. B. Ethanol). Entscheidend sind die Dauer der Extraktion und der Verlauf von guten über mäßige bis hin zu schlechten Lebensbedingungen. Für Ökotoxizitätsprüfungen muss die Extraktion so schnell wie möglich erfolgen, weil eine Populationsvermehrung während der Extraktion die Ergebnisse verfälschen würde. Andererseits müssen Temperatur und Feuchte der Probe stets in einem Bereich liegen, bei dem die Milben sich noch bewegen können. Die Erwärmung einer Bodenprobe bewirkt eine Austrocknung des Substrats. Erfolgt letztere zu rasch, können auch einzelne Milben austrocknen, bevor sie die Chance haben, das Substrat zu verlassen.

Daher wird folgendes Verfahren empfohlen (24) (25):

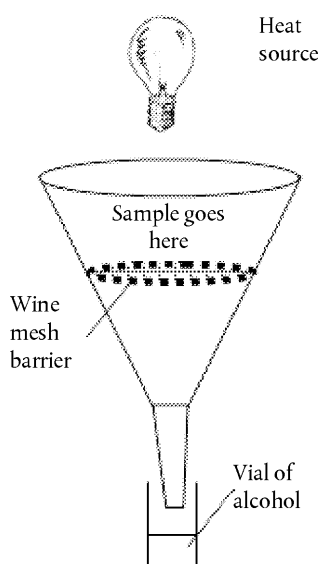
Apparatur: Tullgren-Trichter oder vergleichbare Methoden wie Extraktion nach McFadyen (Erwärmung von oben, Probe steht über einem Trichter).

Erwärmung: 25 °C 12 h, 35 °C 12 h, 45 °C 24 h (insgesamt 48 h); die Temperatur ist im Substrat zu messen.

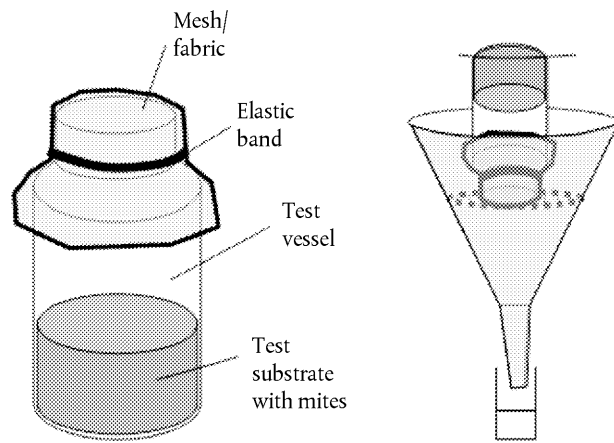
Fixierflüssigkeit: Ethanol (70 %).

Beschreibung: Von dem für die Prüfung verwendeten Glasgefäß Deckel abnehmen und die Öffnung mit Maschendraht oder Stoff umwickeln. Den Stoff, der eine Maschenweite von 1,0-1,5 mm haben sollte, mit einem Gummiband fixieren. Danach die Flasche vorsichtig umdrehen und in die Extraktionsapparatur setzen. Die Maschenweite des Gewebes verhindert, dass das Substrat in die Fixierflüssigkeit sickert, ist aber so groß, dass die Milben die Probe verlassen können. Nach dem Einsetzen aller Gefäße mit der Erwärmung beginnen. Die Extraktion nach 48 Stunden beenden. Fixierte Gefäße entnehmen und die Milben unter einem Stereomikroskop zählen.

Die Extraktionsleistung der gewählten Methode muss ein- bis zweimal jährlich unter Verwendung von Gefäßen mit einer bekannten Anzahl juveniler und adulter Milben in einem unbehandelten Testsubstrat nachgewiesen werden und sollte für alle Entwicklungsstadien zusammengerechnet bei durchschnittlich ≥ 90 % liegen.

Extraktionsapparatur mit Tullgren-Trichter

Vorbereitung des Prüfgefäßes nach Prüfungsende (vor der Extraktion)

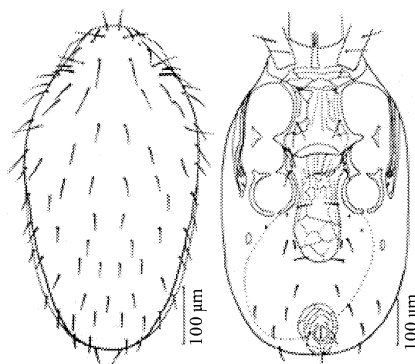


—

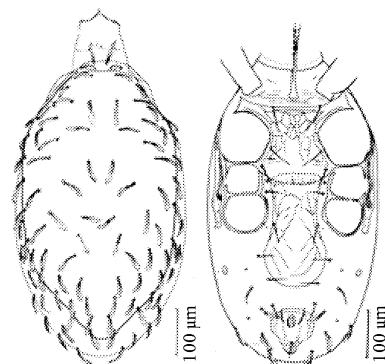
Anlage 6

Identifizierung von *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

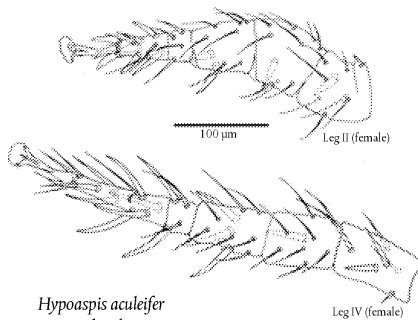
Unterklasse/Ordnung/Unterordnung:	Familie:	Gattung/Untergattung/Art:
Acari/Parasitiformes/Gamasida	Laelapidae	<i>Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer</i>
Autor und Datum:	F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23. Januar 2007	
Literatur:	<p>Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59. Teil, 2. Überarbeitete Auflage: 1-523.</p> <p>Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400 S.</p> <p>Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 S.</p>	
Bestimmungsmerkmale:	<p>Tectum mit abgerundetem gezähntem Rand; Hypostom mit mehr als 6 Zähnen; kaudal-dorsale Seten (Z4), nicht sehr lang; dorsale Seten, Bürsten; Genitalschild normal, nicht sehr vergrößert und nicht bis zum Analschild reichend; hintere Hälfte des Dorsalschilds unpaarige Seten, 2. und 4. Beinpaar mit dicken Makro-Seten; dorsale Seta Z5 etwa doppelt so lang wie J5; fester Chelicerenfinger mit 12-14 Zähnen und beweglicher Chelicerenfinger mit 2 Zähnen; Länge Idiosoma 520-685 µm.</p> <p><i>Hypoaspis miles</i> wird auch zur biologischen Schädlingsbekämpfung eingesetzt und könnte mit <i>H. aculeifer</i> verwechselt werden. Hauptunterschied zwischen den beiden Arten:</p> <p><i>H. miles</i> gehört zur Unterart <i>Cosmolaelaps</i> und hat messerartige dorsale Seten; <i>H. aculeifer</i> hingegen gehört zur Unterart <i>Geolaelaps</i> und hat setiforme (borstenförmige) dorsale Seten.</p>	



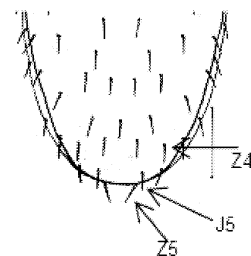
Hypoaspis aculeifer nach Hughes, 1976



Hypoaspis miles nach Hughes, 1976



Hypoaspis aculeifer
Originalzeichnungen F. Faraji



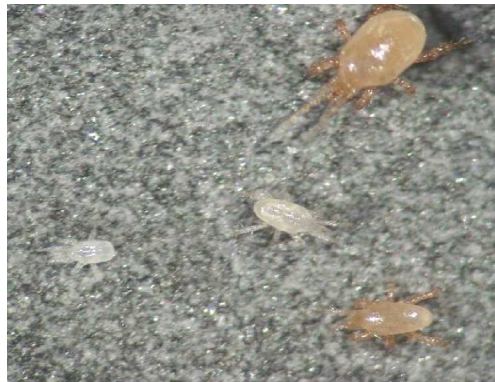
Hypoaspis aculeifer,
Rückenschild mit charakterist. Seten

Anlage 7

Basisinformationen zur Biologie von *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*

Hypoaspis aculeifer gehört zur Familie Lealpidae, Gattung Acari (Milben), Klasse Arachnida, Stamm Arthropoda. Die Milben leben in allen Arten von Böden und ernähren sich von anderen Milben, Nematoden, Enchytraeen und Collembolen (26). Bei Futtermangel kommt es zu Kannibalismus (27). Der Körper der Raubmilbe ist untergliedert in Idiosoma und Gnathosoma. Eine klare Trennung des Idiosoma in Prosoma (Kopf) und Opisthosoma (Bauch) besteht nicht. Das Gnathosoma (der Kopfschild) trägt die Mundwerkzeuge (z. B. Palpen und Cheliceren). Die dreigliedrigen Cheliceren sind mit unterschiedlich geformten Zähnen besetzt. Außer zur Nahrungsaufnahme nutzen die männlichen Tiere ihre Cheliceren vorwiegend, um die Spermatophoren auf die Weibchen zu übertragen. Ein Dorsalschild bedeckt nahezu das gesamte Idiosoma. Ein erheblicher Teil des weiblichen Idiosomas entfällt auf die Fortpflanzungsorgane, die insbesondere kurz vor der Eiablage deutlich ausgeprägt sind. Auf der Bauchseite befinden sich ebenfalls zwei Schilde: der Sternalschild und der Genitalschild. Alle Beine weisen Borsten und Stacheln auf. Die Borsten sorgen für die nötige Haftung beim Fortbewegen im oder auf dem Boden. Das erste Beinpaar hat vorwiegend Antennenfunktion. Das zweite Beinpaar dient nicht nur zur Fortbewegung, sondern auch zum Greifen der Beute. Die Dornen des vierten Beinpaars können sowohl als Schutz als auch zum ‚Antrieb‘ dienen (28). Männliche Tiere sind 0,55-0,65 mm lang und wiegen 10-15 µg. Weibliche Tiere haben eine Länge von 0,8-0,9 mm und ein Gewicht von 50-60 µg (8) (28) (siehe Abb. 1).

Abb. 1

Weibliche und männliche Milben, Protonymphen und Larven von *H. aculeifer*

Bei 23 °C werden die Milben nach 16 Tagen (weibliche Tiere) bzw. nach 18 Tagen (männliche Tiere) geschlechtsreif (6). Die weiblichen Tiere nehmen das Spermium über das Solenostom auf, von wo es in das Ovar gelangt. Dort werden die Spermien aufbewahrt und reifen heran. Die Befruchtung erfolgt erst nach der Ausreifung der Spermien im Ovar. Befruchtete und unbefruchtete Eier werden von den Weibchen in Klumpen oder einzeln vorzugsweise in Spalten oder Löchern abgelegt. Kopulierte Weibchen können Juvenile beider Geschlechter erzeugen; aus Eiern nicht kopulierter Weibchen gehen ausschließlich männliche Tiere hervor. Bei der Entwicklung zur adulten Phase werden der vier Stadien (Ei – Larve, Larve – Protonymphen, Protonymphen – Deutonymphen, Deutonymphen – adultes Tier) durchlaufen.

Die Eier sind milchig weiß, hyalin, elliptisch und etwa 0,37 mm lang mit fester Hülle. Nach (8) sind die Larven 0,42-0,45 mm groß. Sie haben nur drei Beinpaare. Im Kopfbereich werden Palpen und Cheliceren ausgebildet. Die Cheliceren besitzen einige wenige kleine Zähne; diese werden für den Schlupfvorgang genutzt. Nach der ersten Häutung, 1-2 Tage nach dem Schlüpfen, entwickeln sich die Protonymphen. Sie sind ebenfalls weiß, 0,45-0,62 mm lang (8) und haben vier Beinpaare. Die Zähne auf den Cheliceren sind vollständig ausgebildet. Ab diesem Stadium beginnen die Milben zu fressen. Dazu wird die Cuticula der Beute mit den Cheliceren durchstoßen und ein Sekret für die extraintestinale Verdauung in die Beute gespritzt. Der Nahrungsbrei kann dann von der Milbe aufgesaugt werden. Die Cheliceren dienen auch dazu, größere Teilchen aus Futterklumpen zu reißen (28). Nach einer weiteren Häutung entstehen die Deutonymphen. Sie sind 0,60-0,80 mm lang (8) und gelblich bis hellbraun. Ab dieser Phase können weibliche und männliche Tiere unterschieden werden. Nach einer weiteren Ecdysis, während der die Tiere inaktiv sind und sich der braune Schild entwickelt (etwa nach 14 Tagen), ist das adulte Stadium erreicht (28) (29) (30). Die Lebenserwartung der Milben liegt bei einer Temperatur von 25 °C zwischen 48 und 100 Tagen (27).

Anlage 8

Zusammenfassung und Zeitrahmen für die wichtigsten Verfahrensschritte zur Durchführung des Hypoaspis-Tests

Zeit (Tage) Testbeginn = Tag 0	Verfahrensschritt / Aufgabe
Tag – 35 bis – 28	Übertragung der Weibchen aus der Stammkultur in saubere Gefäße, um die Synchronisation zu starten. 2 Tage später: Entnahme der weiblichen Tiere zwei- oder dreimal wöchentlich: Bereitstellung einer ausreichenden Futtermenge
Tag – 5 (+/- 2)	Herstellung des künstlichen Bodens
Tag – 4 (+/- 2)	Bestimmung der Wasserhaltekapazität (WHC) des künstlichen Bodens Trocknen über Nacht Nächster Tag: Wiegen der Proben und WHC-Berechnung
Tag – 4 (+/- 2)	Befeuchten des künstlichen Bodens bis 20-30 % WHC
Tag 0	Beginn des Tests: Zugabe der Prüfchemikalie zum künstlichen Boden Einsetzen von 10 Weibchen je Replik Wiegen der einzelnen Replikate Herstellung abiotischer Kontrollen (für Feuchte und pH-Wert), pro Konzentration zwei Replikate Trocknen der Feuchtigkeitskontrollen über Nacht Nächster Tag: Wiegen der Feuchtigkeitskontrollen Nächster Tag: Messen des pH-Werts der getrockneten abiotischen Kontrollen
Tage 3, 6, 9, 12 (etwa)	Versorgen der einzelnen Replikate mit ausreichender Menge Beuteorganismen Wiegen der einzelnen Replikate und ggf. Zugabe von Wasser
Tag 14	Beenden des Tests; Vorbereiten der Extraktion (alle Replikate) und der Extraktionseffizienzkontrollen Trocknen der Kontrollen über Nacht Nächster Tag: Wiegen der Wassergehaltskontrollen Nächster Tag: Messen des pH-Werts der getrockneten Kontrollen
Tage 16	Beenden der Extraktion
Tag 16+	Aufzeichnung der Anzahl adulter und juveniler Milben im extrahierten Material Eintragen der Ergebnisse in Tabellen Bericht über das Prüfverfahren auf Protokollbögen

C.37. 21-TAGE FISCH-SCREENING-ASSAY: EIN KURZZEITTEST ZUR BESTIMMUNG DER ÖSTROGENEN UND ANDROGENEN AKTIVITÄT UND DER AROMATASEHEMMUNG

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 230 (2009). Die Entwicklung und Validierung eines Fischtests, mit dem bestimmte endokrin aktive Chemikalien nachgewiesen können, geht auf die Befürchtung zurück, dass in der Umwelt vorhandene Chemikalien aufgrund ihrer Interaktion mit dem endokrinen System die Gesundheit von Mensch und Natur gefährden. 1998 hat die OECD vorrangig mit der Änderung bestehender und der Entwicklung neuer Leitlinien für *Screening*-Tests und die Untersuchung potenziell endokriner Disruptoren begonnen. Ein Teil dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer technischen Leitlinie für das Screening von Chemikalien mit Wirkung auf das endokrine System von Fischen. Der 21-Tage-Fisch-Screening-Assay wurde im Rahmen laborübergreifender Untersuchungen an ausgewählten Chemikalien umfassend validiert, um die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Assay für den Nachweis östrogen wirksamer und aromatasehemmender Chemikalien (1)(2)(3)(4)(5) bei den drei untersuchten Fischarten (Dickkopfelritze, Japanischer Reiskarpfing und Zebraabärbling) zu demonstrieren. Bei Dickkopfelritzen und bei Japanischen Reiskarpfinglingen kann androgene Aktivität nachgewiesen werden, nicht aber bei Zebraabärblingen. Anti-androgen wirkende Chemikalien können mit dieser Prüfmethode nicht nachgewiesen werden. Die Validierungsarbeit wurde von einer Gruppe von Experten, die von den nationalen Koordinatoren des Prüfrichtlinien-Programms ernannt wurden, einer *Peer-Review* unterzogen (6). Der Test ist nicht dafür vorgesehen, spezifische endokrinschädigende Wirkmechanismen zu identifizieren, denn die getesteten Fische besitzen eine intakte Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HHG-Achse), die auf unterschiedlichen Ebenen auf Chemikalien, die auf die HHG-Achse einwirken, reagieren kann. Der Kurzzeit-Reproduktionstest an Fischen (*Fish Short Term Reproduction Assay*, FSTRA) (OECD TG 229) umfasst Fruchtbarkeits- und gegebenenfalls histopathologische Gonaden-Untersuchungen bei Dickkopfelritzen sowie sämtliche unter diese Prüfmethode fallenden Endpunkte. Die OECD-Prüfrichtlinie TG 229 sieht ein Screening von Chemikalien vor, die die Reproduktion durch unterschiedliche Mechanismen (u. a. durch endokrine Prozesse) beeinflussen. Dem sollte Rechnung getragen werden, bevor über die geeignetste Prüfmethode entschieden wird.
2. Die vorliegende Prüfmethode entspricht einem *In-vivo*-Screening-Assay, bei dem geschlechtsreife männliche und weibliche Fische gemeinsam gehalten und für einen begrenzten Teil ihres Lebenszyklus (21 Tage) einer Chemikalie ausgesetzt werden. Nach dieser 21-tägigen Exposition werden je nach verwendeter Art bei männlichen und weiblichen Fischen ein oder zwei Biomarker-Endpunkte als Indikatoren einer östrogenen, aromatasehemmenden oder androgenen Wirkung der Prüfchemikalie gemessen. Diese Endpunkte sind Vitellogenin und sekundäre Geschlechtsmerkmale. Vitellogenin wird bei Dickkopfelritzen, bei Japanischen Reiskarpfinglingen und bei Zebraabärblingen gemessen, die sekundären Geschlechtsmerkmale hingegen nur bei Dickkopfelritzen und Japanischen Reiskarpfinglingen.
3. Dieser Bioassay dient dem *In-vivo*-Screening bestimmter endokriner Wirkungsweisen und ist im Zusammenhang mit dem ‚*OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*‘ (28) zu sehen.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

4. Vitellogenin (VTG) wird gewöhnlich von der Leber weiblicher oviparer Vertebraten in Reaktion auf im Blutkreislauf zirkulierendes endogenes Östrogen produziert. VTG ist ein Vorläufer von Eidotterproteinen und wandert, einmal in der Leber produziert, über die Blutbahn zum Eierstock, wo es aufgenommen und von sich entwickelnden Eiern modifiziert wird. Vitellogenin ist im Plasma noch nicht geschlechtsreifer weiblicher und männlicher Fische kaum nachweisbar, da sich bei diesen noch nicht genügend zirkulierendes Östrogen gebildet hat. Die Leber kann Vitellogenin jedoch in Reaktion auf eine exogene Östrogenstimulation synthetisieren und absondern.
5. Die Messung der VTG-Konzentration ermöglicht den Nachweis von Chemikalien mit unterschiedlichen östrogenen Wirkungsweisen. Östrogen wirksame Chemikalien können durch Messung der VTG-Induktion bei männlichen Fischen nachgewiesen werden, was in wissenschaftlichen Veröffentlichungen mit *Peer Review* umfassend dokumentiert wurde (z. B. (7)). VTG-Induktion wurde auch nach Exposition gegenüber aromatisierbaren Androgenen nachgewiesen (8)(9). Eine Reduktion des im Körper weiblicher Tiere zirkulierenden Östrogens, beispielsweise durch Hemmung der Aromatase, die endogenes Androgen in das natürliche Östrogen 17 β -Östradiol umwandelt, bewirkt eine Verringerung der VTG-Konzentration, die zum Nachweis von Chemikalien mit aromatasehemmenden Eigenschaften verwendet wird (10)(11). Die biologische Relevanz der VTG-Reaktion nach einer Östrogen-/Aromatasehemmung ist erwiesen und wurde umfassend dokumentiert. Die VTG-Produktion bei weiblichen Tieren kann aber auch durch allgemeine Toxizität und nicht endokrine toxische Wirkungen (z. B. Hepatotoxizität) beeinflusst werden.

6. Für Routinemessungen haben sich verschiedene standardisierte Verfahren bewährt, so der artspezifische ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), bei dem das in kleinen Blut- oder Leberproben einzelner Fische produzierte Vitellogenin immundiagnostisch quantifiziert wird (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18). Die VTG-Messungen werden an Blutproben und/oder Kopf-/Schwanz-Homogenaten von Dickkopfelritzen und Zebraäbrblingen sowie an Leberproben Japanischer Reiskärpflinge vorgenommen. Bei Japanischen Reiskärpflingen besteht eine ausgeprägte Korrelation zwischen dem im Blut und in der Leber gemessenen VTG (19). Anlage 6 enthält Empfehlungen für Verfahren zur Entnahme von Proben für Vitellogenin-Analysen. Kits für Vitellogenin-Messungen sind allgemein erhältlich; sie sollten auf einem validierten artspezifischen ELISA beruhen.
7. Sekundäre Geschlechtsmerkmale männlicher Fische bestimmter Arten sind äußerlich sichtbar und quantifizierbar und reagieren auf zirkulierende Mengen endogen wirkender Androgene. Dies gilt für Dickkopfelritzen und für Japanische Reiskärpflinge, nicht aber für Zebraäbrblinge, die keine quantifizierbaren sekundären Geschlechtsmerkmale besitzen. Weibliche Tiere behalten die Fähigkeit bei, sekundäre männliche Geschlechtsmerkmale zu entwickeln, wenn sie in Wasser androgen wirksamen Chemikalien ausgesetzt werden. In der Fachliteratur wird auf mehrere Studien hingewiesen, die diese Art von Reaktion bei Dickkopfelritzen (20) und Japanischen Reiskärpflingen (21) belegen. Ein Rückgang sekundärer Geschlechtsmerkmale bei männlichen Fischen sollte aufgrund der geringen statistischen Aussagekraft mit Vorsicht interpretiert werden; jede Wertung sollte sich auf Expertenurteile und die Beweiskraft der Daten stützen. Zebraäbrblinge sind für diesen Test nur begrenzt geeignet, da quantifizierbare sekundäre Geschlechtsmerkmale fehlen, die auf androgen wirksame Chemikalien reagieren könnten.
8. Bei Dickkopfelritzen ist die Zahl der Laichknoten („Nuptialtuberkel“) am Maul weiblicher Fische Hauptindikator einer exogenen Androgenexposition. Wichtigster Marker einer exogenen Exposition gegenüber androgen wirkenden Chemikalien bei weiblichen Japanischen Reiskärpflingen ist die Zahl der Papillenprozesse. Die Anlagen 5A und 5B enthalten Empfehlungen für Verfahren zur Bewertung von Geschlechtsmerkmalen bei Dickkopfelritzen bzw. Japanischen Reiskärpflingen.
9. Für Begriffsbestimmungen zu dieser Prüfmethode siehe Anlage 1.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

10. Beim Assay werden geschlechtsreife männliche und weibliche Fische in Prüfgefäßen gemeinsam einer Prüfchemikalie ausgesetzt. Da die Tiere ausgewachsen und geschlechtsreif sind, kann leicht zwischen den Geschlechtern unterschieden und folglich eine geschlechtsspezifische Analyse der einzelnen Endpunkte vorgenommen werden, und die Sensitivität gegenüber exogenen Chemikalien ist gewährleistet. Bei Testende wird das Geschlecht der Fische durch makroskopische Untersuchung der Gonaden nach bauchseitiger Öffnung des Abdomens mit einer Schere bestimmt. Anlage 2 fasst die wichtigsten Bedingungen des Bioassays zusammen. Der Test wird gewöhnlich mit einer Auswahl an Fischen aus einer Laichpopulation begonnen; seneszente Tiere sollten nicht verwendet werden. Der Abschnitt über die Auswahl der Fische enthält Hinweise zum Alter und zur Geschlechtsreife der Fische. Der Test wird mit drei Konzentrationen der Prüfchemikalie und einer Wasserkontrolle sowie erforderlichenfalls einer Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. Bei Japanischen Reiskärpflingen und bei Zebraäbrblingen werden je Konzentration zwei Gefäße oder Replikate verwendet (jedes Gefäß mit fünf männlichen und fünf weiblichen Fischen); bei Dickkopfelritzen sind je Konzentration vier Gefäße oder Replikate zu verwenden (jedes Gefäß mit zwei männlichen und vier weiblichen Fischen), um dem Territorialverhalten männlicher Dickkopfelritzen Rechnung zu tragen und gleichzeitig hinreichende Aussagekraft zu gewährleisten. Die Exposition erfolgt über einen Zeitraum von 21 Tagen; die Fische werden an Tag 21 nach Beginn der Exposition beprobt.
11. Am Tag der Beprobung (Tag 21) sind alle Tiere möglichst schmerzfrei zu töten. Bei Dickkopfelritzen und Japanischen Reiskärpflingen werden sekundäre Geschlechtsmerkmale gemessen (siehe Anlagen 5A und 5B). Zur Bestimmung der VTG-Konzentration werden von Zebraäbrblingen und Dickkopfelritzen Blutproben entnommen; alternativ kann die VTG-Konzentration bei Zebraäbrblingen auch anhand von Kopf- und Schwanzproben ermittelt werden (Anlage 6); bei Japanischen Reiskärpflingen werden zur VTG-Analyse Leberproben entnommen (Anlage 6).

GÜLTIGKEITSKRITERIEN

12. Die Testergebnisse sind gültig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:
 - Die Mortalität in den Wasser- (oder Lösungsmittel-)kontrollen darf am Ende der Exposition höchstens 10 % betragen;
 - die Konzentration an gelöstem Sauerstoff sollte während der gesamten Exposition mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen;

- die Wassertemperatur der Prüfgefäße sollte während der Exposition zu keinem Zeitpunkt um mehr als $\pm 1,5$ °C schwanken und bei einer Toleranz von 2 °C in dem Temperaturbereich liegen, der für die Testspezies vorgesehen ist (Anlage 2);
- es muss belegt werden, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung mit einer Toleranz von ± 20 % bezogen auf die gemessenen Mittelwerte aufrechterhalten wurden.

BESCHREIBUNG DER METHODE

Apparatur

13. Übliche Laborausrüstung und insbesondere die folgenden Geräte:
 - a) Sauerstoff- und pH-Messgeräte;
 - b) Geräte zur Messung von Wasserhärte und Alkalität;
 - c) geeignete Apparaturen zur Temperaturregelung und einer möglichst kontinuierlichen Überwachung;
 - d) Becken aus chemisch inertem Material und mit für das empfohlene Besatzverhältnis und die empfohlene Besatzdichte geeignetem Fassungsvermögen (siehe Anlage 2);
 - e) Laichsubstrat für Dickkopfelritzen und Zebraärblinge (für Einzelheiten siehe Anlage 4);
 - f) eine Waage mit angemessener Genauigkeit ($\pm 0,5$ mg).

Wasser

14. Als Testwasser kann jedes beliebige Wasser verwendet werden, in dem die Testspezies über einen längeren Zeitraum überleben und wachsen können. Während der gesamten Testdauer sollte eine konstante Wasserqualität gewährleistet sein. Der pH-Wert des Wassers sollte im Bereich 6,5-8,5 liegen und im Test um nicht mehr als $\pm 0,5$ pH-Einheiten schwanken. Um sicherzustellen, dass das Verdünnungswasser das Testergebnis nicht übermäßig stark beeinflusst (beispielsweise durch Komplexierung der Prüfchemikalie), sind regelmäßig Proben zu analysieren. Das Wasser ist auf Schwermetalle (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd und Ni), dominante Anionen und Kationen (z. B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- und SO_4^{2-}), Pestizide (z. B. den Gesamtgehalt an phosphororganischen und chlororganischen Pestiziden), den gesamten organischen Kohlenstoff und suspendierte Feststoffe zu untersuchen (beispielsweise alle drei Monate, wenn bekannt ist, dass das Wasser qualitativ gesehen relativ konstant ist). Ist die Wasserqualität nachweislich mindestens ein Jahr lang konstant geblieben, so können die Analysen seltener durchgeführt und die Abstände zwischen den Analysen verlängert werden (beispielsweise auf sechs Monate). Einige chemische Merkmale akzeptablen Verdünnungswassers sind in Anlage 3 gegeben.

Testlösungen

15. Die Testlösungen werden durch Verdünnung einer Stammlösung in den gewünschten Konzentrationen zubereitet. Die Stammlösung sollte möglichst durch einfaches mechanisches Vermischen oder Schütteln (z. B. durch Rühren oder mit Ultraschall) der Prüfchemikalie in Verdünnungswasser hergestellt werden. Zur Herstellung einer Stammlösung in geeigneter Konzentration können Sättigungssäulen (Löslichkeitssäulen) verwendet werden. Die Verwendung von Lösungsmittelträgern wird nicht empfohlen. Ist jedoch ein Lösungsmittel erforderlich, so sollte zeitgleich in derselben Lösungsmittelkonzentration wie bei der chemischen Behandlung eine Lösungsmittelkontrolle verwendet werden. Bei schwierigen Prüfchemikalien kann die Verwendung eines Lösungsmittels aus technischer Sicht die beste Lösung darstellen (siehe *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures*) (22). Welches Lösungsmittel zu verwenden ist, hängt von den chemischen Eigenschaften der Chemikalie ab. Der OECD-Leitfaden empfiehlt höchstens 100 µl/l; dieser Wert sollte eingehalten werden. In einer kürzlich durchgeführten Untersuchung (23) wurde jedoch auf weitere Bedenken hinsichtlich der Verwendung von Lösungsmitteln in Tests zur Prüfung endokriner Wirkungen verwiesen. Daher sollte die Lösungsmittelkonzentration (wenn überhaupt ein Lösungsmittel verwendet werden muss) so weit wie technisch möglich minimiert werden (je nach physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie).
16. Für den Test ist ein Durchflusssystem zu verwenden. Ein solches System gibt kontinuierlich eine Stammlösung der Prüfchemikalie ab und verdünnt diese (z. B. mit einer Dosierpumpe, einem Proportionalverdünner oder einer Sättigungsvorrichtung), damit unterschiedliche Konzentrationen in die Prüfkammern gelangen. Die Durchflussraten von Stammlösungen und Verdünnungswasser sind während des Tests regelmäßig — vorzugsweise täglich — zu kontrollieren und dürfen während des Tests um höchstens 10 % schwanken. Insbesondere sind Kunststoffleitungen aus minderwertigem Material oder sonstige Materialien zu vermeiden, die biologisch aktive Chemikalien enthalten könnten. Bei der Auswahl des Materials für das Durchflusssystem ist eine mögliche Adsorption der Prüfchemikalie an das Material zu berücksichtigen.

Halten der Fische

17. Die zu testenden Fische sollten aus einer Laborpopulation stammen, vorzugsweise aus einem einzelnen Bestand, der mindestens zwei Wochen vor dem Test bei ähnlicher Wasserqualität und ähnlichen Lichtverhältnissen wie im Test akklimatisiert wurde. Besatz(verhältnis) und Besatzdichte (Begriffsbestimmungen siehe Anlage 1) müssen der jeweils verwendeten Art entsprechen (siehe Anlage 2).
18. Nach einer 48-stündigen Akklimatisierung werden die Mortalitäten erfasst; dabei gelten die folgenden Kriterien:
 - Bei Mortalitäten von mehr als 10 % der Population innerhalb von sieben Tagen: Die gesamte Charge verwerfen.
 - Bei Mortalitäten zwischen 5 und 10 % der Population: Akklimatisierung der Fische für weitere sieben Tage; wenn die Mortalität auch in den zusätzlichen sieben Tagen noch über 5 % liegt: die gesamte Charge verwerfen.
 - Bei Mortalitäten von weniger als 5 % der Population innerhalb sieben Tagen wird die Charge akzeptiert.
19. Während der Akklimatisierung, der Präexposition und der eigentlichen Exposition sollten Fische nicht gegen Krankheiten behandelt werden.

Präexposition und Auswahl der Fische

20. Eine einwöchige Präexposition wird empfohlen; dabei werden die Fische in prüfgefäßähnliche Becken gesetzt. Während der gesamten Haltungsdauer und während der Exposition werden die Fische *ad libitum* gefüttert. Die Expositionsphase beginnt mit sexuell dimorphen adulten, aktiv laichenden Fischen aus einer Laborpopulation geschlechtsreifer Tiere (z. B. mit deutlichen sekundären Geschlechtsmerkmalen bei Dickkopfelritzen und bei Japanischen Reiskarpfingen). Als Faustregel (nur im Kontext der Beobachtung des tatsächlichen Reproduktionsstatus einer bestimmten Charge anzuwenden) gilt, dass Dickkopfelritzen ca. 20 (\pm 2) Wochen alt sein sollten, vorausgesetzt, sie wurden während ihrer gesamten Lebensdauer bei einer Temperatur von 25 ± 2 °C gehalten. Unter denselben Bedingungen sollten Japanische Reiskarpfinge etwa 16 (\pm 2) Wochen alt sein. Zebraabräblinge sollten etwa 16 (\pm 2) Wochen alt sein, sofern sie während ihres gesamten Lebens bei 26 ± 2 °C gehalten wurden.

VERSUCHSPLAN

21. Für den Test sind drei Konzentrationen der Prüfchemikalie, eine Kontrolle (Wasser) und erforderlichenfalls eine Lösungsmittelkontrolle zu verwenden. Die Daten können analysiert werden, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlungs- und Kontrollreaktion festzustellen. Diese Analysen dienen eher der Feststellung, ob die Chemikalie in weiteren Langzeittests auf unerwünschte Wirkungen (nämlich Überleben, Entwicklung, Wachstum und Reproduktion) untersucht werden muss, als der Verwendung für Risikobewertungen (24).
22. Bei Zebraabräblingen und bei Japanischen Reiskarpfingen werden an Tag 21 des Assay männliche und weibliche Tiere aus jeder Konzentrationsgruppe (jedes Replikat enthält 5 männliche und 5 weibliche Fische) und aus der/den Kontrollgruppe(n) für die Untersuchung auf Vitellogenin und sekundäre Geschlechtsmerkmale beprobt; bei den Dickkopfelritzen werden an Tag 21 der Exposition männliche und weibliche Tiere (jedes der vier Replikate enthält 2 männliche und 4 weibliche Fische), auch aus der/den Kontrollgruppe(n), für die Untersuchung auf Vitellogenin und sekundäre Geschlechtsmerkmale beprobt.

Auswahl der Testkonzentrationen

23. Für die Zwecke dieses Assay sollte die höchste Testkonzentration auf die in einem Vorversuch bestimmte oder aus anderen Toxizitätsdaten hervorgehende höchste noch verträgliche Konzentration (*Maximum Tolerated Concentration*, MTC) oder auf 10 mg/l oder auf den Höchstwert der Wasserlöslichkeit festgesetzt werden, je nach dem, welcher Wert der niedrigere ist. Der MTC-Wert gilt als die höchste Testkonzentration der Chemikalie, bei der die Mortalität weniger als 10 % beträgt. Dieser Ansatz geht davon aus, dass empirische Daten zur akuten Toxizität oder sonstige Toxizitätsdaten vorliegen, anhand deren der MTC-Wert bestimmt werden kann. Die Schätzung des MTC-Wertes kann ungenau sein und setzt in der Regel Fachkenntnis voraus.
24. Benötigt werden drei Testkonzentrationen mit einem konstanten Abstandsfaktor von maximal 10 und eine Verdünnungswasserkontrolle (sowie bei Bedarf eine Lösungsmittelkontrolle). Empfohlen werden Abstandsfaktoren zwischen 3,2 und 10.

VERFAHREN

Auswahl und Wiegen der Testfische

25. Wichtig ist, dass die Gewichtsunterschiede der Fische zu Beginn des Tests möglichst gering sind. Für geeignete Größenbereiche für die empfohlenen Testspezies siehe Anlage 2. Bei der gesamten Charge der in diesem Test verwendeten Fische sollte bei männlichen und weiblichen Tieren das individuelle Gewicht möglichst im Bereich von $\pm 20\%$ des arithmetischen Mittelgewichts der Fische gleichen Geschlechts liegen. Um das Mittelgewicht zu bestimmen, wird empfohlen, vor dem Test eine Teilprobe des Fischbestands zu wiegen.

Expositionsbedingungen*Dauer*

26. Der Test dauert 21 Tage nach vorheriger (möglichst einwöchiger) Präexposition.

Fütterung

27. Die Fische werden *ad libitum* so oft mit geeignetem Futter (Anlage 2) versorgt, wie für eine normale Entwicklung der Tiere nötig ist. Dabei ist darauf zu achten, dass es nicht zu einer Vermehrung von Mikroorganismen und nicht zu einer Eintrübung des Wassers kommt. Im Allgemeinen kann die Tagesration auf zwei oder drei gleiche Portionen verteilt werden, die in mindestens dreistündigem Abstand zu verabreichen sind. Insbesondere an Wochenenden kann eine einzige, größere Ration gegeben werden. 12 Stunden vor der Probenahme/Sektion sollten die Fische nicht mehr gefüttert werden.
28. Das Fischfutter ist auf Verunreinigungen wie chlororganische Pestizide, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und polychlorierte Biphenyle (PCB) zu untersuchen. Futter mit erhöhtem Gehalt an Phytoöstrogenen, die die Testreaktion auf bekannte Östrogenagonisten (z. B. 17-beta-Östradiol) beeinträchtigen würden, darf nicht verwendet werden.
29. Nicht aufgenommenes Futter und Fäkalien sind mindestens zweimal wöchentlich aus den Prüfgefäßen zu entfernen (etwa durch vorsichtiges Absaugen vom Beckenboden).

Licht und Temperatur

30. Die Photoperiode (Hell-/Dunkel-Phasen) und die Wassertemperatur müssen Testspezies entsprechen (siehe Anlage 2).

Häufigkeit der Analysen und Messungen

31. Vor Beginn der Exposition ist zu überprüfen, ob die Chemikalienbeschickung einwandfrei funktioniert. Es dürfen ausschließlich anerkannte Analysemethoden angewandt werden, und die Stabilität der Chemikalie im Prüfsystem muss hinreichend bekannt sein. Während des Tests sind die Konzentrationen der Prüfchemikalie in regelmäßigen Zeitabständen wie folgt zu bestimmen: Die Zuflussmengen der Verdünnungslösung und der Stammlösung der Prüfchemikalie sind regelmäßig — vorzugsweise täglich, jedoch mindestens zweimal wöchentlich — zu kontrollieren und sollten während des gesamten Tests um maximal 10 % schwanken. Die tatsächlichen Konzentrationen der Prüfchemikalie sollten zu Beginn des Tests in allen Gefäßen und danach wöchentlich gemessen werden.
32. Die Ergebnisse sollten auf gemessenen Konzentrationen basieren. Wurde die Konzentration der Chemikalienlösung während des gesamten Tests jedoch zufriedenstellend innerhalb der nominellen Konzentration ($\pm 20\%$) gehalten, so können sich die Ergebnisse auf die nominalen oder die gemessenen Werte beziehen.
33. Unter Umständen müssen die Proben gefiltert (z. B. mit Filtern einer Porengröße von 0,45 μm) oder zentrifugiert werden. Erforderlichenfalls ist Zentrifugierung vorzuziehen. Prüfchemikalien, die sich nachweislich nicht an Filter adsorbieren, können auch filtriert werden.

34. Während des Tests sollten bei allen Prüfgefäßen mindestens einmal wöchentlich der gelöste Sauerstoff, die Temperatur und der pH-Wert gemessen werden. Die Gesamthärte und die Gesamtkalkalität sollten in den Kontrollen und in einem Gefäß mit höchster Testkonzentration ebenfalls mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Es wird empfohlen, dass die Temperatur in mindestens einem Prüfgefäß kontinuierlich überwacht wird.

Beobachtungen

35. Im Laufe oder am Ende des Assay sind verschiedene allgemeine Reaktionen (z. B. Überleben) sowie spezifische biologische Reaktionen (z. B. Vitellogenin-Gehalt) zu bestimmen. Die Messung und Auswertung dieser Endpunkte und die Verwendbarkeit der Ergebnisse werden im Folgenden erläutert.

Überleben

36. Die Fische sind während des Tests täglich zu kontrollieren; Todesfälle sind zu protokollieren und tote Fische sobald wie möglich zu entfernen. Tote Fische dürfen weder in Kontroll- noch in Prüfgefäße eingesetzt werden. Das Geschlecht der im Test gestorbenen Fische wird durch makroskopische Gonadenuntersuchung bestimmt.

Verhalten und Aussehen

37. Jegliches anomale Verhalten (gemessen an den Kontrollen) ist zu protokollieren. Dies gilt für Anzeichen allgemeiner Toxizität ebenso wie für Hyperventilation, unkoordinierte Schwimmbewegungen, Gleichgewichtsverluste und atypische Apathie oder ungewöhnliches Fressverhalten. Zudem sind äußerliche Auffälligkeiten (z. B. Blutungen oder Verfärbungen) aufzuzeichnen. Derartige Anzeichen einer toxischen Wirkung sind bei der Datenauswertung insoweit sorgfältig zu berücksichtigen, als sie auf Konzentrationen hinweisen können, bei denen die Biomarker endokriner Wirkungen keine zuverlässigen Rückschlüsse gestatten. Diese Verhaltensauffälligkeiten können auch wertvolle qualitative Informationen liefern, an denen sich künftige Fischtests orientieren können. Bei Dickkopfelritzen wurde unter Einwirkung von Androgenen beispielsweise aggressives Territorialverhalten bei normalen Männchen oder maskulinisierten Weibchen beobachtet. Bei Zebraäbrlingen hemmen Östrogene oder Anti-Androgene das typische Paarungs- und Laichverhalten bei einsetzender Morgendämmerung.
38. Da sich verschiedene äußere Merkmale (in erster Linie die Farbe) beim Hantieren der Fische rasch verändern können, sind qualitative Beobachtungen vor der Entnahme von Fischen aus dem Prüfsystem wichtig: Bisherige Erfahrungen mit Dickkopfelritzen führen zu dem Schluss, dass einige endokrin wirkende Chemikalien anfangs zu Veränderungen der folgenden äußeren Merkmale führen: Körperfarbe (hell oder dunkel), Farbmusterung (Auftreten vertikaler Streifen) und Körperform (im Kopf- oder Schwanzbereich). Daher muss im Laufe und am Ende des Tests das äußere Erscheinungsbild der Fische kontrolliert werden.

Schmerzfreies Töten

39. An Tag 21, d. h. bei Ablauf der Expositionsdauer, sind die Fische mit angemessenen Mengen Tricain (Tricainmethansulfonat, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l gepuffert mit 300 mg/l NaHCO₃ (Natriumbicarbonat, CAS 144-55-8) zu töten, um Schleimhautreizungen zu begrenzen. Anschließend wird zur Vitellogenin-Bestimmung Blut oder Gewebe entnommen, wie im Abschnitt über Vitellogenin beschrieben.

Untersuchung sekundärer Geschlechtsmerkmale

40. Manche endokrin wirkende Chemikalien können Veränderungen spezifischer sekundärer Geschlechtsmerkmale (Anzahl Laichknoten („Nuptialtuberkel“) bei männlichen Dickkopfelritzen oder bei männlichen Japanischen Reiskärpflingen) zur Folge haben. Insbesondere Papillenprozesse Chemikalien mit bestimmten Wirkungsweisen können bei Tieren des jeweils anderen Geschlechts zu Anomalien der sekundären Geschlechtsmerkmale führen. So können Androgenrezeptor-Agonisten wie Trenbolon, Methyltestosteron und Dihydrotestosteron bewirken, dass weibliche Dickkopfelritzen ausgeprägten Laichausschlag („Nuptialtuberkel“) entwickeln oder dass bei weiblichen Japanischen Reiskärpflingen Papillenprozesse auftreten (11)(20)(21). Außerdem wurde berichtet, dass Östrogenrezeptor-Agonisten dazu führen können, dass sich die Zahl der Laichknoten und die Größe des dorsalen Nackenaufwuchses bei adulten Männchen verringern (25)(26). Diese wesentlichen morphologischen Beobachtungen können auch eine qualitativ und quantitativ wertvolle Informationsgrundlage für potenzielle künftige Fischtests liefern. Anzahl und Größe der Laichknoten bei Dickkopfelritzen und Papillenprozesse bei Japanischen Reiskärpflingen können entweder direkt oder — bequemer — an konservierten Exemplaren gezählt werden. Die Anlagen 5A und 5B enthalten Empfehlungen für Verfahren zur Beurteilung sekundärer Geschlechtsmerkmale bei Dickkopfelritzen bzw. Japanischen Reiskärpflingen.

Vitellogenin (VTG)

41. Das für die VTG-Bestimmung erforderliche Blut wird mit einem heparinisierten Mikrohämatokrit-Kapillarröhrchen aus der Schwanzarterie/-vene oder alternativ durch Herzpunktion mit einer Spritze entnommen. Je nach Größe der Fische werden bei Dickkopflritzeen 5-60 µl und bei Zebraabärblingen 5-15 µl Blut (jeweils pro Fisch) benötigt. Das Plasma wird durch Zentrifugieren vom Blut getrennt und mit Proteasehemmern bis zur Vitellogenin-Analyse bei - 80 °C aufbewahrt. Alternativ kann bei Zebraabärblingen die Leber verwendet werden; bei Zebraabärblingen kommen Kopf-/Schwanz-Homogenate als Gewebematerial für die Vitellogenin-Analyse in Betracht (Anlage 6). Die VTG-Messung sollte nach einer validierten homologen ELISA-Methode mit homologem VTG-Standard und homologen Antikörpern erfolgen. Empfohlen werden Methoden, mit denen kleinste VTG-Gehalte (wenige ng/ml Plasma oder ng/mg Gewebe, die der Hintergrundkonzentration bei nicht exponierten männlichen Fischen entsprechen) ermittelt werden können.
42. Die Qualitätskontrolle der Vitellogenin-Analyse erfolgt anhand von Standards, Blindproben und zumindest Doppelanalysen. Für jede ELISA-Methode ist ein Test auf Matrixeffekte (Effekte der Probenverdünnung) vorzunehmen, um den Mindestverdünnungsfaktor zu ermitteln. Alle für VTG-Analysen verwendeten ELISA-Platten müssen zumindest auch folgende Proben für die Qualitätskontrolle enthalten: 6 Kalibrierstandards für den gesamten Bereich der erwarteten Vitellogenin-Konzentrationen und eine nicht spezifische Binding-Assay-Blindprobe (doppelt zu analysieren). Die Adsorption dieser Blindproben sollte weniger als 5 % der maximalen Adsorption des Kalibrierstandards betragen. Von jeder Verdünnung sind mindestens zwei Aliquoten (Muldenduplikate) zu analysieren. Duplikatmulden mit über 20 % Differenz sollten ein zweites Mal analysiert werden.
43. Der Korrelationskoeffizient (R^2) für Kalibrierkurven sollte größer als 0,99 sein. Eine hohe Korrelation reicht jedoch nicht aus, um in allen Bereichen Konzentrationen adäquat vorabzuschätzen. Neben der Notwendigkeit einer hinreichend hohen Korrelation für die Kalibrierkurve sollte alle aus der Kalibrierkurve errechneten Konzentrationen der einzelnen Standards im Bereich von 70-120 % der jeweiligen nominellen Konzentration liegen. Wenn die nominellen Konzentrationen tendenziell von der Regressionsgeraden abweichen (beispielsweise bei niedrigeren Konzentrationen), muss die Kalibrierkurve möglicherweise in niedrige und hohe Bereiche aufgeteilt oder ein nicht lineares Modell für die Adsorptionsdaten verwendet werden. Bei geteilten Kurven muss der Korrelationskoeffizient R^2 bei beiden Segmenten $> 0,99$ sein.
44. Als Nachweisgrenze wird die Konzentration des niedrigsten Analysestandards bezeichnet; die Quantifizierungsgrenze ist die Konzentration des niedrigsten Analysestandards multipliziert mit dem niedrigsten Verdünnungsfaktor.
45. An den Tagen, an denen Vitellogenin-Analysen stattfinden, ist eine mit einem Inter-Assay-Referenzstandard hergestellte Anreicherungsprobe zu analysieren (Anlage 7). Das Verhältnis der erwarteten zur gemessenen Konzentration ist zusammen mit den Ergebnissen der am diesem Tag durchgeführten Testreihen aufzuzeichnen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung von Biomarkerreaktionen durch Varianzanalyse (ANOVA)

46. Um die potenziell endokrine Aktivität einer Chemikalie zu ermitteln, werden die Wirkungen in den Prüf- und in den Kontrollgefäßen mittels Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Wird eine Lösungsmittelkontrolle verwendet, sollten Verdünnungswasser und Lösungsmittelkontrollen zur Bestimmung des jeweiligen Endpunkts nach geeigneten Methoden statistisch analysiert werden. Für Leitlinien zur Verwendung der Daten über Verdünnungswasser und Lösungsmittelkontrollen für die anschließende statistische Analyse siehe OECD 2006c (27). Alle Daten zu biologischen Reaktionen sind nach Geschlechtern zu analysieren und aufzuzeichnen. Sind die Voraussetzungen für parametrische Methoden nicht erfüllt, d. h. keine Normalverteilung (z. B. Shapiro-Wilk-Test) oder heterogene Varianz (Bartlett-Test oder Levene-Test), sollte vor der ANOVA eine Datentransformation zur Varianzhomogenisierung in Betracht gezogen oder eine gewichtete ANOVA durchgeführt werden. Bei nicht monotonen Dosis-Wirkungs-Beziehungen kann der (parametrische) Dunnett-Test (Paarvergleiche) oder ein (nicht parametrischer) Mann-Whitney-Test mit Anpassung nach Bonferroni durchgeführt werden. Andere statistische Tests kommen ebenfalls in Betracht (z. B. ein Jonckheere-Terpstra- oder ein Williams-Test), wenn die Dosis-Wirkungs-Beziehung annähernd monoton ist. Das statistische Flussdiagramm in Anlage 8 soll die Auswahl des jeweils am besten geeigneten statistischen Tests erleichtern. Für weitere Informationen siehe OECD-Dokument ‚*Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data*‘ (27).

Testergebnisse

47. Die Versuchsdaten sollten Folgendes umfassen:

Prüfinstitut:

- Verantwortliche Mitarbeiter und ihre jeweiligen Zuständigkeiten im Rahmen des Assay
- Jedes Labor muss seine Eignung anhand repräsentativer Chemikalien nachweisen.

Prüfchemikalie:

- Charakterisierung der Prüfchemikalie;
- physikalischer Zustand und physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Methode und Häufigkeit der Herstellung von Prüfkonzentrationen;
- Angaben zur Stabilität und zur biologischen Abbaubarkeit.

Lösungsmittel:

- Charakterisierung des Lösungsmittels (Beschaffenheit und verwendete Konzentration);
- Gründe für die Wahl des jeweiligen Lösungsmittels (wenn nicht nur Wasser als Lösungsmittel verwendet wird).

Zu testende Tiere:

- Art und Stamm;
- Bezugsquelle und Angaben zur jeweiligen Bezugsanlage;
- Alter der Fische zu Beginn des Tests und Reproduktions- /Laichstatus;
- Angaben zur Akklimatisierungsverfahren;
- Körpergewicht der Fische zu Beginn der Exposition (aus einer Teilprobe des Fischbestands).

Prüfbedingungen:

- angewandte Prüfmethode (Testtyp, Besatz(verhältnis), Besatzdichte usw.);
- Methode für die Herstellung der Stammlösungen und Durchflussrate;
- nominelle Testkonzentrationen, wöchentlich gemessene Konzentrationen der Testlösungen und angewandte Analysemethoden, mittlere Messwerte und Standardabweichungen in den Prüfgefäßen sowie Nachweis, dass sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der tatsächlichen Lösung beziehen;
- Merkmale des Verdünnungswassers (pH-Wert, Härte, Alkalität, Temperatur, Konzentration an gelöstem Sauerstoff, Restchlorgehalt, Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff, suspendierte Feststoffen und andere ermittelte Messwerte);
- Wasserqualität in den Prüfgefäßen; pH-Wert, Härte, Temperatur und Konzentration an gelöstem Sauerstoff;
- detaillierte Angaben zur Fütterung (Art des Futters, Bezugsquelle/Herkunft, verfütterte Menge und Häufigkeit der Fütterung sowie, soweit vorhanden, Analysen zur Feststellung etwaiger Schadstoffe (z. B. PCB, PAH und chlororganische Pestizide).

Ergebnisse

- Nachweis, dass die Kontrollen die Validitätskriterien des Tests erfüllen;
- Daten zu Mortalitäten für Testkonzentrationen und Kontrolle;
- angewandte statistische Analysemethoden, Datenauswertung und Gründe für die Wahl der angewandten Methoden;
- Daten zu biologischen Beobachtungen (deutliche morphologische Änderungen u. a. der sekundären Geschlechtsmerkmale und Vitellogenin-Konzentration);
- Ergebnisse der Datenanalysen, vorzugsweise in tabellarischer und in grafischer Form;
- ungewöhnliche Reaktionen der Fische sowie jegliche sichtbare Wirkungen der Prüfchemikalie.

LEITLINIEN FÜR DIE AUSWERTUNG UND VALIDITÄT DER TESTERGEBNISSE

48. Dieser Abschnitt enthält Empfehlungen für die Auswertung der Testergebnisse für die gemessenen Endpunkte. Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren, wenn die Prüfchemikalie eindeutig toxisch wirkt oder den Allgemeinzustand der Testtiere verschlechtert.
49. Bei der Festlegung der Bandbreite der Prüfchemikalienkonzentrationen ist darauf zu achten, dass die für eine aussagekräftige Datenauswertung höchste noch verträgliche Konzentration nicht überschritten wird. Wichtig ist dabei, dass bei mindestens einer Konzentration keine Anzeichen einer toxischen Wirkung festgestellt werden. Krankheitssymptome und Anzeichen toxischer Wirkungen sind gründlich zu untersuchen und aufzuzeichnen. Beispielsweise kann die VTG-Produktion bei weiblichen Tieren auch durch allgemeine Toxizität und nichtendokrine toxische Wirkungsweisen (z. B. durch Hepatotoxizität) beeinträchtigt werden. Die Wirkungsauswertung lässt sich jedoch durch andere Konzentrationen untermauern, die nicht durch systemische Toxizität beeinträchtigt werden.
50. Um Testergebnisse als gültig anerkennen zu können, müssen bestimmte Aspekte berücksichtigt werden. Als Faustregel gilt, dass sich die VTG-Konzentrationen in Kontrollgruppen männlicher und weiblicher Fische bei Dickkopfelritzen und bei Zebraäbrlingen in etwa um mindestens drei Größenordnungen und bei Japanischen Reiskärpflingen in etwa um mindestens eine Größenordnung unterscheiden müssen. Für Beispiele für den Konzentrationsbereich bei Kontroll- und Behandlungsgruppen siehe Validierungsberichte (1)(2)(3)(4). Hohe VTG-Konzentrationen bei männlichen Kontrollfischen könnten die Aussagekraft des Assay und dessen Fähigkeit zum Nachweis schwacher Östrogen-Agonisten beeinträchtigen. Und niedrige VTG-Konzentrationen bei weiblichen Kontrollfischen könnten die Aussagekraft des Assays und dessen Fähigkeit zum Nachweis von Aromatasehemmern und Östrogen-Antagonisten beeinträchtigen. Diese Leitlinien beruht auf diesen Validierungsstudien.
51. Führt ein Labor den Assay zum ersten Mal durch oder wurden wesentliche Änderungen vorgenommen (beispielsweise Änderungen des Fischstammes oder der Bezugsquelle), sollte eine technische Eignungsprüfung durchgeführt werden. Nach Möglichkeit sollten Chemikalien verwendet werden, die ein breites Spektrum an Wirkungsweisen oder Wirkungen auf mehrere Test-Endpunkte abdecken. Die Labors werden aufgefordert, für männliche und weibliche Tiere eigene historische Kontrolldaten zu sammeln und eine positive Kontrollchemikalie (z. B. 17β -Östradiol in einer Konzentration von 100 ng/l oder einen bekannten schwachen Agonisten) auf östrogene Wirkung mit erhöhter VTG-Konzentration in männlichen Fischen, eine positive Kontrollchemikalie (z. B. Fadrozol oder Prochloraz in einer Konzentration von 300 μ g/l) auf Aromatasehemmung mit reduzierter VTG-Konzentration in weiblichen Fischen und eine positive Kontrollchemikalie (z. B. 17β -Trenbolon in einer Konzentration von 5 μ g/l) auf androgene Wirkung und resultierender Induktion sekundärer Geschlechtsmerkmale bei weiblichen Dickkopfelritzen und weiblichen Japanischen Reiskärpflingen zu prüfen. Diese Daten können insgesamt mit verfügbaren Daten aus den Validierungsstudien (1)(2)(3) verglichen werden, um die Eignung des jeweiligen Labors sicherzustellen.
52. Grundsätzlich gelten Vitellogenin-Messungen als positiv, wenn eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der VTG-Konzentration in männlichen Fischen oder eine statistisch signifikante ($p < 0,05$) Reduzierung bei weiblichen Fischen zumindest bei der höchsten geprüften Dosis im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt wird und keine Anzeichen einer allgemeinen Toxizität vorliegen. Ein positives Ergebnis wird auch durch Nachweis einer biologisch plausiblen Beziehung zwischen der Dosis- und der Wirkungskurve bestätigt. Wie bereits erläutert, muss eine Reduzierung der VTG-Konzentration nicht unbedingt endokrinen Ursprungs sein. Ein positives Ergebnis sollte jedoch grundsätzlich als *In-vivo*-Nachweis einer endokrinen Wirkung ausgelegt werden und zur Klärung weitere Untersuchungen nach sich ziehen.

LITERATUR

- (1) OECD (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.
- (2) OECD (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.
- (3) OECD (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.
- (4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).

- (5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Nicht veröffentlichter Bericht vom 15. Dezember 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 S.
- (6) OECD, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.
- (7) Sumpter und Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*;103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski, S, Sauer, A., Shears, J.A., Tyler, C.R., Braunbeck, T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (9) Andersen, L, Goto-Kazato, R., Trant, J.M., Nash, J.P., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E.A., Leino, R.L (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*;67(1):121-30.
- (11) Panter, G.H., Hutchinson, T.H., Hurd, K.S., Sherren, A., Stanley, R.D., Tyler, C.R. (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(1):11-21.
- (12) Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, G.A., Sullivan, C.V. (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) Panter, G.H., Tyler, C.R., Maddix, S., Campbell, P.M., Hutchinson, T.H., Länge, R., Lye, C., Sumpter, J.P., 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG-Forschungsbericht AQ001. CEFIC, Brüssel, Belgien.
- (14) Fenske, M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbeck, H., Andersen, L., Petersen, G.I., Korsgaard, B., Pedersen, K.L., Bjerregaard, P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose, J., Holbeck, H., Lindholm, C., Noerum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 2002. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 β -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531-539.
- (17) Brion, F., Nilsen, B.M., Eidem, J.K., Goksoyr, A., Porcher, J.M., Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; vol 21: 1699-1708.
- (18) Yokota, H., Morita, H., Nakano, N., Kang, I.J., Tadokoro, H., Oshima, Y., Honjo, T., Kobayashi, K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87-98.
- (19) Tatarazako, N., Koshio, M., Hori, H., Morita, M., und Iguchi, T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Kahl, M.D., Korte, J.J., Hornung, M.W., Henry T.R., Denny, J.S., Leino, R.L., Wilson, V.S., Cardon, M.C., Hartig, P.C., Gray, L.E. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.

- (21) Seki, M., Yokota, H., Matsubara, H., Maeda, M., Tadokoro, H., Kobayashi, K. (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23 (3):774-81.
 - (22) 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
 - (23) Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; S. 69-92.
 - (24) Hutchinson, T.H., Ankley, G.T., Segner, H., Tyler, C.R., 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as ‚signposts,‘ not ‚traffic lights,‘ in risk assessment. *Environmental Health Perspectives*;114 Suppl 1:106-14.
 - (25) Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P. 1999. Effects of waterborne exposure to 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.
 - (26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve und G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
 - (27) OECD (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD-Veröffentlichungen zu Gesundheit und Arbeitsschutz, Reihe ‚*Testing and Assessment*‘, Nr. 54, ENV/JM/MONO(2006)18
 - (28) OECD (2012) OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (geänd.). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22
-

*Anlage 1***Abkürzungen und Begriffsbestimmungen**

Chemikalie: Stoff oder Gemisch.

VK: Variationskoeffizient.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

Besatz: Verhältnis des Nassgewichts der Fische zum Wasservolumen.

Besatzdichte: Anzahl Fische je Wasservolumen.

VTG (Vitellogenin): Phospholipoglycoprotein-Vorläufer für Eidotterprotein, das in der Regel bei geschlechtlich aktiven weiblichen Tieren aller eierlegenden Arten vorkommt.

HPG-Achse: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse.

MTC: höchste noch verträgliche Konzentration, etwa 10 % des LC₅₀-Werts.

Prüfchemikalie: Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

Anlage 2

Versuchsbedingungen für den Fisch-Screening-Test zur Bestimmung endokriner Wirkungen

1. Empfohlene Arten	Dickkopfritze (<i>Pimephales promelas</i>)	Japanischer Reiskarpfling (<i>Oryzias latipes</i>)	Zebrabärbling (<i>Danio rerio</i>)
2. Testtyp	Durchflusssystem	Durchflusssystem	Durchflusssystem
3. Wassertemperatur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Beleuchtung	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)
5. Lichtintensität	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lx, oder 50-100 ft-c (Laborqualität)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lx, oder 50-100 ft-c (Laborqualität)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 000 lx, oder 50-100 ft-c (Laborqualität)
6. Photoperiode (Morgen-/Abenddämmerungsphasen optional; nicht unbedingt erforderlich)	16 Std. Licht, 8 Std. Dunkelheit	12-16 Std. Licht, 12-8 Std. Dunkelheit	12-16 Std. Licht, 12-8 Std. Dunkelheit
7. Besatz	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Größe der Prüfkammern	10 l (mind.)	2 l (mind.)	5 l (mind.)
9. Volumen der Testlösung	8 l (mind.)	1,5 l (mind.)	4 l (mind.)
10. Erneuerung der Testlösungen	Mindestens 6-mal täglich	Mindestens 5-mal täglich	Mindestens 5-mal täglich
11. Alter der Testorganismen	Siehe Nummer 20	Siehe Nummer 20	Siehe Nummer 20
12. Ungefähres Nassgewicht der adulten Fische (g)	Weibchen: 1,5 ± 20 % Männchen: 2,5 ± 20 %	Weibchen: 0,35 ± 20 % Männchen: 0,35 ± 20 %	Weibchen: 0,65 ± 20 % Männchen: 0,4 ± 20 %
13. Anzahl Fische pro Prüfgefäß	6 (2 Männchen, 4 Weibchen)	10 (5 Männchen, 5 Weibchen)	10 (5 Männchen, 5 Weibchen)
14. Anzahl der Behandlungen	= 3 (sowie entsprechende Kontrollen)	= 3 (sowie entsprechende Kontrollen)	= 3 (sowie entsprechende Kontrollen)
15. Anzahl Gefäße je Behandlung	Mindestens 4	Mindestens 2	Mindestens 2
16. Anzahl der Fische je Testkonzentration	16 adulte Weibchen und 8 Männchen (4 Weibchen und 2 Männchen pro Replikatgefäß)	10 adulte Weibchen und 10 Männchen (5 Weibchen und 5 Männchen pro Replikatgefäß)	10 adulte Weibchen und 10 Männchen (5 Weibchen und 5 Männchen pro Replikatgefäß)

17. Fütterungsregime	Lebende oder tiefgefrorene adulte Salinenkrebse oder Salinenkrebs-Nauplien zwei- bis dreimal täglich (<i>ad libitum</i>), handelsübliches Futter oder beides in Kombination	Salinenkrebs-Nauplien zwei- bis dreimal täglich (<i>ad libitum</i>), handelsübliches Futter oder beides in Kombination	Salinenkrebs-Nauplien zwei- bis dreimal täglich (<i>ad libitum</i>), handelsübliches Futter oder beides in Kombination
18. Belüftung	Keine, es sei denn, der Gehalt an gelöstem Sauerstoff fällt unter eine Luftsättigung von 60 %	Keine, es sei denn, der Gehalt an gelöstem Sauerstoff fällt unter eine Luftsättigung von 60 %	Keine, es sei denn, der Gehalt an gelöstem Sauerstoff fällt unter eine Luftsättigung von 60 %
19. Verdünnungswasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser oder entchlortes Leitungswasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser oder entchlortes Leitungswasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser oder entchlortes Leitungswasser
20. Dauer der Präexposition	möglichst 7 Tage	möglichst 7 Tage	möglichst 7 Tage
21. Expositionsdauer	21 Tage (d)	21 Tage (d)	21 Tage (d)
22. Biologische Endpunkte	Überleben Verhalten Sekundäre Geschlechtsmerkmale VTG	Überleben Verhalten Sekundäre Geschlechtsmerkmale VTG	Überleben Verhalten VTG
23. Validität des Tests	Gelöster Sauerstoff > 60 % Sättigung; mittlere Temperatur 25 ± 2 °C; 90 %ige Überlebensrate der Fische in den Kontrollen; gemessene Testkonzentrationen innerhalb von 20 % der mittleren Messwerte je Behandlungsstufe.	Gelöster Sauerstoff > 60 % Sättigung; mittlere Temperatur 24 ± 2 °C; 90 %ige Überlebensrate der Fische in den Kontrollen; gemessene Testkonzentrationen innerhalb von 20 % der mittleren Messwerte je Behandlungsstufe.	Gelöster Sauerstoff > 60 % Sättigung; mittlere Temperatur 26 ± 2 °C; 90 %ige Überlebensrate der Fische in den Kontrollen; gemessene Testkonzentrationen innerhalb von 20 % der mittleren Messwerte je Behandlungsstufe.

Anlage 3

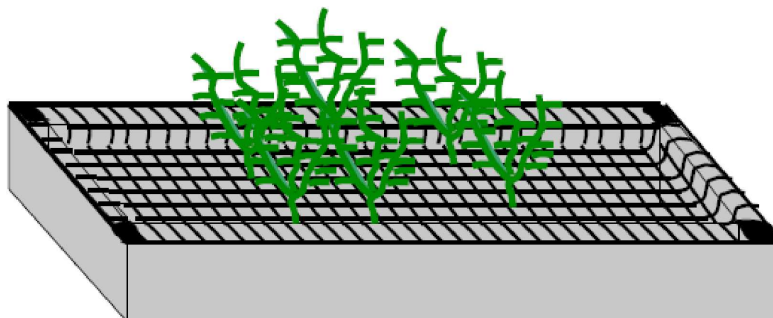
Chemische Merkmale eines geeigneten Verdünnungswassers

Bestandteil	Konzentrationen
Partikel	< 20 mg/l
Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffen	< 2 mg/l
Nichtionisiertes Ammonium	< 1 µg/l
Restchlor	< 10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	< 25 ng/l

Anlage 4A

Laichsubstrat für Zebrabärblinge

Laichschale: beliebige Instrumentenschale aus Glas, beispielsweise $22 \times 15 \times 5,5$ cm (L \times B \times T), abgedeckt mit abnehmbarem Maschendrahtgitter aus Edelstahl (Maschenweite 2 mm); das Gitter sollte die Schale unterhalb des Randes komplett abdecken.



Auf dem Gitter das Laichsubstrat fixieren. Dabei eine Struktur gewährleisten, in die sich die Fische zurückziehen können. Geeignet sind beispielsweise Aquarienpflanzen aus grünem Kunststoff. (Hinweis: eine mögliche Adsorption der Prüfchemikalie an das Kunststoffmaterial muss in diesem Fall berücksichtigt werden.) Das Kunststoffmaterial in einer ausreichenden Menge warmen Wassers waschen, um sicherzustellen, dass etwa vorhandene Chemikalien ausgetrieben werden und nicht in das Testwasser gelangen. Bei Verwendung von Materialien aus Glas ist sicherzustellen, dass die Fische weder verletzt noch bei heftigen Schwimmbewegungen eingeeignet werden.

Der Abstand zwischen der Schale und den Glasscheiben muss mindestens 3 cm betragen, damit die Laichablage nicht außerhalb der Schale erfolgt. Die in die Schale abgelegten Eier fallen durch das Gitter und können 45-60 Minuten nach Einschalten der Beleuchtung entnommen werden. Die transparenten Eier haften nicht aneinander an und können bei transversaler Beleuchtung leicht gezählt werden. Bei fünf Weibchen pro Gefäß gelten bis zu 20 Eier/Tag als wenig, bis zu 100 Eier/Tag als mittel und über 100 Eier/Tag als viel. Die Laichschale herausnehmen, die Eier einsammeln und die Laichschale wieder in das Prüfgefäß stellen — entweder so spät wie möglich am Abend oder sehr früh am Morgen. Bis zum erneuten Einstellen darf höchstens eine Stunde vergehen, da der vom Laichsubstrat ausgehende Reiz dazu führen kann, dass es zu ungewöhnlichen Zeitpunkten zu Paarung und Laichablage kommt. Wird die Laichschale dennoch später in die das Prüfbecken gestellt, so sollte dies frühestens 9 Stunden nach dem Einschalten der Beleuchtung geschehen. Zu diesem späten Tageszeitpunkt erfolgt keine Laichablage mehr.

*Anlage 4B***Laichsubstrat für Dickkopfelritzen**

Zwei oder drei kombinierte Platten und Schalen aus Kunststoff/Keramik/Glas oder Edelstahl als Laichunterlage in die Prüfkammern (z. B. 80 mm lange graue halbrunde Rinnen, aufgesetzte auf eine gebördelte, 130 mm lange Schale) stellen (siehe Abbildung). Gut akklimatisierte PVC- oder Keramikkacheln haben sich als Laichunterlage bewährt (Thorpe *et al.*, 2007).

Die Platten anrauhnen, um die Haftung zu verbessern. Wenn nicht erwiesen ist, dass die Eier zuverlässig an der Laichunterlage haften, die Schalen außerdem mit einem Gitter abdecken, damit die Fische nicht an herabgefallene Eier gelangen.



Die Unterlage soll alle Eier aufnehmen können, die nicht an der Plattenoberfläche haften bleiben und folglich auf den Boden des Beckens fallen (sowie alle Eier, die direkt auf der flache Kunststoffunterlage abgelegt werden). Alle Laichunterlagen sind vor Gebrauch mindestens 12 Stunden mit Verdünnungswasser zu spülen, um etwa vorhandene Schadstoffe auszutreiben.

LITERATUR

Thorpe, K.L., Benstead, R., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R., 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 81, 90–98.

Anlage 5A

Bewertung der sekundären Geschlechtsmerkmale bei Dickkopfelritzen zum Nachweis bestimmter Chemikalien mit endokriner Wirkung**Übersicht**

Für Tests zum Nachweis endokriner Disruptoren potenziell wichtige äußere Merkmale bei adulten Dickkopfelritzen sind die Körperfarbe (hell/dunkel), die Farbmusterung (Vorhandensein oder Nichtvorhandensein senkrechter Streifen), die Körperform (Kopf- und Rumpfform, abdominale Distension) sowie spezifische sekundäre Geschlechtsmerkmale (Zahl und Größe der Laichknoten (Nuptialtuberkel), Größe des dorsalen Nackenaufwuchses und des Ovipositors).

Laichausschlag (Nuptialtuberkel) tritt am Kopf (dorsaler Aufwuchs) paarungsbereiter männlicher Dickkopfelritzen auf, gewöhnlich beidseitig symmetrisch (Jensen et al. 2001). Bei weiblichen Kontrollfischen sowie juvenilen männlichen und weiblichen Fischen zeigen sich keine Tuberkel (Jensen et al. 2001). Um die Augen und zwischen den Nasenöffnungen männlicher Tiere können sich bis zu acht Tuberkel bilden. Die meisten und größten Tuberkel finden sich in zwei parallelen Reihen unmittelbar unter den Nasenöffnungen und über dem Maul. Bei vielen Fischen befinden sich Tuberkelgruppierungen auch unterhalb des Unterkiefers; die in unmittelbarer Nähe des Mauls befindlichen Tuberkel treten gewöhnlich als einzelnes Paar auf; ventral können sich Gruppen von bis zu vier Tuberkel entwickeln. In der Regel bilden sich selten mehr als 30 Tuberkel (typischerweise 18-28; Jensen et al. 2001). Zumeist entwickeln sich Nuptialtuberkel als einzelne, verhältnismäßig runde Ausstülpungen, deren Höhe in etwa ihrem Radius entspricht. Die meisten paarungsbereiten Männchen weisen zumindest auch einige Tuberkel auf, die derart groß und auffällig sind, dass sie als Einzelstrukturen kaum noch erkennbar sind.

Einige Arten endokrin wirkender Chemikalien können beim jeweils anderen Geschlecht zu anomalen sekundären Geschlechtsmerkmalen führen. So können Androgenrezeptor-Agonisten wie 17 β -Methyltestosteron oder 17 β -Trenbolon bewirken, dass sich bei weiblichen Dickkopfelritzen Nuptialtuberkel bilden (Smith 1974; Ankley et al. 2001; 2003), während Östrogenrezeptor-Agonisten bei männlichen Tieren zu einer Verringerung der Anzahl oder Größe der Tuberkel führen können (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

Laichausschlag bei Dickkopfelritzen wird nachstehend nach Verfahren charakterisiert, wie sie im Labor der US-amerikanischen Umweltschutzbehörde (*Environmental Protection Agency*) in Duluth, MN, üblich sind. Spezifische Produkte und/oder Geräte können durch verfügbare vergleichbare Materialien ersetzt werden.

Eine Sichtprüfung erfolgt am besten unter einem beleuchteten Vergrößerungsglas oder einem beleuchteten Stereomikroskop mit Dreifach-Vergrößerung. Die Fische dorsal mit der vorderen Körperhälfte nach vorne zeigend (d. h. Kopf zum Betrachter hin) untersuchen.

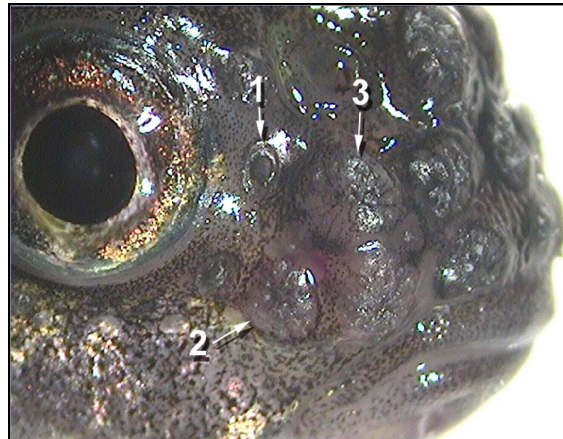
- a) Fisch mit vorderen Körperhälfte nach vorne zeigend und in Bauchlage in eine kleine Petrischale (z. B. 100 mm Durchmesser) legen. Sucher scharf einstellen, damit die Tuberkel erkennbar werden. Fisch vorsichtig und langsam von einer Seite auf die andere drehen, um die Areale mit Tuberkeln zu bestimmen. Tuberkel zählen und einstufen.
- b) Untersuchung an der ventralen Kopfseite wiederholen; dazu den Fisch mit der dorsalen vorderen Körperhälfte nach vorne zeigend in die Petrischale legen.
- c) Die Untersuchung sollte pro Fisch nicht länger als 2 Minuten dauern.

Zählen und Einstufen der Laichknoten (Nuptialtuberkel)

Zur Bewertung der Ausprägung des Laichausschlags bei adulten Dickkopfelritzen wurden sechs Areale identifiziert. Zur Darstellung der Region und der Zahl vorhandener Tuberkel wurde eine Vorlage (Formular) entwickelt (siehe Ende dieses Anhangs). Die Zahl der Tuberkel aufzeichnen, und die Tuberkel der Größe nach wie folgt einstufen: 0 — keine Tuberkel, 1 — präsent, 2 — vergrößert und 3 — ausgeprägt (Abb. 1).

Bewertung 0 bedeutet, dass keine Tuberkel vorhanden sind. Bewertung 1 — Tuberkel präsent — betrifft jeden Knoten, bei dem eine einzelne Ausstülpung in etwa dem Radius des Knotens (Halbmesser) entspricht. Bewertung 2 — vergrößerter Tuberkel — betrifft Knoten mit sternförmig ausgebildetem Gewebe, das sich in der Regel durch eine große Grundfläche mit von der Mitte ausgehenden Rillen oder Furchen auszeichnet. Nach oben sind die Tuberkel häufig stärker gezackt, können aber auch abgerundet sein. Bewertung 3 — ausgeprägter Laichausschlag — bedeutet in der Regel, dass das Areal verhältnismäßig groß und abgerundet und weniger strukturiert ist. Manchmal verschmelzen diese Tuberkel entlang einer oder mehrerer Regionen (B, C und D; s. u.). Farbe und Form sind ähnlich wie bei Bewertung 2, was manchmal die Unterscheidung erschwert. Eine Einstufung nach diesem System ergibt bei normalen männlichen Kontrollexemplaren mit 18-20 Tuberkeln einen Gesamtwert von < 50 Tuberkeln (Jensen et al. 2001).

Abbildung 1



Die tatsächliche Anzahl Tuberkel kann bei bestimmten Fischen größer sein als das Formularfeld (Anlage A) für das einzustufende Ausschlagareal zulässt. In diesem Fall können rechts oder links neben dem betreffenden Feld zusätzliche Einstufungen angegeben werden. Die Vorlage muss daher nicht unbedingt Symmetrie aufzeigen. Eine weitere Methode zur Veranschaulichung paarweise auftretender oder vertikal auf der horizontalen Ebene des Mauls verbundener Tuberkel besteht in der doppelten Markierung zweier Einstufungen innerhalb eines einzigen Feldes.

Darzustellende Tuberkelregionen:

A — Augenregion: Dorsal bis ventral um den vorderen Augenrand; in der Regel viele Tuberkel bei geschlechtsreifen männlichen Kontrollexemplaren; bei weiblichen Kontrollexemplaren nicht präsent; in der Regel paarweises Auftreten (jeweils ein Tuberkel in der Nähe des Auges) bzw. Einzelvorkommen bei androgen-exponierten weiblichen Tieren.

B — Nasenregion zwischen Nasengruben (Sensorkanalporen): bei männlichen Kontrollexemplaren in der Regel paarweises Auftreten in stärkerer Ausprägung (2 — vergrößert — oder 3 — stark ausgeprägt); bei weiblichen Kontrollexemplaren nicht präsent, jedoch vereinzelt Vorkommen bei androgen-exponierten weiblichen Tieren.

C — Nasenregion unmittelbar vor den Nasengruben, parallel zum Maul: In der Regel vergrößert oder stark ausgeprägt bei männlichen Kontrollexemplaren; bei weniger entwickelten männlichen Tieren oder androgen-exponierten weiblichen Tieren präsent oder vergrößert.

D — Maulregion (entlang der Maullinie): Bei männlichen Kontrollexemplaren in der Regel ausgeprägt; bei weiblichen Kontrollexemplaren nicht präsent; bei androgen-exponierten weiblichen Tieren können jedoch Tuberkel vorkommen.

E — Unterkieferregion (nahe am Maul): gewöhnlich klein und gepaart; bei männlichen Kontroll- oder exponierten Fischen unterschiedlich ausgeprägt.

F — Rumpffregion (ventral zu E): In der Regel klein und gepaart; bei männlichen Kontrollexemplaren und androgen-exponierten weiblichen Tieren präsent.

LITERATUR

- (1) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Korte, J.J., Makynen, M.E.. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Kahl, M.D., Korte, J.J., Hornung, M.W., Henry, T.R., Denny, J.S., Leino, R.L., Wilson, V.S., Cardon, M.C., Hartig, P.C., Gray, E.L. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17- β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries, J.E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C.A., Maddix, S., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen, K.M., Korte, J.J., Kahl, M.D., Pasha, M.S., Ankley, G.T.. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

- (5) Kahl, M.D., Jensen, K.M., Korte, J.J., Ankley, G.T. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.
- (6) Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith, R.J.F. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can J Zool* 52:1031-1038.

Vorlage — Einstufung des Laichausschlags (Nuptialtuberkel)**Einstufung**

ID _____

1 — präsent

Datum _____

2 — vergrößert

Gesamtbewertung _____

3 — ausgeprägt

	A	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	B	X1	X1	X1	X1
--	---	----	----	----	----

	C	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1
	D	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1	X1

	E	X1	X1	
	F	X1	X1	X1

Anlage 5B

Bewertung der sekundären Geschlechtsmerkmale bei Japanischen Reiskarpfingen zum Nachweis bestimmter Chemikalien mit endokriner Wirkung

Im Folgenden wird die Messung von Papillenprozessen (*) als sekundären Geschlechtsmerkmalen Japanischer Reiskarpfinge (*Oryzias latipes*) beschrieben.

(*) Zu Papillenprozessen kommt es in der Regel nur bei adulten männlichen Tieren; betroffen sind Flossenstrahlen ab dem zweiten bis zum siebten oder achten Strahl, gezählt ab dem hinteren Ende der Afterflosse (Abb. 1 und 2). Am ersten Flossenstrahl (gezählt ab dem hinteren Ende der Afterflosse) kommen die Papillenprozesse selten vor. Das nachstehend beschriebene Standardarbeitsverfahren (SOP) umfasst die Messung von Papillenprozessen am ersten Flossenstrahl (bei diesem SOP ab dem hinteren Ende der Afterflosse gezählt).

- (1) Nach Ausräumung der Leber (Anlage 6) den Fisch in ein konisches Rohr mit etwa 10 ml 10 %igem neutral gepuffertem Formalin legen (Kopf nach oben, Schwanz nach unten). Wenn die Gonaden in einer anderen Lösung als 10 %igem neutral gepuffertem Formalin fixiert werden, den Körper zwischen dem vorderen Bereich der Afterflosse und dem After mit einer Rasierklinge transversal durchtrennen, ohne die Genitalpapillen und die eigentlichen Gonaden zu beschädigen (Abb. 3). Den Fisch mit der kranialen Seite in die Fixierlösung legen, um die Gonaden zu konservieren; die Schwanzseite in die 10 %ige neutral gepufferte Formalinlösung legen (s. o.).
- (2) Nach Einlegen des Fisches in 10 %iges neutral gepuffertes Formalin den vorderen Bereich der Afterflosse mit einer Pinzette fassen und für etwa 30 Sekunden spreizen, um die Afterflosse offen zu halten. Beim Greifen mit einer Pinzette einige Flossenstrahlen im vorderen Bereich vorsichtig mitfassen, um Kratzer auf den Papillen zu vermeiden.
- (3) Nach dem Spreizen der Afterflosse für etwa 30 Sekunden den Fisch bis zur Messung der Papillenprozesse in 10 %igem neutral gepuffertem Formalin bei Raumtemperatur aufbewahren. (Die Messung frühestens nach 24-stündiger Fixierung vornehmen.)

Messung

- (1) Nach Fixieren des Fischkörpers in 10 %iger neutral gepuffertem Formalinlösung für mindestens 24 Stunden die Körper aus dem konischen Rohr nehmen; das Formalin mit Filterpapier (oder Papiertüchern) abtupfen.
- (2) Den Fisch mit der Bauchseite nach oben legen. Die Afterflosse mit einer kleinen Sezierschere vorsichtig abtrennen (vorzugsweise mit etwas Pterygiophorgewebe).
- (3) Den vorderen Teil der abgetrennten Afterflosse mit einer Pinzette aufnehmen und mit einigen Tropfen Wasser auf einem Glasträger fixieren. Die Afterflosse mit einem Deckglas abdecken. Beim Fassen mit der Pinzette darauf achten, dass die Papillen nicht zerkratzt werden.
- (4) Die verbundenen Flossenplatten mit Papillenprozessen mit Hilfe des Zählers unter einem Biomikroskop (aufrechtes oder Inversmikroskop) zählen. Papillenprozesse liegen vor, wenn am hinteren Rand der verbundenen Platte kleine Papillenbildungen zu erkennen sind. Die Zahl der verbundenen Platten mit Papillenprozessen für jeden einzelnen Flossenstrahl auf dem Arbeitsblatt vermerken (z. B. erster Flossenstrahl: 0, zweiter Flossenstrahl: 10, dritter Flossenstrahl: 12 usw.); die Summe dieser Zahlen, aufgeschlüsselt nach Fischen, in den Excel-Kalkulationsbogen eingetragen. Falls erforderlich, die Afterflosse fotografieren und die Zahl der verbundenen Flossenplatten mit Papillenprozessen auf dem Foto ermitteln.
- (5) Nach der Messung die Afterflosse zur Konservierung und Aufbewahrung in das unter Nummer 1 beschriebene konische Rohr legen.

Abb. 1:

Schaubild zur Veranschaulichung der an Form und Größe der Afterflosse erkennbaren Geschlechtsunterschiede; A — männlich; B — weiblich. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

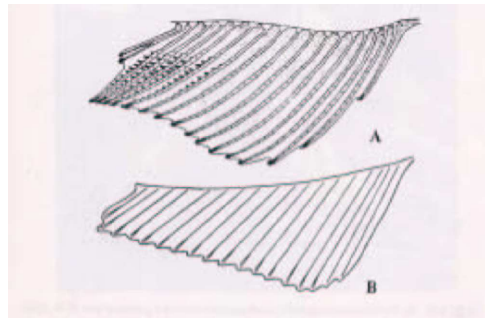


Abb. 2:

A — Prozesse auf verbundenen Afterflossenplatten. J.P., verbundene Platte; A.S., axialer Bereich; P., Prozess. B — Distales Ende des Flossenstrahls; Actinotrichien (Act.) an der Spitze; Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.

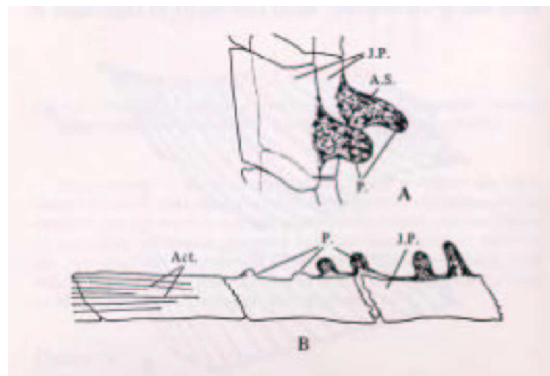
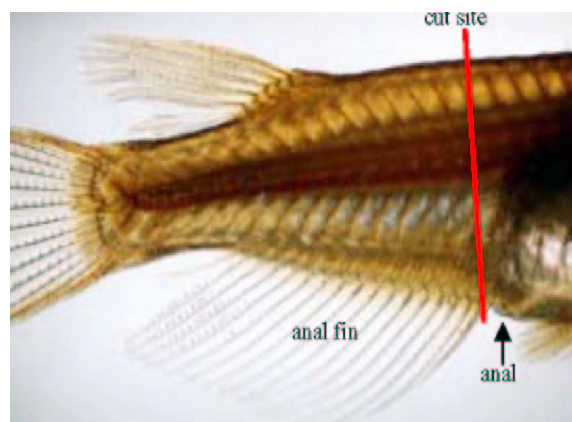


Abb. 3:

Foto eines Fischkörpers mit Schnittstelle bei Fixierung der Gonaden in einer anderen Fixierlösung als 10 % iges neutral gepuffertes Formalin; in diesem Fall wird der restliche Körper zwischen der vorderen Region der Afterflosse und dem After mit einer Rasierklinge (rote Linie) abgetrennt; die Kopfseite des Fisches wird in die Fixierlösung für Gonaden, die Schwanzseite in 10 %iges neutral gepuffertes Formalin gelegt.



Anlage 6

Empfohlene Verfahren für die Entnahme von Proben für die Vitellogenin-Analyse

Es ist darauf zu achten, dass es nicht zu Kreuzkontaminationen zwischen den VTG-Proben männlicher und weiblicher Tiere kommt.

Verfahren 1A: Dickkopfelritze, Blutentnahme aus der Schwanzvene/-arterie

Nach der Betäubung den Schwanzansatz mit einem Skalpell teilweise durchtrennen und mit einem heparinisierten Mikrohämatokrit-Kapillarröhrchen aus der Schwanzvene/-arterie Blut entnehmen. Nach der Blutentnahme das Plasma schnell durch 3-minütige Zentrifugierung mit 15 000 g (bzw. alternativ 10 min. mit 15 000 g bei einer Temperatur von 4 °C) isolieren. Soweit erwünscht, kann nach der Zentrifugierung der Hämatokritwert (in %) ermittelt werden. Anschließend das Plasma aus dem Mikrohämatokrit-Röhrchen entnehmen und in einem Zentrifugenröhrchen mit 0,13 Einheiten Aprotinin (einem Protease-Inhibitor) bei – 80 °C aufbewahren, bis die VTG-Konzentration bestimmt werden kann. Je nach (geschlechtsabhängiger) Größe der Dickkopfelritze können pro Fisch in der Regel 5-60 µl Plasma entnommen werden (Jensen *et al.* 2001).

Verfahren 1B: Dickkopfelritze, Blutentnahme aus dem Herzen

Alternativ kann Blut auch durch Herzpunktion mittels heparinisierte Spritze (1 000 Einheiten Heparin pro ml) entnommen werden. Das Blut anschließend in Eppendorf-Röhrchen (auf Eis) geben und zentrifugieren (5 min, 7 000 g, Raumtemperatur). Das Plasma in saubere Eppendorf-Röhrchen füllen (in Aliquoten, wenn das Plasmavolumen dies zulässt), umgehend auf – 80 °C einfrieren und bis zur Analyse aufbewahren (Panter *et al.*, 1998).

Verfahren 2A: Japanische Reiskarpfinge, Exzision der Leber

Entnahme der Prüffische aus dem Prüfbecken

- (1) Testfische mit dem kleinen Löffelsieb aus dem Prüfbecken nehmen. Dabei darauf achten, dass die Fische nicht in andere Becken fallen.
- (2) Die Fische grundsätzlich in nachstehender Reihenfolge entnehmen: Kontrolle, (gegebenenfalls) Lösungsmittelkontrolle, niedrigste Konzentration, mittlere Konzentration, höchste Konzentration. Außerdem aus einem Prüfbecken zunächst alle männlichen Tiere entnehmen, dann die weiblichen.
- (3) Anhand der äußerlichen (sekundären) Geschlechtsmerkmale (z. B. Form der Afterflosse) das Geschlecht der Fische bestimmen.
- (4) Die Prüffische in ein Transportbehältnis setzen und zur Exzision der Leber an einen Arbeitsplatz bringen. Die Beschriftung des Prüfbeckens und des Transportbehältnisses auf Genauigkeit überprüfen, um sicherzustellen, dass die Zahl der aus dem Prüfbecken entnommenen Fische mit der Zahl der noch darin verbliebenen Fische übereinstimmt.
- (5) Kann das Geschlecht anhand der äußerlichen Merkmale nicht bestimmt werden, alle Fische aus dem Prüfbecken entnehmen. In diesem Fall das Geschlecht durch Sichtprüfung der Gonaden oder der sekundären Geschlechtsmerkmale unter einem Stereomikroskop bestimmen.

Exzision der Leber

- (1) Die Prüffische aus dem Transportbehältnis nehmen und mit dem kleinen Löffelsieb in die Betäubungslösung setzen.
- (2) Nach dem Betäuben den Prüffisch mit einer (handelsüblichen) Pinzette auf Filterpapier (oder ein Papiertuch) legen. Dabei die Pinzette beidseitig am Kopf ansetzen, damit der Schwanz nicht bricht.
- (3) Die Oberfläche des Fisches mit Filterpapier (oder einem Papiertuch) trockentupfen.
- (4) Den Fisch mit der Bauchseite nach oben legen. Mit einer kleinen Sezierschere zwischen ventralem Halsbereich und Bauchmitte einen kleinen transversalen Einschnitt vornehmen.

- (5) Die Sezierschere in diesen kleinen Einschnitt einführen und den Bauch auf ein kaudal zum Kiemenbogen angesetzten Schnittlinie entlang der Bauchmittellinie bis hin zur kranialen Seite des Afters öffnen. Um Leber und Gonaden nicht zu beschädigen, die Sezierschere nicht zu tief einführen.
- (6) Unter dem Stereomikroskop folgende Schritte vornehmen:
- (7) Den Fisch mit der Bauchseite nach oben auf das Papiertuch (oder eine gläserne Petrischale oder einen Glasträger) legen.
- (8) Die Wände der Bauchhöhle mit Präzisionspinzetten spreizen und die inneren Organe freilegen. Falls erforderlich, kann dazu eine Seite der Bauchhöhle entfernt werden.
- (9) Den anhaftenden Teil der Leber und der Gallenblase mit einer weiteren Präzisionspinzette freilegen. Den Gallengang fassen und die Gallenblase abtrennen. Dabei darauf achten, dass letztere nicht beschädigt wird.
- (10) Die Speiseröhre fassen, und auf die gleiche Weise den Magen-Darm-Trakt von der Leber abtrennen. Darauf achten, dass kein Magen-Darm-Inhalt austritt. Den Magen-Darm-Trakt schwanzseitig vom After trennen und aus der Bauchhöhle nehmen.
- (11) Fett und sonstiges Gewebe um die Leber entfernen. Die Leber darf dabei nicht beschädigt werden.
- (12) Den Leberausgang mit der Präzisionspinzette fassen und die Leber aus der Bauchhöhle entnehmen.
- (13) Die Leber auf den Glasträger legen. Mit der Präzisionspinzette erforderlichenfalls Fett und sonstiges externes Gewebe (z. B. Bauchfell) von der Leberoberfläche entfernen.
- (14) Das Gewicht der Leber mit einem 1,5-ml-Mikroröhrchen (Leergewicht) und einer elektronischen Analysewaage bestimmen. Den Messwert in das Arbeitsblatt eintragen (auf 0,1 mg genau). Mit den Angaben auf dem Etikett des Mikroröhrchens abgleichen.
- (15) Das Mikroröhrchen mit der Leber verschließen und in ein Kühlgestell (oder ein Eis-Rack) setzen.
- (16) Nach Exzision einer Leber die Sezierinstrumente reinigen oder wechseln.
- (17) Die Lebern aller Fische im Transportbehältnis entnehmen, wie oben beschrieben.
- (18) Nach Exzision der Lebern aller Fische im Transportbehältnis (d. h. aller männlichen oder allen weiblichen Tieren in einem Prüfbecken) die Leberproben in ein etikettiertes Reagenzglasgestell setzen und in einen Gefrierschrank stellen. Sind die Lebern kurz nach der Exzision einer Vorbehandlung zu unterziehen, die Proben in einem Kühlgestell (oder Eis-Rack) zum nächsten Arbeitsplatz bringen.

Nach Exzision der Lebern steht der Fischkörper zur Messung der sekundären Geschlechtsmerkmale zu Verfügung.

Leberproben

Die von den Prüffischen entnommenen Leberproben bei ≤ -70 °C lagern, sofern sie nicht kurz nach der Exzision vorbehandelt werden sollen.

Abb. 1

Unmittelbar vor den Brustflossen einen Schereneinschnitt vornehmen.

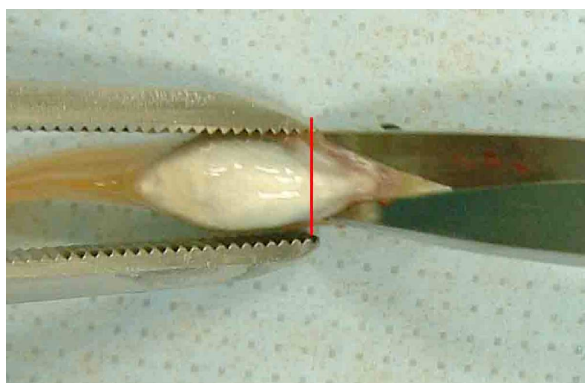


Abb. 2

Auf der Bauchmittellinie bis zu einem Punkt etwa 2 mm kranial vor dem After einen Scherenschnitt durchführen.

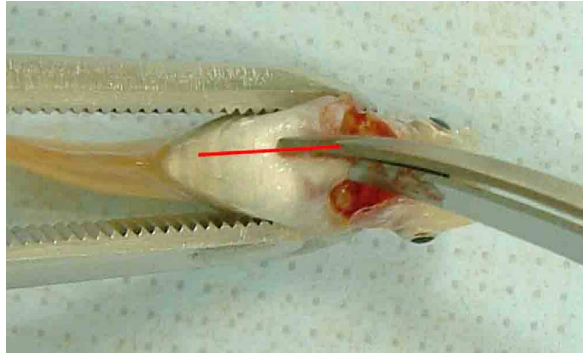


Abb. 3

Die Bauchwände mit einer Pinzette spreizen, um die Leber und die anderen inneren Organe freizulegen. (Alternativ können die Bauchwände seitlich festgesteckt werden.)

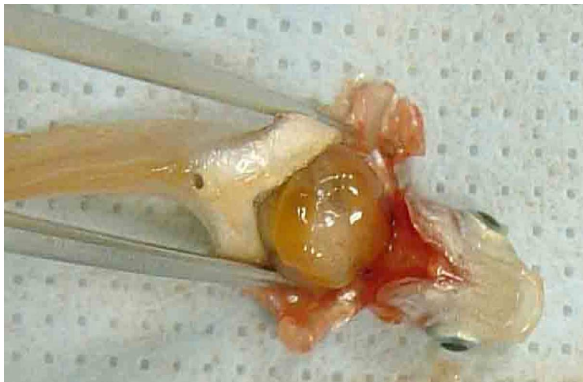


Abb. 4

Die Leber grob sezieren und mit einer Pinzette entnehmen.

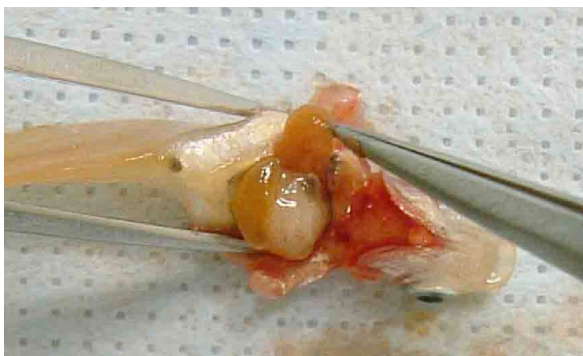


Abb. 5

Darm mit der Pinzette vorsichtig herausziehen.



Abb. 6

Beide Darmenden und etwaiges mesenteriales Gewebe mit einer Schere durchtrennen.



Abb. 7 (Weibchen)

Das Verfahren ist bei männlichen und weiblichen Fischen dasselbe.

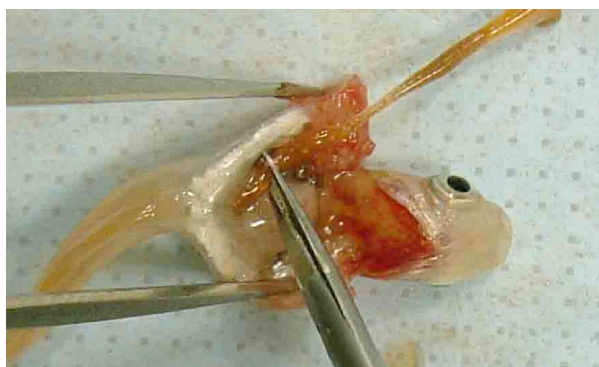


Abb. 8

Verfahren abgeschlossen.**Verfahren 2B: Japanische Reiskärpflinge (*Oryzias latipes*), Vorbehandlung der Leber für die Vitellogenin-Analyse:**

Die Flasche mit dem Homogenatpuffer aus dem ELISA-Kit nehmen und mit zerstoßenem Eis kühlen (Temperatur der Lösung: ≤ 4 °C). Wird Homogenatpuffer aus dem EnBio-ELISA verwendet, die Lösung zunächst bei Raumtemperatur auftauen und die Flasche anschließend auf zerstoßenem Eis kühlen.

Das Volumen des Homogenatpuffers für die Leber richtet sich nach dem Lebergewicht. (pro mg Leber je 50 μ l Homogenatpuffer.) Wiegt die Leber beispielsweise 4,5 mg, so beträgt das Volumen des Homogenatpuffers 225 μ l. Die Volumina der Homogenatpuffer für sämtliche Lebern in einer Liste erfassen.

Vorbereitung der Lebern zur Vorbehandlung

- (1) Das 1,5-ml-Mikroröhrchen mit der Leber erst unmittelbar vor der Vorbehandlung aus dem Gefrierschrank nehmen.
- (2) Um Vitellogenin-Kontaminationen zu vermeiden, die Lebern männlicher Fische vor den Lebern der weiblichen Fische vorbehandeln. Die Vorbehandlung der Testgruppen sollte zudem in der folgenden Reihenfolge ablaufen: Kontrolle, (gegebenenfalls) Lösungsmittelkontrolle, niedrigste Konzentration, mittlere Konzentration, höchste Konzentration.
- (3) Aus dem Gefrierschrank immer nur so viel 1,5-ml-Mikroröhrchen mit Leberproben entnehmen, wie auch gleichzeitig zentrifugiert werden können.
- (4) Die 1,5-ml-Mikroröhrchen mit den Leberproben in der Reihenfolge der Nummern der Proben aus dem Eis-Rack anordnen. (Die Lebern brauchen nicht aufgetaut zu werden.)

Vorbehandlung**1. Zugabe des Homogenatpuffers**

- (1) Nachdem anhand der Liste geprüft wurde, welches Volumen des Homogenatpuffers jeweils für ein Leberpräparat zu verwenden ist, die Mikropipette (Volumenbereich 100-1 000 μ l) auf das entsprechende Volumen einstellen. Eine saubere Spitze aufsetzen.
- (2) Homogenatpuffer aus der Reagenzflasche entnehmen und in die 1,5-ml-Mikroröhrchen mit Leber geben.
- (3) Homogenatpuffer allen leberhaltigen 1,5-ml-Mikroröhrchen wie oben beschrieben zugeben. Die Spitze der Mikropipette braucht nicht gewechselt zu werden. Ist die Spitze jedoch verunreinigt oder wird vermutet, dass sie verunreinigt ist, muss sie jedoch ausgewechselt werden.

2. Homogenisieren der Leber

- (1) Am Homogenisator ein neues Pistill befestigen.
- (2) Das Pistill in das 1,5-ml-Mikroröhrchen einführen. Dabei den Mikroröhrchen-Homogenisator so halten, dass die Leber zwischen Pistill-Oberfläche und innere Wand des 1,5-ml-Mikroröhrchens gedrückt wird.
- (3) Den Mikroröhrchen-Homogenisator für 15-20 Sekunden bedienen. Danach das 1,5-ml-Mikroröhrchen auf zerstoßenem Eis abkühlen.
- (4) Das Pistill aus dem 1,5-ml-Mikroröhrchen nehmen und die Probe etwa 10 Sekunden ruhen lassen. Anschließend eine Sichtprüfung des Suspensionszustands vornehmen.
- (5) Sind Leberstückchen in der Suspension zu erkennen, die Schritte (3) und (4) wiederholen, um ein zufriedenstellendes Leberhomogenat zu erhalten.
- (6) Das suspendierte Leberhomogenat bis zum Zentrifugieren auf dem Eis-Rack abkühlen.
- (7) Das Pistill bei jedem neuen Homogenat auswechseln.
- (8) Alle Lebern mit dem Homogenatpuffer homogenisieren, wie oben beschrieben.

3. Zentrifugen des suspendierten Leberhomogenats

- (1) Sicherstellen, dass die gekühlte Zentrifugierkammer eine Temperatur von $\leq 5\text{ °C}$ aufweist.
- (2) Die 1,5-ml-Mikroröhrchen mit dem suspendierten Leberhomogenat in die gekühlte Zentrifuge stellen (erforderlichenfalls nach einer Ausbalancierung).
- (3) Das suspendierte Leberhomogenat für 10 Minuten bei einer Temperatur von $\leq 5\text{ °C}$ mit 13 000 g zentrifugieren. Wird der Überstand in geeigneter Weise abgetrennt, können Zentrifugalkraft und Zeitdauer jedoch nach Bedarf eingestellt werden.
- (4) Nach der Zentrifugierung kontrollieren, ob der Überstand angemessen abgetrennt wurde (Oberfläche: lipid; Zwischenschicht: Überstand, untere Schicht: Lebergewebe). Bei unangemessener Trennung die Suspension unter denselben Bedingungen erneut zentrifugieren.
- (5) Alle Proben aus der gekühlten Zentrifuge nehmen und in der Reihenfolge der Nummern der Proben auf dem Eis-Rack anordnen. Dabei darauf achten, dass die getrennten Schichten nach dem Zentrifugen nicht resuspendieren.

4. Entnahme des Überstands

- (1) Vier 0,5-ml-Mikroröhrchen zur Entnahme des Überstands in das Reagenzglasgestell setzen.
- (2) Jeweils 30 μl Überstand (als Zwischenschicht abgetrennt) mit der Mikropipette entnehmen und in eines der 0,5-ml-Mikroröhrchen geben. Dabei darauf achten, dass kein Lipidmaterial (Oberfläche) oder Lebergewebe (untere Schicht) aufgenommen werden.
- (3) Den Überstand entnehmen und wie oben beschrieben in zwei weitere 0,5-ml-Mikroröhrchen dispensieren.
- (4) Übrigen Überstand mit der Mikropipette entnehmen (möglichst $\geq 100\text{ }\mu\text{l}$) und in das verbleibende 0,5-ml-Mikroröhrchen geben. Dabei darauf achten, dass kein Lipidmaterial (Oberfläche) oder Lebergewebe (untere Schicht) aufgenommen wird.
- (5) Das 0,5-ml-Mikroröhrchen verschließen und auf dem Etikett das Volumen des Überstands notieren. Danach die Mikroröhrchen sofort auf dem Eis-Rack kühlen.
- (6) Für jeden Überstand die Spitze der Mikropipette wechseln. Haftet sehr viel Lipidmaterial an der Spitze an, die Spitze umgehend auswechseln, um den das Leberextrakt nicht mit Fett zu kontaminieren.

- (7) Den gesamten zentrifugierten Überstand wie oben beschrieben in vier 0,5-ml-Mikroröhrchen geben.
- (8) Danach alle etikettierten Mikroröhrchen in das Reagenzglasgestell setzen und im Gefrierfach einfrieren. Werden die VTG-Konzentrationen unmittelbar nach der Vorbehandlung gemessen, ein 0,5-ml-Mikroröhrchen (mit 30 µl des Überstands) im Reagenzglasgestell abkühlen und an den Arbeitsplatz bringen, an dem der ELISA durchgeführt werden soll. In diesem Fall die übrigen Mikroröhrchen in die Reagenzglasgestelle setzen und im Gefrierschrank einfrieren.
- (9) Nach Entnahme des Überstands den verbleibenden Rückstand angemessen entsorgen.

Lagerung der Probe

Die 0,5-ml-Mikroröhrchen mit dem Überstand des Leberhomogenats bis zur Durchführung des ELISA bei $\leq -70\text{ °C}$ lagern.

Verfahren 3A: Zebrabärblinge, Blutentnahme aus der Schwanzvene/-arterie

Unmittelbar nach der Betäubung den Schwanzansatz mit einem Skalpell teilweise durchtrennen und mit einem heparinisierten Mikrohämatokrit-Kapillarröhrchen aus der Schwanzvene/-arterie Blut entnehmen. Die Blutvolumen betragen je nach Größe der Fische 5 bis 15 µl. In das Mikrokapillarrohr die gleiche Menge Aprotinipuffer (6 µg/ml in PBS) geben, und das Plasma durch Zentrifugieren (5 Minuten bei 600 g) vom Blut trennen. Das Plasma in den Teströhrchen auffangen und bis zur Bestimmung der Vitellogenin-Konzentration oder anderer relevanter Proteine bei -20 °C lagern.

Verfahren 3B: Zebrabärblinge, Blutentnahme durch Herzpunktion

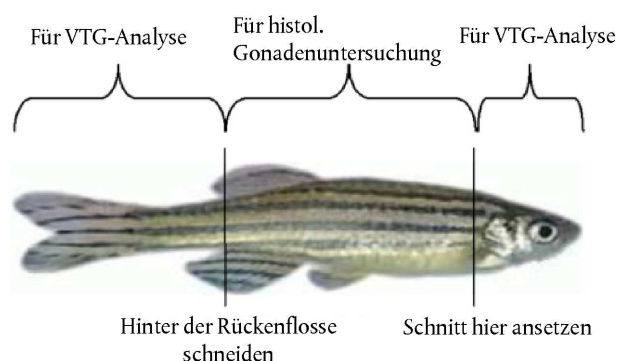
Um eine Koagulierung des Bluts und einen Proteinabbau zu vermeiden, die Proben mit heparinisierten (1 000 Einheiten/ml) phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und dem Proteasehemmer Aprotinin (2 TIU/ml) entnehmen. Als Pufferbestandteile werden Heparin- ammoniumsalz und lyophilisiertes Aprotinin, für die Blutentnahme Spritzen (1 ml) mit fixierter dünner Nadel (z. B. Braun Omnikan-F) empfohlen. Die Spritze muss mit der Pufferlösung vorgefüllt sein (ca. 100 µl), damit die geringen Blutvolumina der einzelnen Fische vollständig eluiert werden können. Die Blutproben durch Herzpunktion entnehmen. Dazu die Fische zunächst mit MS-222 (100 mg/l) betäuben. Bei angemessener Betäubung ist der Herzschlag der Zebrabärblinge wahrnehmbar. Beim Punktieren des Herzens den Spritzenkolben unter leichter Spannung halten. Die zu entnehmendem Blutvolumina liegen zwischen 20 und 40 µl. Nach der Herzpunktion das Blut-/Puffer-Gemisch in die Teströhrchen geben. Das Plasma durch Zentrifugieren (20 min mit 5 000 g) vom Blut trennen und bis zur Analyse bei -80 °C lagern.

Verfahren 3C: Standardarbeitsverfahren (SOP): Zebrabärblinge, Homogenisierung von Kopf- und Schwanzgewebe

- (1) Die Fische betäuben und töten, wie für den Test beschrieben.
- (2) Kopf und Schwanz der Fische abtrennen, siehe Abbildung 1.

Wichtig: Alle Sezierungsinstrumente und das Sezierbrett sind nach jedem Fisch abzusputzen und ordnungsgemäß zu reinigen (z. B. mit 96 %igem Ethanol), um VTG-Kontaminationen nicht induzierter Männchen durch weibliche Fische oder induzierte Männchen zu vermeiden.

Abbildung 1



- (3) Das Gewicht der gepoolten Kopf- und Schwanzteile auf 1 mg genau abmessen.
- (4) Nach dem Wiegen die Teile in geeignete Röhrchen (z. B. 1,5 ml Eppendorf) geben und bei -80 °C bis zur Homogenisierung einfrieren oder unmittelbar mit zwei Kunststoff-Pistillen auf Eis homogenisieren. (Alternativ können auch andere Methoden angewendet werden, sofern sie auf Eis durchgeführt werden und eine homogene Masse entsteht.) Wichtiger Hinweis: Die Röhrchen sind ordnungsgemäß zu nummerieren, damit die Kopf- und Schwanzteile für die histologische Gonadenuntersuchung dem jeweiligen Rumpf zugeordnet werden können.
- (5) Nach Herstellung einer homogenen Masse das Vierfache des Gewebegewichts des eisgekühlten Homogenisierungspuffers (*) hinzugeben. Mit den Pistillen weiterarbeiten, bis eine homogene Mischung entsteht. Wichtiger Hinweis: Für jeden Fisch ist ein frisches Pistill zu verwenden.
- (6) Die Proben bis zur Zentrifugierung (4 °C , 50 000 g, 30 Minuten) auf Eis legen.
- (7) Mit einer Pipette 20 μl -Portionen des Überstands in mindestens zwei Röhrchen geben; dabei die Spitze der Pipette durch die oberflächige Fettschicht führen und den Überstand vorsichtig ansaugen, ohne jedoch Fett- oder Pelletfraktionen mitaufzunehmen.
- (8) Die Röhrchen bis zur Verwendung bei -80 °C lagern.

(*) Homogenisierungspuffer:

- (50 mm Tris-HCl pH 7,4; Proteasehemmer-Cocktail (1 %) (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 μl Proteasehemmer-Cocktail.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) z. B. Bie & Berntsen, Dänemark.
- Proteasehemmer-Cocktail: Sigma (Säugetiergewebe) Produktnummer P 8340.
- *Hinweis:* Der Homogenisierungspuffer ist am Tag der Herstellung zu verbrauchen. Während der Verwendung muss die Pufferlösung auf Eis liegen.

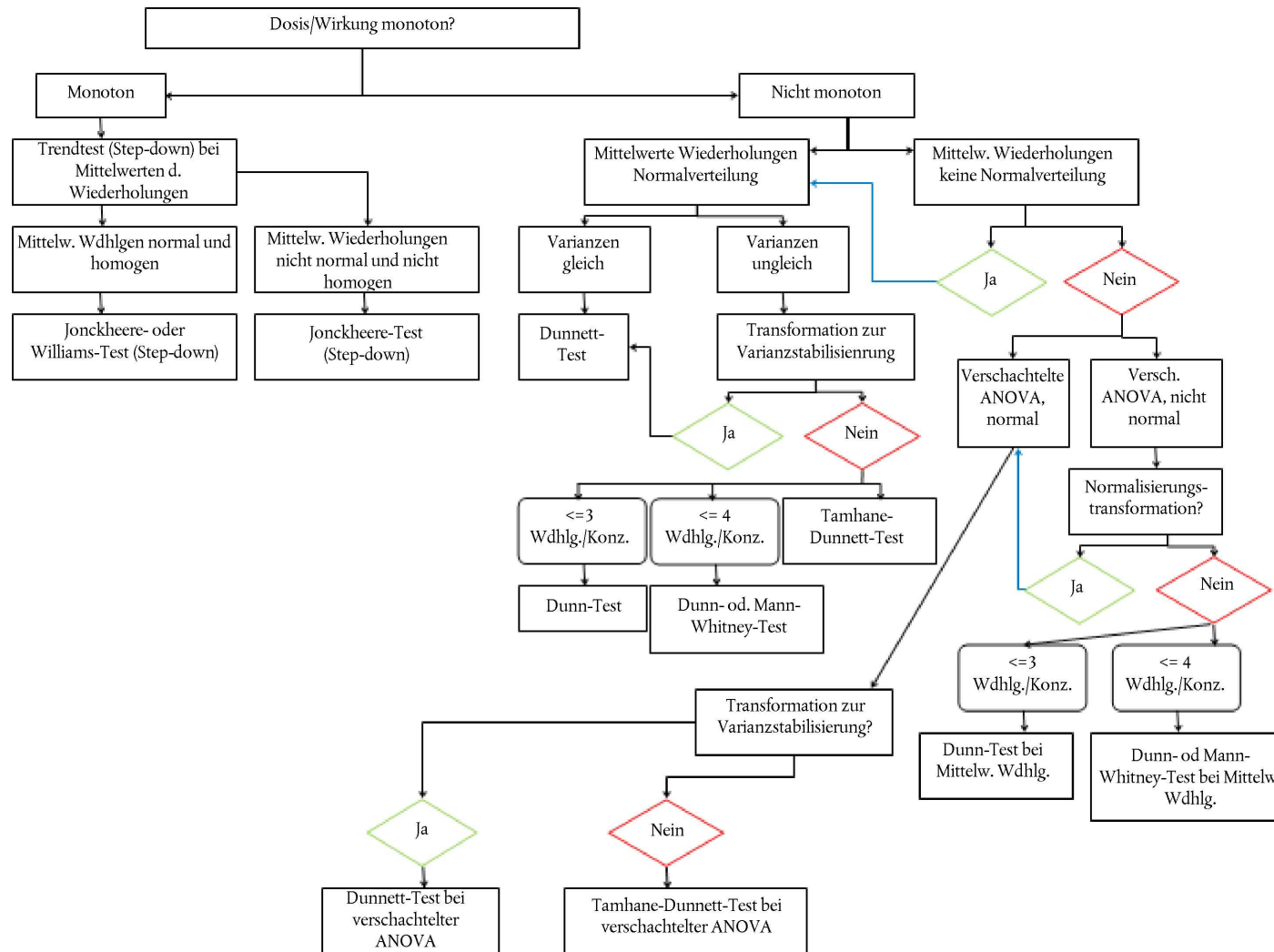
*Anlage 7***Vitellogenin-angereicherte Proben und Inter-Assay-Referenzstandard**

An jedem Tag, an dem Vitellogenin-Bestimmungen vorgenommen werden, ist eine nach einem Inter-Assay-Referenzstandard hergestellte Anreicherungsprobe zu analysieren. Das für den Inter-Assay-Referenzstandard verwendete Vitellogenin muss aus einer anderen Charge als das Vitellogenin stammen, das zur Herstellung der Kalibrierstandards für den durchzuführenden Assay verwendet wurde.

Die Anreicherungsprobe wird hergestellt, indem eine bekannte Menge des Inter-Assay-Standards einer Plasmaprobe männlicher Kontrollfische zugegeben wird. Die Probe anreichern, bis eine Vitellogenin-Konzentration erreicht wird, die 10- bis 100-mal höher ist als die bei männlichen Kontrollfischen erwartete VTG-Konzentration. Die so angereicherte Probe kann von einem einzelnen Fisch oder von mehreren Fischen stammen.

In mindestens zwei Mulden eine Teilprobe nicht angereicherten Plasmas männlicher Kontrolltiere analysieren. Die angereicherte Probe auch in mindestens zwei Duplikatmulden analysieren. Die mittlere VTG-Menge in den beiden nicht angereicherten Plasmaproben männlicher Kontrollfische der berechneten Vitellogenin-Menge hinzurechnen, die zur Anreicherung der Proben zugegeben wurde, um die erwartete Konzentration zu bestimmen. Das Verhältnis dieser erwarteten zur gemessenen Konzentration zusammen mit den Ergebnissen der an dem betreffenden Tag durchgeführten Assays protokollieren.

Flussdiagramm als Entscheidungshilfe für die statistischen Analyse



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 eine Prüfung zum Nachweis von auf das Schilddrüsensystem von Vertebraten wirkenden Chemikalien entwickelt und validiert werden. 1998 hat die OECD eine prioritäre 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 zum einen die Überarbeitung der Studie zur Toxizität bei Nagetieren nach wiederholter 28-tägiger oraler Gabe (Kapitel B.7 in diesem Anhang) und zum anderen die Entwicklung des Amphibien-Metamorphose-Assays (AMA). Die überarbeitete Prüfmethode B.7 wurde einer Validierung unterzogen und anschließend 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 stellt ein generalisiertes Vertebratenmodell dar, 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 thyroideale Aktivität in einem Tier während der Metamorphose nachgewiesen werden kann.
3. Das allgemeine Prüfprotokoll sieht die Exposition von Krallenfrosch-Larven (*Xenopus laevis*) des Stadiums 51 durch mindestens drei verschiedene Konzentrationen einer Prüfchemikalie und eine Verdünnungswasserkontrolle über einen Zeitraum von 21 Tagen vor. Für jede Prüfkonzentration werden vier Replikate verwendet. Zu Beginn des Tests werden bei allen Behandlungsgruppen 20 Larven pro Prüfbecken 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

Prüfspezies

4. Der Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) wird weltweit 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 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 × 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 (10-5 000 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 Exposition geeignet. Kommt bei einer Chemikalie keine dieser beiden Möglichkeiten in Betracht, kann die Chemikalie mit diesem Protokoll nicht geprüft werden.

Expositionssystem

7. Vorzugsweise ist ein Durchflusssystem zu verwenden. Wenn die physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften einer Prüfchemikalie die Verwendung eines Durchflusssystems nicht zulassen, kann ein alternatives Expositionssystem (z. B. ein System mit statischer Exposition) 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 alternativ 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 600-2 000 lx (Lumen/m²) auf der Wasseroberfläche eingestellt. 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 Prüfkonzentrationen muss > 3,5 mg/l betragen (> 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 Krallenfrosch-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 Krallenfröschen verfügbar sind. Besonders ist darauf zu achten, dass das Wasser frei von Kupfer, Chlor und Chloraminen ist; da diese Chemikalien für Frösche und Kaulquappen giftig sind. 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 Konzentrationen das Ergebnis der Studie beeinflussen können. Die Analysen sind vor Beginn der Tests vorzunehmen. Im für den Test vorgesehenen Wasser sollten die genannten Anionen nicht enthalten sein.

Jodkonzentration des Testwassers

9. Damit die Schilddrüse Hormone synthetisieren kann, muss für die Larven im Wasser und im Futter ausreichend 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 minimalste 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.

Hälterung der Tiere

Hälterung der adulten Tiere und Zucht

10. Die Hälterung der adulten Tiere und die Zucht erfolgen entsprechend den Standardleitlinien. Weitere Informationen sind der Standardanleitung zur Durchführung des Froschembryo-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-1 000 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 Zwischenboden 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 1 500) 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 gemessene 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 (Futtermitteltyp, 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 sollten 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 der Handhabung 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 mit handelsüblichem Larvenfutter (z.B. Sera Micron®) versorgt (siehe 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. Die tägliche Futtermenge ist 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 Futtermenge 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 (z.B. Sera Micron®) 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 die Stabilität der Prüfchemikalie ermittelt werden. Dazu sind die verfügbaren Informationen über die Löslichkeit, die Abbaubarkeit und die Flüchtigkeit zu verwenden. 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 Prüfkonzentrationen 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 Prüfsystem 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 Prüfsystem 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 Lösungsmittel 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 Lösungsmittel 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 zwar Untersuchungen durchgeführt; dieser Expositionspfad ist allgemein aber nicht üblich. Die ausgewählte Methode ist zu dokumentieren und analytisch zu verifizieren.

Auswahl der Prüfkonzentrationen

Bestimmung der höchsten Prüfkonzentration

16. Bei diesem Test sollte die höchste Konzentration der Löslichkeitsgrenze der Prüfchemikalie, — bei akut toxischen Chemikalien — der höchsten noch verträglichen Konzentration (*Maximum Tolerated Concentration* = MTC) oder 100 mg/l entsprechen; maßgeblich ist die jeweils niedrigste Konzentration.
17. Als MTC wird die höchste Prüfkonzentration 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 Prüfkonzentration (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.

Prüfkonzentrationsbereich

20. Es werden *mindestens* drei Prüfkonzentrationen und eine Kontrolle mit sauberem Wasser (sowie erforderlichenfalls eine Kontrolle mit Lösungsmittel) benötigt. Die höchste und die niedrigste Prüfkonzentration 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 der Prüfung

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

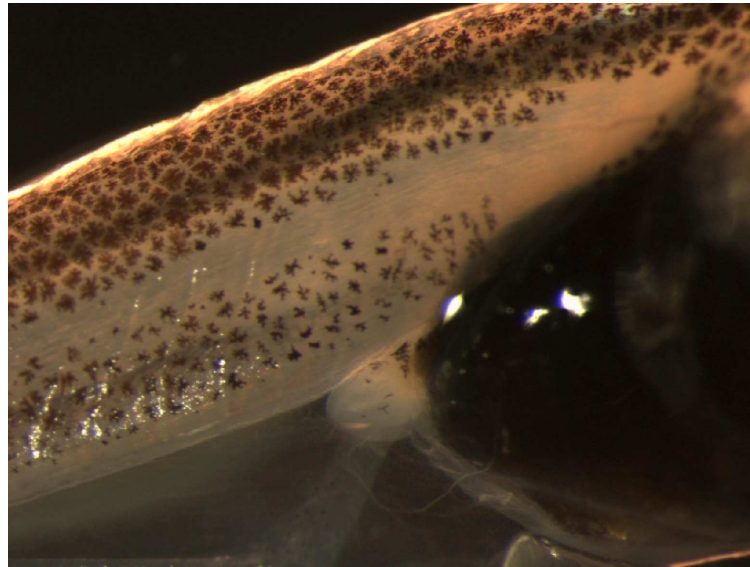
Auffällige morphologische Merkmale von Entwicklungsstadien nach der Beschreibung von Nieuwkoop und Faber

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 Geruchs-nervs											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 der Prüfung 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 Prüfbecken fünf zufällig ausgewählte Larven pro Replikentnommen. 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 der Prüfung)

28. Am Ende der Prüfung (an Tag 21) werden die übrigen Larven aus den Prüfbecken 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 follikulären 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 Prüfkonzentrationen 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		•	•
— Länge der Hinterbeine		•	•
— Kopf-Rumpf-Länge		•	•
— Feuchtmasse der Larven		•	•
— Histologische Untersuchung der Schilddrüse			•

Apikale 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 zu entnehmen, auf die in der Anlage verwiesen wird. Diese enthalten auch Informationen zur computergestützten Analyse. Die Berücksichtigung dieser Leitfäden ist zu empfehlen.

Entwicklungsstadium

35. Das Entwicklungsstadium der *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 Prüfkonzentrationen 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

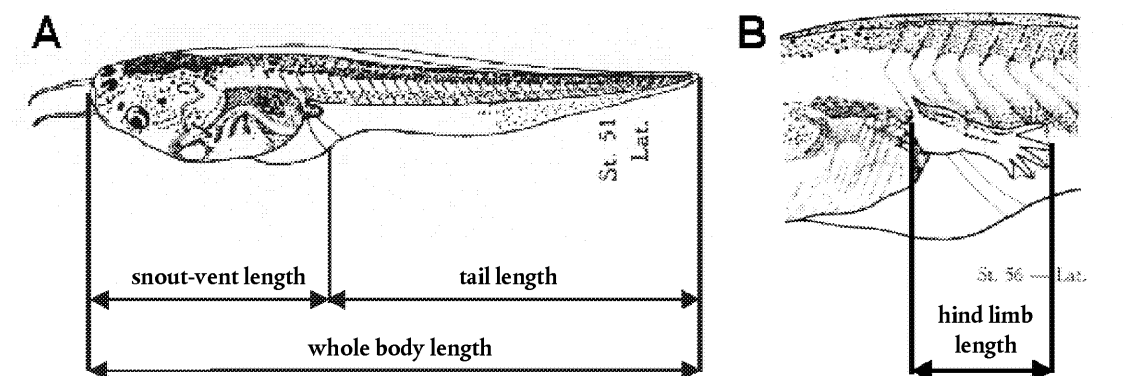
36. Die Differenzierung und das Wachstum der Hinterbeine werden durch Schilddrüsenhormone gesteuert und sind wesentliche Merkmale, die bereits für die Bestimmung des Entwicklungsstadiums herangezogen werden. Die Entwicklung der Hinterbeine wird bei der Bestimmung des Entwicklungsstadiums als qualitativer 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 Prüfbecken 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 diese 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 (andere als Wasser): 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 Prüfsystems 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 ausführlich 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 ausführliche Beschreibungen sowie Angaben zur Ausprägung und zur Häufigkeit bestimmter Beobachtungen, wie im Leitliniendokument zu histopathologischen Untersuchungen erläutert;
- spontane Bemerkungen: Ausführliche Beschreibungen von Beobachtungen während 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 ≤ 20 % VK (Variabilität der gemessenen Prüfkonzentration)
Mortalität in Kontrollen	≤ 10 % — In den Kontrollen darf die Mortalität zwei Larven pro Replikat nicht übersteigen.
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	≥ 40 % Luftsättigung (*)

Kriterium	Annehmbare Grenzwerte
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 ± 1 °C — Die einzelnen Replikate/Konzentrationen dürfen sich höchstens um 0,5 °C unterscheiden.
Prüfkonzentrationen 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 für statische Prüfsysteme	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 Larvenfutter (z.B. Sera Micron ®))

(*) 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 valider 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 valider Test ergibt hinsichtlich der Aktivität der Schilddrüse einen positiven Befund:

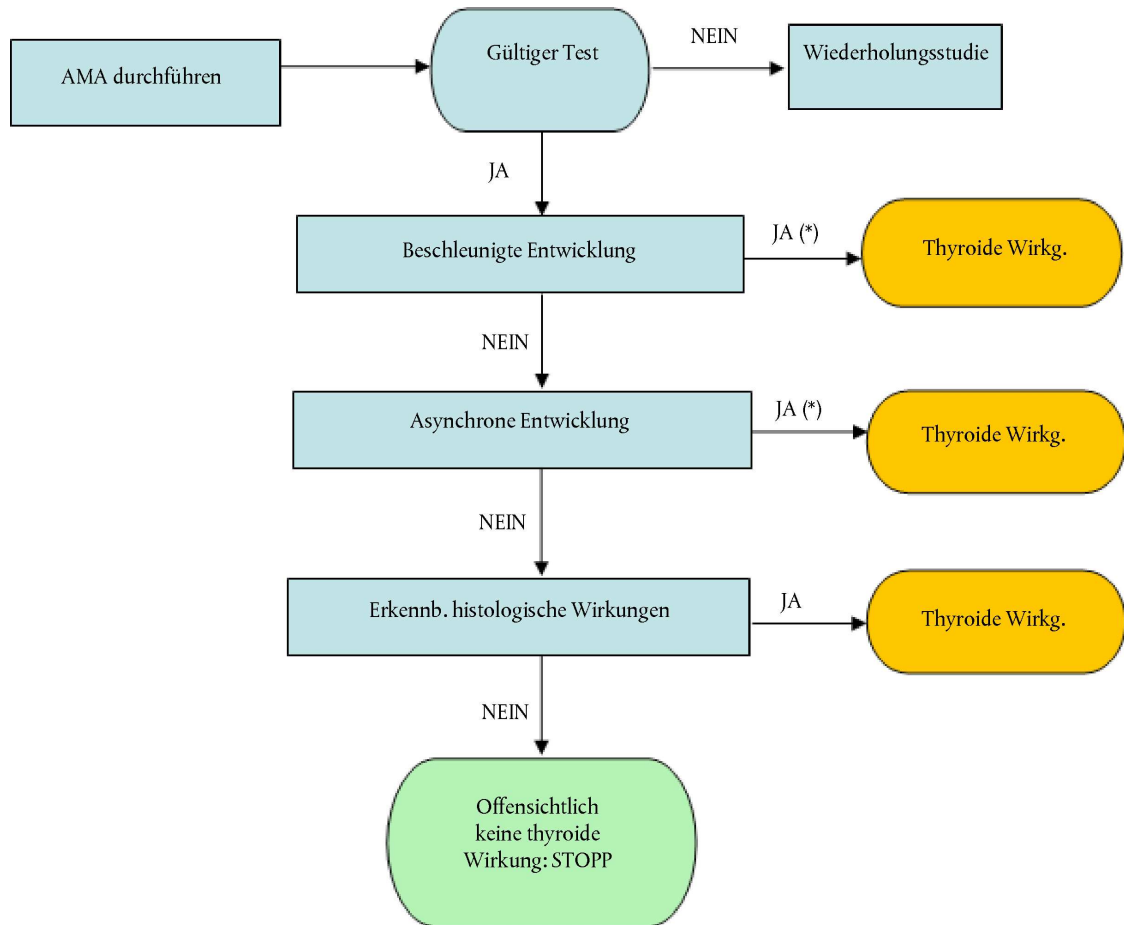
- (4) In der Kontrollgruppe muss sich die Mortalität auf zwei Larven/Replikate beschränken.

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 potentiell durch die Toxizität des Prüfstoffs beeinträchtigt werden könnten, weniger schwer gewichtet werden.

Abbildung 3

Entscheidungslogik des Amphibien-Metamorphose-Assays



(*) 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 Effekten bekannt, die von Schilddrüsenhormonen verursacht werden. Sie kann bei peripheren Geweben auf eine unmittelbare Wechselwirkung mit dem Schilddrüsenhormonrezeptor (z. B. mit T4) oder auf Effekte 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 die Chemikalie auf die Schilddrüse wirkt. 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 oder Veränderung der Länge der Hinterbeine 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. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass signifikante Wirkungen auf das Entwicklungsstadium zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht durch signifikante Wirkungen auf das Entwicklungsstadium zu anderen Zeitpunkten oder durch signifikante Wirkungen auf die Hinterbeinlänge zum betreffenden Zeitpunkt bestätigt werden müssen. 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 Störung des relativen Zeitpunkts der Morphogenese oder der 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 thyroideale Aktivität. 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 Gewebeumbaus 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 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 Leitfaden (9) bewertet. Eine verzögerte Entwicklung ohne feststellbare toxische Wirkung ist ein starker Indikator für eine anti-thyroidale Wirkung; 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. Effekte auf die Histologie der Schilddrüse wurden auch ohne begleitende Effekte auf die Entwicklung nachgewiesen. Wenn in histopathologischen Untersuchungen der Schilddrüse Veränderungen festgestellt werden, ist davon auszugehen, dass die betreffende Chemikalie eine thyroide Wirkung hat. 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 anti-thyroidale 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

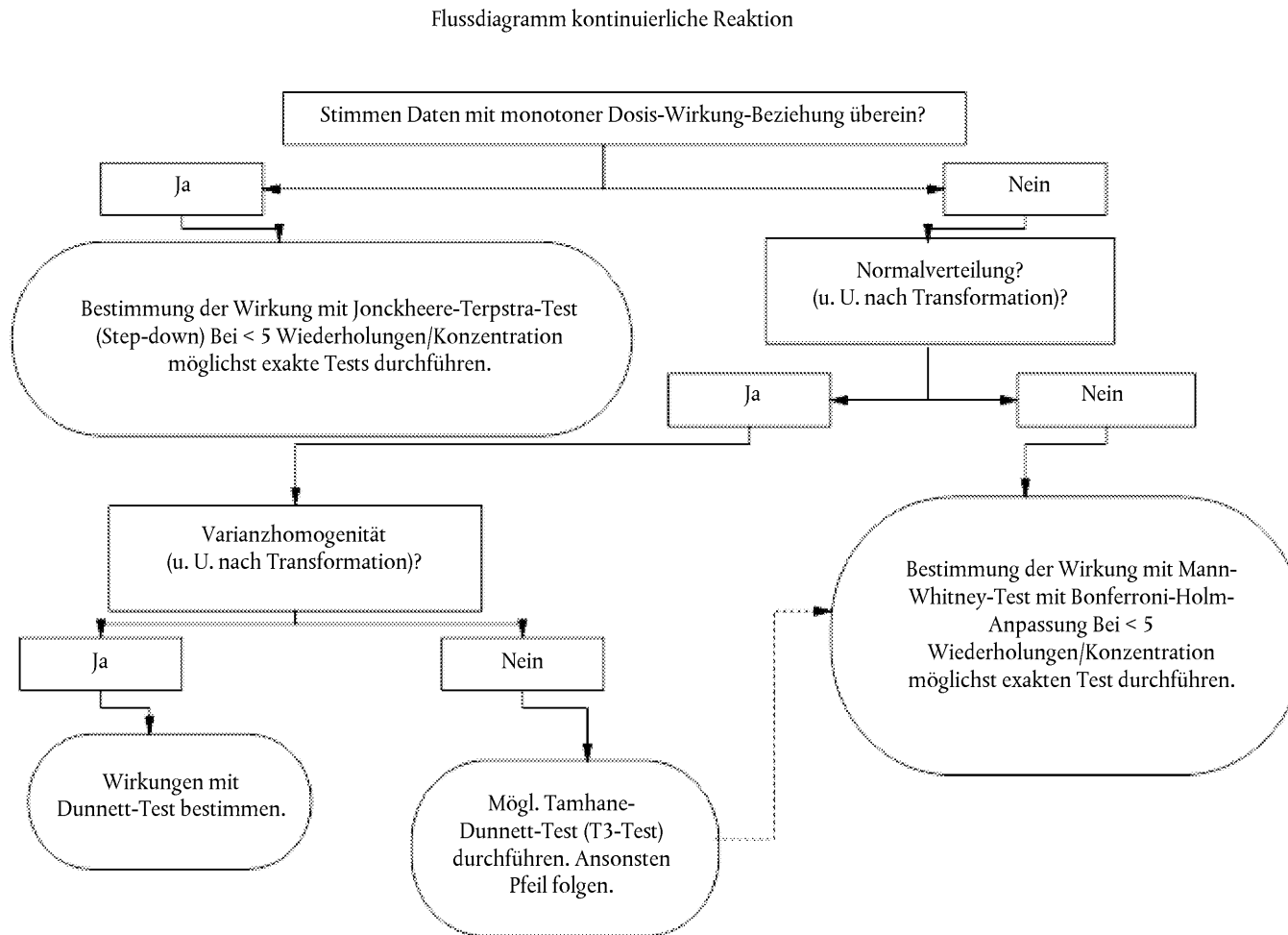
wirkenden Toxizität ist ein wesentlicher Bestandteil des Tests, der dazu dienen soll, die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse zu reduzieren. Übermäßige Mortalität ist ein offensichtliches Anzeichen für anderweitige toxische Mechanismen. Auch geringe Wachstumsbeeinträchtigungen, die z. B. aufgrund 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 Prüfkonzentrationen 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 kann auch fachliches Ermessen angewendet 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. Auch wenn 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. Perzentil 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 Prüfkonzentrationen nach Augenschein oder durch förmliche Tests (s. o.) festgestellt werden (11). Wenn weniger als fünf Replikate pro Prüfkonzentration 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.

Flussdiagramm statistischer Verfahren für kontinuierliche Daten zur Dosis-Wirkung-Beziehung



Besondere Erwägungen zur Datenanalyse

Behandlung von Konzentrationen mit offensichtlich toxischer Wirkung

69. Um festzustellen, ob ein Replikat oder eine Prüfkonzentration 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 sauberem 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 Nominalkonzentration 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	dechloriniertes Leitungswasser (mit Aktivkohle gefiltert) oder entsprechendes Laborwasser	
Besatzdichte	20 Larven / Prüfbecken (5 / l)	
Testlösung / Prüfbecken	4-10 l (mindestens 10-15 cm Wassertiefe) / Glas- oder Edelstahlbecken (z. B. 22,5 cm × 14 cm × 16,5 cm)	
Replikation	4 Replikatprüfbecken / Prüfkonzentration 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	600-2 000 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

Berichtstabellen 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	Kopfrumpflänge (mm)	Hinterbeinlänge (mm)	Feuchtmasse des gesamten Organismus (mg)
ZEILE	BE-HANDLG.	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							

	Konzentration	Behdlg. Nr.	Replik. Nr.	Nr. des Individuums	ID-Nummer	Entwicklungsstadium	Kopfrumpflänge (mm)	Hinterbeinlänge (mm)	Feuchtmasse des gesamten Organismus (mg)
ZEILE	BEHANDLG.	BEHDLG. Nr.	Replikat.	INDIV.	ID-Nr.	STADIUM	KÖRPERL.	HBL	GEW.
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							

	Konzentration	Behdlg. Nr.	Replik. Nr.	Nr. des Individuums	ID-Nummer	Entwicklungsstadium	Kopfrumpflänge (mm)	Hinterbeinlänge (mm)	Feuchtmasse des gesamten Organismus (mg)
ZEILE	BEHANDLG.	BEHDLG. Nr.	Replikat.	INDIV.	ID-Nr.	STADIUM	KÖRPERL.	HBL	GEW.
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							

	Konzentration	Behdlg. Nr.	Replikat. Nr.	Nr. des Individuums	ID-Nummer	Entwicklungsstadium	Kopfrumpflänge (mm)	Hinterbeinlänge (mm)	Feuchtmasse des gesamten Organismus (mg)
ZEILE	BEHANDLG.	BEHDLG. Nr.	Replikat.	INDIV.	ID-Nr.	STADIUM	KÖRPERL.	HBL	GEW.
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

Konzentration	Replikat	Entwicklungsstadium			KRL (mm)		Hinterbeinlänge (mm)		Gewicht (mg)	
		min	Median	max	Mittelwert	Standardabw.	Mittelwert	Standardabw.	Mittelwert	Standardabw.
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!																				

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	
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:

Pathologie:

Kontrolle Tier-ID — Replik 1	Kontrolle Tier-ID — Replik 2		Hypertrophie der Schilddrüse	Atrophie der Schilddrüse	Hypertrophie der follikulären Zellen	Hyperplasie der follikulären Zellen						
Summe:												

Dosis Tier-ID — Replik 1	Dosis Tier-ID — Replik 2		Hypertrophie der Schilddrüse	Hypertrophie der follikulären Zellen	Hyperplasie der follikulären Zellen					
Summe:										

Dosis Tier-ID — Replik 1	Dosis Tier-ID — Replik 2		Hypertrophie der Schilddrüse	Atrophie der Schilddrüse	Hypertrophie der follikulären Zellen	Hyperplasie der follikulären Zellen						
Summe:												

Dosis Tier-ID — Replik 1	Dosis Tier-ID — Replik 2		Hypertrophie der Schilddrüse	Atrophie der Schilddrüse	Hypertrophie der follikulären Zellen	Hyperplasie der follikulären Zellen						
Summe:												

Tabelle 8

Weitere histopathologische Kriterien

Datum:

Chemikalie:

Pathologie:

		Zunahme des Follikellumens	Verringerung des Follikellumens
Kontrolle Tier-ID — Replik 1			
Kontrolle Tier-ID — Replik 2			
Summe:			

		Zunahme des Follikellumens	Verringerung des Follikellumens
Dosis Tier ID — Replik 1			
Dosis Tier ID — Replik 2			
Summe:			

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

		Zunahme des Follikellumens	Verringerung des Follikellumens
Dosis Tier-ID — Replik 1			
Dosis Tier-ID — Replik 2			
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	Replikant	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

		Kontrolle				Dosis 1					Dosis 2					Dosis 3				
	Replikate	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 Nominalkonzentration 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 das Wachstum 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 Effekte 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*, die beide kultivierbar und kommerziell erhältlich sind. Wenn spezifische Lebensräume zu bewerten sind, die durch diese beiden Arten nicht abgedeckt werden, 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 repräsentieren Arthropoden, mit anderem Expositionspfad und anderer Expositionsrate als Regenwürmer und 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 und Respiration im Boden beschränkt sich auf geschätzte 1-5 % (5). Ihre wichtigste Rolle könnte daher die mögliche Regelung von Prozessen durch Fressen von Mikroorganismen und Mikrofauna darstellen. 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. *F. fimetaria* ist weltweit verbreitet und in verschiedenen Bodentypen von Sandböden bis zu Lehm Böden und von Mull- bis Rohhumusböden anzutreffen. Die augenlose, pigmentlose Collembolenart wurde in landwirtschaftlichen Nutzflächen in ganz Europa nachgewiesen (6). Sie ist ein Allesfresser und ernährt sich u. a. von Pilzhypen, Bakterien, Protozoen und Detritus. Durch das Abweiden kann *F. fimetaria* einen Einfluss auf Infektionen pflanzenpathogener Pilze haben (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 üblich; 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, wenn sie gestört werden. Die ökologische Bedeutung von *F. candida* ist der Bedeutung von *F. fimetaria* vergleichbar; sie lebt jedoch in Böden, die reicher an organischen Bestandteilen sind. *F. candida* vermehrt sich parthenogenetisch. Weniger als 1/1 000 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 zur Bestimmung des Prüfkonzentrationsbereichs 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 mittels nicht-linearer Regression mit einem geeigneten Modell bestimmt, 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 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 den Eigenschaften entsprechend unterschiedlich einzubringen. Für flüchtige Chemikalien ist die Prüfmethode nicht geeignet (d. h. für Chemikalien, bei denen die Henry-Konstante oder der Luft-Wasser-Verteilungskoeffizient größer als 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 ihrer EC_{50} -Konzentration im ausgewählten Testboden getestet werden; entweder in regelmäßigen Abständen oder nach Möglichkeit bei jeder einzelnen Prüfung, um sicherzustellen, dass die Reaktion der Testorganismen im Prüfsystem 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 (10)(11).

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 Laborausrüstung mit folgenden Bestandteilen benötigt:
 - Trockenschrank;
 - Stereomikroskop;
 - pH-Messgerät und Luxmeter;
 - Waagen mit geeigneter Genauigkeit;
 - geeignete Vorrichtungen zur Temperaturregelung;
 - geeignete Ausrüstung zur Luftfeuchtigkeitsregelung (nicht erforderlich, wenn die Expositionsgefäße mit Deckeln verschlossen werden);
 - Inkubator oder kleiner Raum mit Temperaturregelung;
 - Pinzette oder Sauggerät 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 natürlicher Boden eingesetzt werden, da der künstliche nicht mit natürlichen Böden 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 CaCO_3 -Anteil), hauptsächlich feiner Sand mit mehr als 50 % Partikeln mit einer Größe von 50-200 μm ; die genaue Menge des Sands hängt vom CaCO_3 -Gehalt ab (s. u.); insgesamt muss ein Anteil von 75 % erreicht werden.
 - 1,0 % Calciumcarbonat (CaCO_3 , 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: Die benötigte Menge an CaCO_3 hängt von den Bestandteilen des Bodensubstrats ab und ist durch Messung des pH-Werts der feuchten Unterproben des Bodens unmittelbar vor der Inkubation zu ermitteln.

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 Testanforderungen, 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 erfüllt werden können.

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, damit sich der Säuregrad ausgleichen/stabilisieren kann. Zur Bestimmung des pH-Werts wird eine Mischung aus Boden und 1 mol Kaliumchlorid- (KCl) oder 0,01 mol Calciumchlorid-Lösung (CaCl_2) im Verhältnis 1:5 verwendet (siehe Anlage 6). Wenn der Boden saurer als erforderlich ist, 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 Prüfkonzentrationen (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 Prüfkonzentrationen

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 einzumischen. 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 Prüfkonzentration 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 Prüfkonzentrationen 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 Anteil der Gesamtmenge des dem Boden zugesetzten Sandes) mit der Prüfchemikalie gemischt, bis die gewünschte Prüfkonzentration 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 Prüfkonzentrationen 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.

Prüfverfahren und Messungen

26. Für alle Prüfkonzentrationen wird eine geeignete Menge Testboden (entsprechend 30 g Frischgewicht) 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, kann ein Sauggerät mit niedriger Saugleistung verwendet werden. Die Anzahl der Replikate der Prüfkonzentrationen 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 dem Testboden 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 von 0,1, 1,0, 10, 100 und 1 000 mg/kg Bodentrockengewicht und zwei Replikate pro Prüfkonzentration 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 ein Gelege juveniler Tiere entstanden ist, 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 Prüfkonzentration 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 Prüfkonzentration 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 (1 000 mg/kg) keine Wirkungen festzustellen sind, kann der Reproduktionstest als Limit-Test mit der Prüfkonzentration 1 000 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-Modell 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 EC_{50} -Wert oder einen sonstigen EC_x -Wert zu ermitteln, sind sämtliche Daten einer Regressionsanalyse zu unterziehen. Der LC_{50} -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 Methoden zur multiplen Testung durchgeführt werden. Mit multiplen 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 Prüfkonzentrationen der Prüfchemikalie signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) bestehen. Welcher Test vorzunehmen ist, wird im OECD-Dokument 54 (9) beschrieben. Andernfalls 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 Prüfkonzentration) 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 für ungleiche Varianzen (Welch-Test) 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 Eigenschaften 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 natürlichem Boden 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 Prüfkonzentration);
- detaillierte Beschreibung des Extraktionsverfahrens und der Wirksamkeit des Verfahrens;

Prüfergebnisse:

- 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 Regressionsmodells; 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 minimal 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.

EC_x (Konzentration mit einer Wirkung von x %): Konzentration, bei der innerhalb einer bestimmten Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle eine Wirkung von x % auf die Testorganismen zu verzeichnen ist; der EC₅₀-Wert beispielsweise ist die Konzentration, bei der 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 Colembolen-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 Exkremate (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 schwarz-grauer 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 × 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 Tage 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 Prüfmethoden 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 von der intendierten Anwendung 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 Eigelege pro weibliches Tier (nur 1. Generation) und die Fertilität der Eigelege (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 Eigelege und die Fertilität der Eigelege werden ermittelt. Aus diesen Eigelegen 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 $\log-K_{ow}$ -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.

REFERENZCHEMIKALIEN

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 Referenzstoffe 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 Eigelege in den Kontrollen der 1. Generation mindestens 0,6 für jedes in den Zuchtkräftig eingesetzte weibliche Tier betragen;
- der Anteil der befruchteten Eigelege 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-Sättigungswertes⁽¹⁾ 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 × H × 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 Eigelege aus der Kristallisierungsschale entnommen wurden, werden sie in eine 12-Well Mikrotiterplatte gegeben (jeweils ein Eigelege pro Vertiefung mit jeweils mindestens 2,5 ml Wasser aus der dotierten Kristallisierungsschale); anschließend werden die Platten mit einem Deckel verschlossen, um signifikante Verdunstungsverluste auszuschließen. Alternativ können auch andere zur Aufnahme der Eigelege 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. Polytetrafluorethylen) bestehen.

Auswahl der Prüfspezies

12. Als Prüfspezies 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 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 wird empfohlen, die Sedimente vor dem Versuch sieben Tage unter Testbedingungen zu akklimatisieren. 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 %);

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

- 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 (CaCO₃) wird die fertige Mischung des Sediments auf einen pH-Wert von 7,0 ± 0,5 eingestellt;
 - f. der Gehalt der fertigen Mischung an organischem Kohlenstoff muss bei 2 % (± 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 Prüfkonzentrationen 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. ≤ 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.

VERSUCHSAUFBAU

17. Der Versuchsaufbau bezieht sich auf die gewählte Anzahl und den Abstand der Prüfkonzentrationen, die Anzahl der Prüfgefäße je Konzentration und die Anzahl der Larven je Gefäß sowie die Anzahl der Kristallisierungsschalen und der Zuchtkäfige. Im Folgenden wird der Versuchsaufbau für die Ermittlung der EC_x und der NOEC sowie ein Limit-Test beschrieben.

Versuchsaufbau für die Analyse durch Regression

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. Extrapolationen weit unter der niedrigsten oder über der höchsten Konzentration müssen vermeiden werden. Ein Vorversuch nach den Prüfmethoden C.27 oder C.28 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 müssen zwei Zuchtkäfige (A und B) verwendet werden. 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 (eine Ausnahme könnte gemacht werden im Fall 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 den EC_x -Wert.

Versuchsaufbau für die Bestimmung einer NOEC

20. Zur Bestimmung einer NOEC sind fünf Prüfkonzentrationen mit mindestens acht Replikaten (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 1 000 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 Effektdaten (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.

DURCHFÜHRUNG

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 Eigelege 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 wird dotiertes Sediment 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 können ebenfalls geeignet sein. 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 — mindestens in der höchsten Konzentration und einer niedrigeren Konzentration (siehe Nummer 38). Diese analytischen Bestimmungen der Prüfchemikalie ermöglichen es, eine 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 Eigelege kommen nämlich nur etwa einen Tag mit dem Wasser in Berührung, und die Schalen werden während des Tests nur kurze Zeit verwendet.

Einsetzen der Prüforganismen

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 Versuchsaufbau (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 Test Designs 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 (Paragraf 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 Prüfkonzentrationen 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 sie im Laufe von etwa 48 Stunden ein Gleichgewicht erreichen, bevor die ersten Eigelege abgelegt werden.
28. Die Eigelege werden mit einer Pinzette oder einer stumpfen Pipette aus der Kristallisierungsschale im Zuchtkäfig entnommen. Jedes Eigelege 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 Eigelegen werden mit einem Deckel verschlossen, um eine signifikante Verdunstung zu verhindern. Die Eigelege werden mindestens sechs Tage nach der Ablage zur Beobachtung aufbewahrt, um sie als befruchtet oder unbefruchtet zu klassifizieren.

Als Ausgangsmaterial für die 2. Generation werden aus jedem Zuchtkäfig mindestens drei, vorzugsweise jedoch sechs befruchtete Eigelege entnommen; anschließend wird etwas Futter bereitgestellt und gewartet, bis die Mücken schlüpfen. Die Eigelege sollten zum Höhepunkt der Eiablage entstanden sein; 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 regulatorischen Anforderungen 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) feingeriebene 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 % (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 500-1 000 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 Expositionsaufbaus 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

Schlupf

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. yoshimatsui* 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 Eigelege 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.

Reproduktion

37. Die Wirkung auf die Reproduktion wird anhand der Anzahl der von Mücken der 1. Generation gelegten Eigelege und der Fertilität dieser Eigelege beurteilt. Einmal täglich werden die Eigelege von der in den Zuchtbehältnissen befindlichen Kristallisierungsschale abgelesen. Die Eigelege werden entnommen und mit mindestens 2,5 ml nativem Wasser in eine Mikrotiterplatte mit 12 Vertiefungen (jeweils ein Eigelege pro Vertiefung) oder in sonstige geeignete Gefäße gesetzt; diese werden mit einem Deckel verschlossen, um signifikante Verdunstungsverluste zu vermeiden. Für jedes Eigelege 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 spiralgem Eigelege oder anomal z. B. nicht mit spiralgem Eigelege) sowie Fertilität (befruchtet oder unbefruchtet). Im Laufe von sechs Tagen nach der Ablage wird geprüft, ob die Eigelege befruchtet sind. Ein Eigelege 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 Eigelege pro Weibchen und die Anzahl der befruchteten Eigelege pro Weibchen berechnet. Erforderlichenfalls kann die Anzahl der Eier eines Eigeleges mit der Ringzählmethode zerstörungsfrei geschätzt werden (siehe Beschreibung in den Nummern 32 und 33).

Analysemessungen

Konzentration der Prüfchemikalie

38. Als minimale Anforderung müssen 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 mindestens in der höchsten Konzentration und in einer niedrigeren Konzentration analysiert werden. Dies gilt für Gefäße beider Generationen. Aus den Kristallisierungsschalen im Zuchtkäfig wird nur das Überstandswasser analysiert, da die Eigelege 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 zwischen Wasser und 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 Prüfsystem 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 und in den Kontrollgefäßen 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 Reproduktion 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 Effektkonzentrationen 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

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

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 Prüfkonzentration summiert. Diese nicht transformierten Daten werden dann in einer Häufigkeitstabelle (2 × 2) bezogen auf die (Lösungsmittel-)Kontrolle oder auf die gepoolten Daten der Kontrollen erneut geprüft.

Reproduktion

53. Die Reproduktion (gemessen als Fekundität) wird an der Anzahl der Eigelege pro Weibchen gemessen. Die Gesamtzahl der in einem Zuchtkäfig gelegten Eigelege 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 Eigelege dient als Maßstab zur Ermittlung der Anzahl der befruchteten Eigelege pro Weibchen. Die Gesamtzahl der in einem Zuchtkäfig gelegten befruchteten Eigelege 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 (siehe Anlage 5).
- 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: Prüfkonzentrationen, 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 Eigelege 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 Prüfkonzentration (1. und 2. Generation);
- Anzahl der Larven pro Gefäß, die sich nicht zu Mücken entwickelt haben (1. und 2. Generation);
- Prozentanteil/Anteil Schlupf pro Replikat und Prüfkonzentration (männliche und weibliche Mücken gepoolt; 1. und 2. Generation);
- mittlere Entwicklungsrate von voll entwickelten und lebenden Mücken pro Replikat und Prüfkonzentration (männliche und weibliche Mücken getrennt und gepoolt; 1. und 2. Generation);

- Anzahl der in den Kristallisierungsschalen gelegten Eigelege pro Zuchtkäfig und Tag;
- Merkmale der einzelnen Eigelege (Größe, Form und Fertilität);
- Fekundität — Gesamtzahl der Eigelege pro Gesamtzahl der in den Zuchtkäfig eingesetzten Weibchen;
- Fertilität — Gesamtzahl der befruchteten Eigelege 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), Paelearctic 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 (*Hyalella 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 *Hyalella 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. Statist. 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 × 30 × 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. 1 000 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 Anzuchtswasser 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.

Eiegelege

9. Sobald sich Imagines in den Zuchtkäfigen befinden, sind alle Larvenzuchtgefäße dreimal wöchentlich auf gallertartige Eiegelege zu kontrollieren. Vorhandene Gelege sind vorsichtig zu entnehmen und in eine kleine Schale mit einer Probe des Zuchtwassers zu geben. Mit den Eiegelegen werden neue Kulturen angesetzt (z. B. 2-4 Eiegelege 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 $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 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_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004

Stammlösungen (l)	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
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⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7H ₂ O ⁽¹⁾ ⁽²⁾	1 991	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	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	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 zugesetzte 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. Streløkke und H. Köpp. Berlin.

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

Elenđt, 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

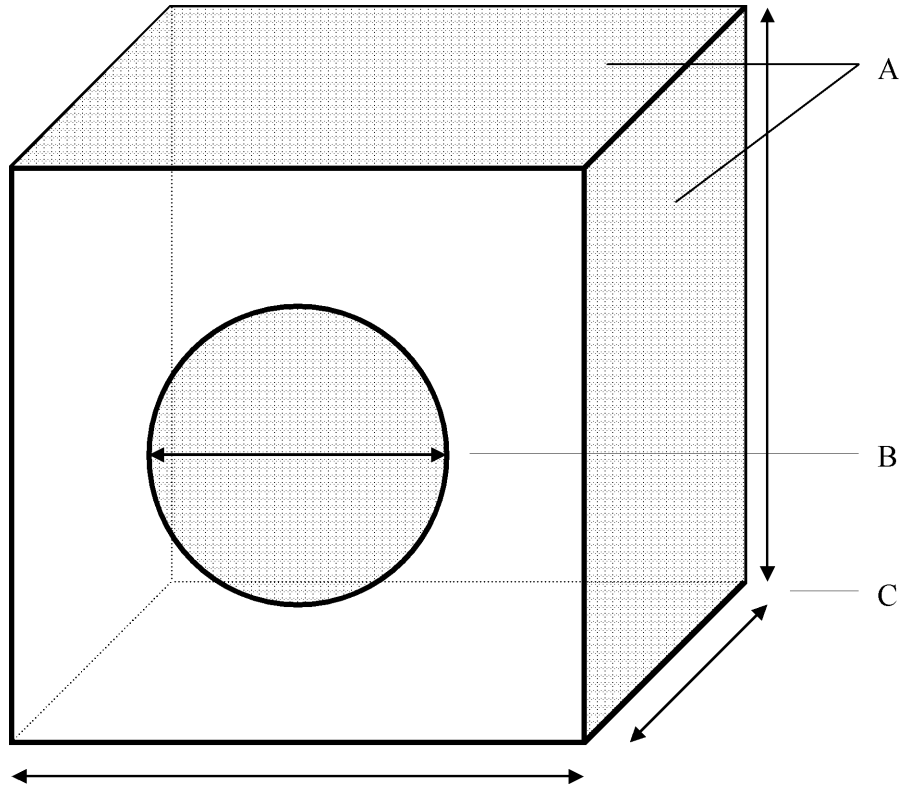
BESTANDTEILE	KONZENTRATIONEN
Partikel	< 20 mg/l
Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffen	< 2 mg/l
Nicht ionisiertes Ammonium	< 1 µg/l
Härte in CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Restchlor	< 10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden und polychlorierten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

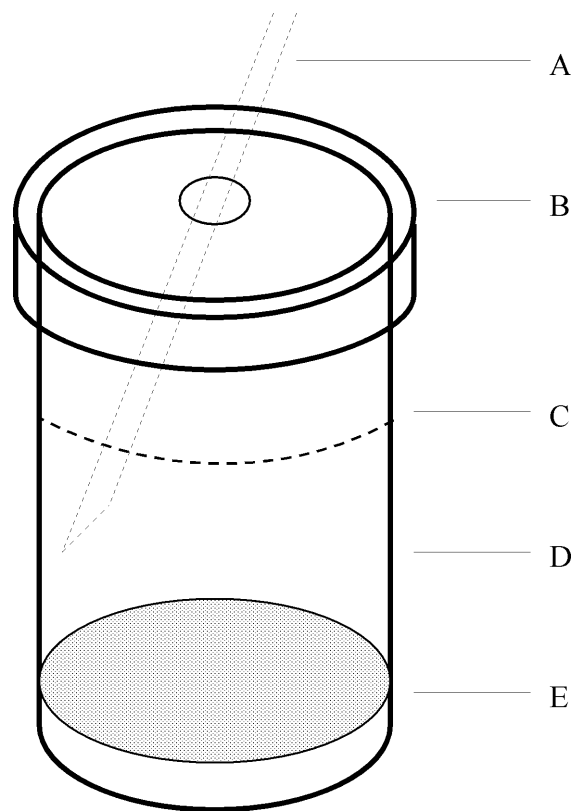


A: Gaze-Abdeckung oben und mindestens auf einer Seite (Maschenweite ca. 1 mm)

B: Öffnung zum Einsetzen der Imagines in den Zuchtkäfig und zur Entnahme der gelegten Eigelege aus den Kristallisationsschalen (in dieser Abbildung nicht dargestellt)

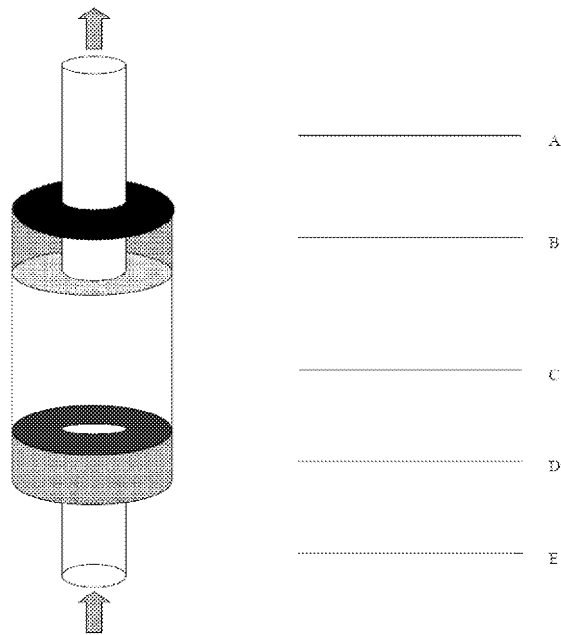
C: Mindestabmessungen der Zuchtkäfige (L × H × B): 30 cm × 30 cm × 30 cm

Prüfgefäß (Beispiel):



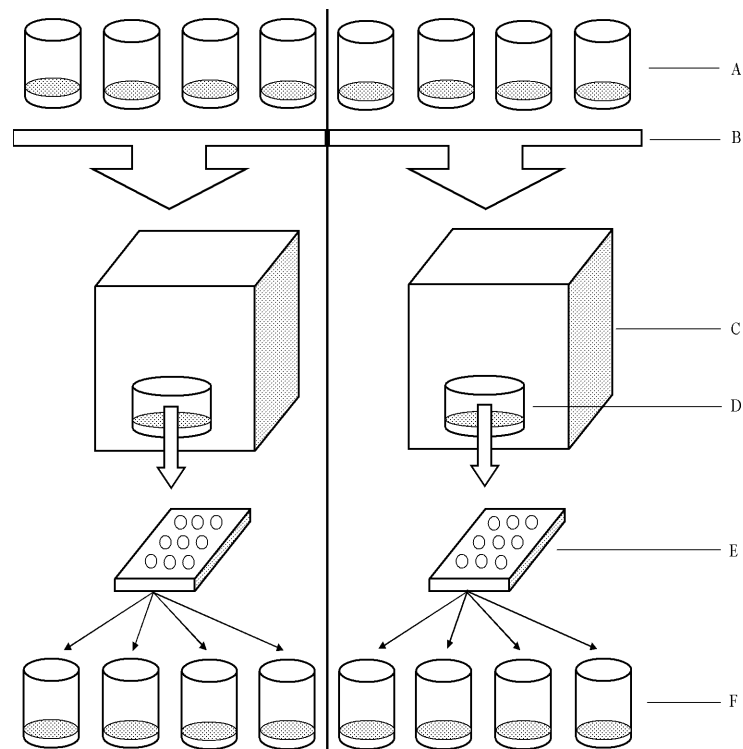
- A: Pasteur-Pipette zur Belüftung des Überstandswassers
- B: Glasdeckel, damit die Imagines das Gefäß nicht verlassen
- C: Überstandswasser
- D: Prüfgefäß (Becherglas mit einem Fassungsvermögen von mindestens 600 ml)
- E: Sedimentschicht

Absaugvorrichtung zur Extraktion von Imagines (Luftdurchfluss in Pfeilrichtung):



- A: Glasrohr (Innendurchmesser ca. 5 mm), mit einer selbstansaugenden Pumpe verbunden
- B: Korken 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: Korken aus vulkanisiertem Kautschuk, durch den ein Rohr (E) geführt wird; um die Mücken in den Zuchtkäfig zu entlassen, wird der Korken (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 Eigelege

E: Mikrotiterplatten, für jedes Eigelege 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 Dickkopfelritzen (*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 Verlängerung 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 Expositionszeit 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-Konzentration und das Geschlechterverhältnis; die betreffenden Daten werden durch histologische Gonadenuntersuchungen ermittelt. Histopathologische Gonadenuntersuchungen (Bewertung und Bestimmung des Entwicklungsstadiums von Oozyten und von Spermatogenezellen) können zusätzlich 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 kann an andere Arten als die oben genannten angepasst werden, wenn diese Arten einer Validierung entsprechend der Validierung für den Japanischen Reiskarpfing, den Dreistachligen Stichling und den Zebraabärbling 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 Ovar, wo es aufgenommen und unter Entwicklung von Eiern modifiziert wird. Die VTG-Synthese erfolgt auch bei unreifen Fischen und bei adulten Männchen, wenn auch 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 peer reviewed wissenschaftlichen Veröffentlichungen 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 östrogenes 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 im Allgemeinen 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 Zebraäbblinge, 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 Zebraäbblingen besteht eine ausgeprägte Korrelation zwischen der im Blutplasma, in der Leber und in Homogenatproben gemessenen VTG-Konzentration, wenn auch Homogenate allerdings 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 Zebraäbblingen 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 Spermatogenezellen) 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 Wirkweise 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 FSDT 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-FSDT sollen Chemikalien mit androgenen und östrogenen Eigenschaften sowie Antiandrogene, Antiöstrogene und die Steroidogenese hemmende Chemikalien nachgewiesen werden. Beim FSDT wurden in den Validierungsphasen (1 und 2) östrogene, androgene und die Steroidogenese hemmende Chemikalien berücksichtigt. Die Wirkung von Östrogen- und Androgenantagonisten im FSDT wird in Tabelle 1 dargestellt; die entsprechenden Wirkmechanismen sind aber gegenwärtig noch nicht umfassend dokumentiert.

PRINZIP DER PRÜFUNG

12. In der Prüfung 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. Die Prüfung beginnt mit dem Einsetzen frisch befruchteter Eier (vor dem Blastula-Stadium) 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 Zebraäbrbling) wird die Prüfung 60 Tage nach dem Schlüpfen beendet. Am Ende der Prüfung 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 Reiskarpfing, 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 Prüfergebnisse sind dann akzeptabel, 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 Reiskarpfing	Zebraärbfing	Dreistachfing Stichfing
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 Prüfbereich 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 Eibehälter, 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, es sei denn die Behälter werden benötigt, um ein Verlassen der Fische aus dem großen Behälter zu verhindern. Wenn die Larven umgesetzt werden, 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 Wasser die Testergebnisse nicht unangemessen beeinträchtigt (indem es beispielsweise mit der Prüfchemikalie reagiert) oder dass das Wasser 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 Wasser 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.

Prüflösungen

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 Wasser 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 Wasser 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 aber unter Umständen in Einzelfällen 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 der Prüfung

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 dem Blastula-Stadium 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 Reiskarpfingern, Dreistachligen Stichlingen und Zebrabärblingen 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 Kontrollen nach dem Quadratwurzelgesetz von Penrose 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 Prüfkonzentrationen zu verwenden. Die Kurve der LC₅₀-Werte im Verhältnis zur Expositionsdauer in den verfügbaren akuten Toxizitätstests ist bei der Auswahl des Spektrums der Prüfkonzentrationen zu berücksichtigen. Wenn die Daten zur Risikobewertung verwendet werden sollen, werden fünf Prüfkonzentrationen 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 Prüfkonzentration sollte bei 10 % des LC₅₀-Wertes für die Larven/juvenilen Tiere liegen.

Kontrollgefäße

32. Zusätzlich zu den Prüfkonzentrationen werden eine Kontrolle mit Wasser (≥ 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 Wasser 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 Prüfkonzentration 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 (± 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 dem Balstula -Stadium 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 gibt es unterschiedliche Kriterien für die Mortalität:
- Eier: insbesondere in den frühen Stadien eine ausgeprägte Verringerung der Lichtdurchlässigkeit sowie Farbänderungen durch Koagulation und/oder ausgefallte 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 diese 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 Schlupfprozesses (Beginn und Ende);
 - Länge und Gewicht der überlebenden Tiere;
 - Anzahl der Larven mit Fehlbildungen;
 - Anzahl der Fische mit Verhaltensauffälligkeiten.

Entnahme von Fischen

44. Das Beprobieren der Fische wird am Ende des Tests durchgeführt. Die 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. Zur Probenahme 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 °C 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 OECD-Prüfrichtlinie 230 zu entnehmen (38). Anschließend werden die Lebern einzeln homogenisiert, wie in den OECD-Prüfrichtlinien 229 oder 230 beschrieben. Der Überstand wird zur VTG-Messung mit einem homologen ELISA-Verfahren entnommen. (Ein Beispiel für die quantitative Bestimmung bei Zebraabräblingen 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 den Ovarien Spermatogenezellen nachgewiesen werden (ja/nein). Die histopathologische Untersuchung und die Bewertung des Entwicklungsstadiums von Ovarien 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 Reiskarpfinge und gelegentlich Zebrabärblinge). Die entsprechenden Beobachtungen sind zu protokollieren.
53. Zur Bestimmung des genetischen Geschlechts bei einzelnen Japanischen Reiskarpfingen wird geprüft, ob das männliche Determinationsgen DMY auf dem Y-Chromosom vorhanden ist. Das genotypische Geschlecht der Reiskarpfinge 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 Reiskarpfing hormonell gesteuert. Daher ist am Ende der Expositionsdauer möglichst auch das physische Aussehen der Fische zu prüfen. Bei Japanischen Reiskarpfingen 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 Exakt 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 Umwandlung 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 dann eine monoton ansteigende Dosis-Wirkungsbeziehung festgestellt werden kann, 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 Aquarien 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 Prüfkonzentration \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 Prüfkonzentrationen, Methode zur Herstellung der Stammlösungen (in einem Anhang), Häufigkeit der Erneuerung (wenn verwendet, sind das Lösungsmittel und die Konzentration des Lösungsmittels anzugeben);
- die nominellen Prüfkonzentrationen, 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) Holbeck, 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 disruptors', *Fish Physiology and Biochemistry* 28, S. 319-321.
- (7) Orn, S., H. Holbeck, 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) Holbech, 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-ethynylestradiol, 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 Reiskarpfinge

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 Ovarien (ja/nein)

Besatzrate: Feuchtmasse eines Fisches pro Wasservolumen

MOA: *Mode Of Action* (Wirkmechanismus)

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 identifizierbare (männlich/weiblich) Keimzellen.

VTG: Vitellogenin

Anlage 2

Versuchsbedingungen des FSDT (Süßwasser-Arten)

1. Empfohlene Arten	Japanischer Reiskärpfling (<i>Oryzias latipes</i>)	Zebrabärbling (<i>Danio rerio</i>)	Dreistachliger Stichling (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)
2. Prüftyp	Durchfluss oder semistatisch:	Durchfluss oder semistatisch:	Durchfluss oder semistatisch:
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, 540-1 080 lx, oder 50-100 ft-c (Werte für Laborumgebung)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 lx, oder 50-100 ft-c (Werte für Laborumgebung)	10-20 µE/m ² /s, 540-1 080 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 Aquarien	Die einzelnen Aquarien müssen ein Fassungsvermögen von mindestens 7 l haben.	Die einzelnen Aquarien müssen ein Fassungsvermögen von mindestens 7 l haben.	Die einzelnen Aquarien müssen ein Fassungsvermögen von mindestens 7 l haben.
8. Erneuerung der Prüflösungen (im Durchfluss)	Mindestens 5-mal täglich	Mindestens 5-mal täglich	Mindestens 5-mal täglich
9. Alter der Prüforganismen 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. Anzahl der Replikate pro Behandlung	Mind. 4 (wenn keine Aufteilung auf die Kontrollen nach dem Quadratwurzelgesetz von Penrose vorgenommen wird)	Mind. 4 (wenn keine Aufteilung auf die Kontrollen nach dem Quadratwurzelgesetz von Penrose vorgenommen wird)	Mind. 4 (wenn keine Aufteilung auf die Kontrollen nach dem Quadratwurzelgesetz von Penrose 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. Wasser	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, VTG histologische Gonadenuntersuchungen, genetisches Geschlecht, Geschlechterverhältnis	Schlupfrate, Überlebensrate, Gesamtmorphologie, VTG histologische Gonadenuntersuchungen, Geschlechterverhältnis	Schlupfrate, Überlebensrate, Gesamtmorphologie, VTG histologische Gonadenuntersuchungen, Geschlechterverhältnis
18. Validitätskriterien der Prüfung bei gepoolten Replikaten der Kontrollen	Schlupfrate > 80 %	Schlupfrate > 80 %	Schlupfrate > 80 %
	Überlebensrate nach dem Schlüpfen \geq 70 %	Überlebensrate nach dem Schlüpfen \geq 70 %	Überlebensrate nach dem Schlüpfen \geq 70 %
	Wachstum (Feuchtmasse der Fische, trockengetupft) > 150 mg	Wachstum (Feuchtmasse der Fische, trockengetupft) > 75 mg	Wachstum (Feuchtmasse der Fische, trockengetupft) > 120 mg
	Länge (Standardlänge) > 20 mm	Länge (Standardlänge) > 14 mm	Länge (Standardlänge) > 20 mm
	Geschlechterverhältnis (% männliche oder weibliche Fische) 30-70 %	Geschlechterverhältnis (% männliche oder weibliche Fische) 30-70 %	Geschlechterverhältnis (% männliche oder weibliche Fische) 30-70 %

Anlage 3

Chemische Eigenschaften eines geeigneten Wassers

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 Prüfkonzentrationen

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 Zebraquärlingen (*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-Zebraquärling-Lipovitellin-IgG beschichtete Mikrotiterplatten (zertifiziert Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Dänemark) werden aufgetaut und dreimal mit Waschlösung gewaschen (*).
2. Gereinigter Zebraquärling-Vitellogenin-Standard⁽¹⁾ 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.

(*) Waschlösung:

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.

⁽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.

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

(****) PBS-Stammlösung

NaCl	160,0 g
KH ₂ PO ₄	4,0 g
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	26,6 g
KCl	4,0 g

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 Reiskarpfingen (JMD = Japanische Medaka) und Zebraärblingen (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 Zebraärblingen wird der Kopf unmittelbar hinter der Brustflosse und der Schwanz unmittelbar hinter der Rückenflosse abgeschnitten.
 - b. Bei Japanischen Reiskarpfingen 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 Gewebe-Kassette gelegt, die anschließend in eine Fixierlösung (Davidson oder Bouin) gestellt wird. Von der Fixierlösung wird mindestens das zehnfache Volumen des ungefähren Gewebevolumens 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 Gewebeeinbeter 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 Gewebeeinbeter 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

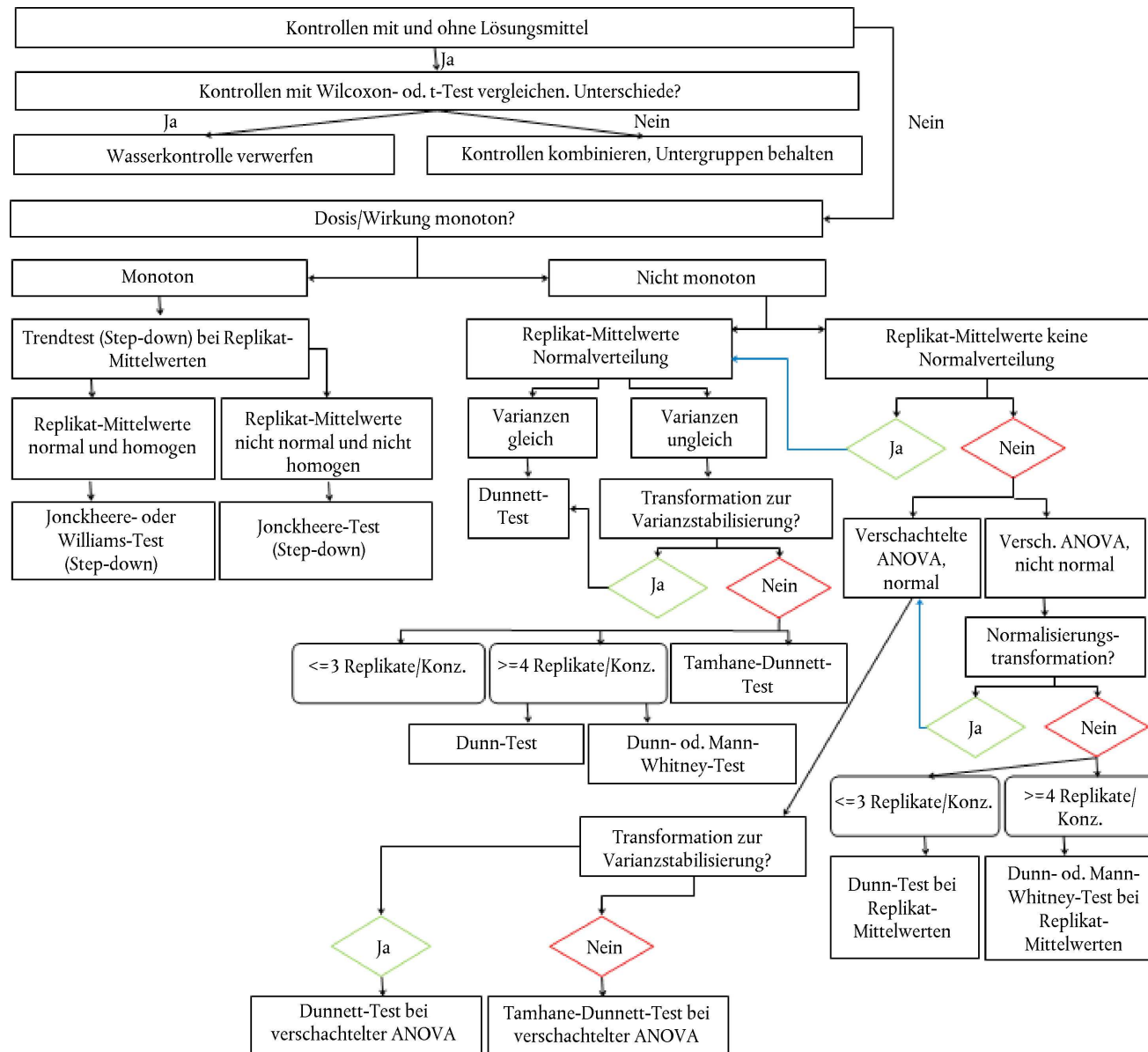
- a. Die Deckel können von Hand oder automatisch aufgesetzt werden.
- b. Die Objektträger werden in Xylol oder TissueClear getaucht; anschließend wird das überschüssige Xylol/TissueClear vorsichtig abgeklopft.
- c. Zum Ende des Objektträgers hin werden auf die der gefrorenen Seite gegenüberliegende Seite oder auf das Deckglas etwa 0,1 ml Eindeckmedium gegeben.
- d. Das Deckglas wird in spitzem Winkel gekippt auf den Objektträger aufgesetzt.

3. Kennzeichnung

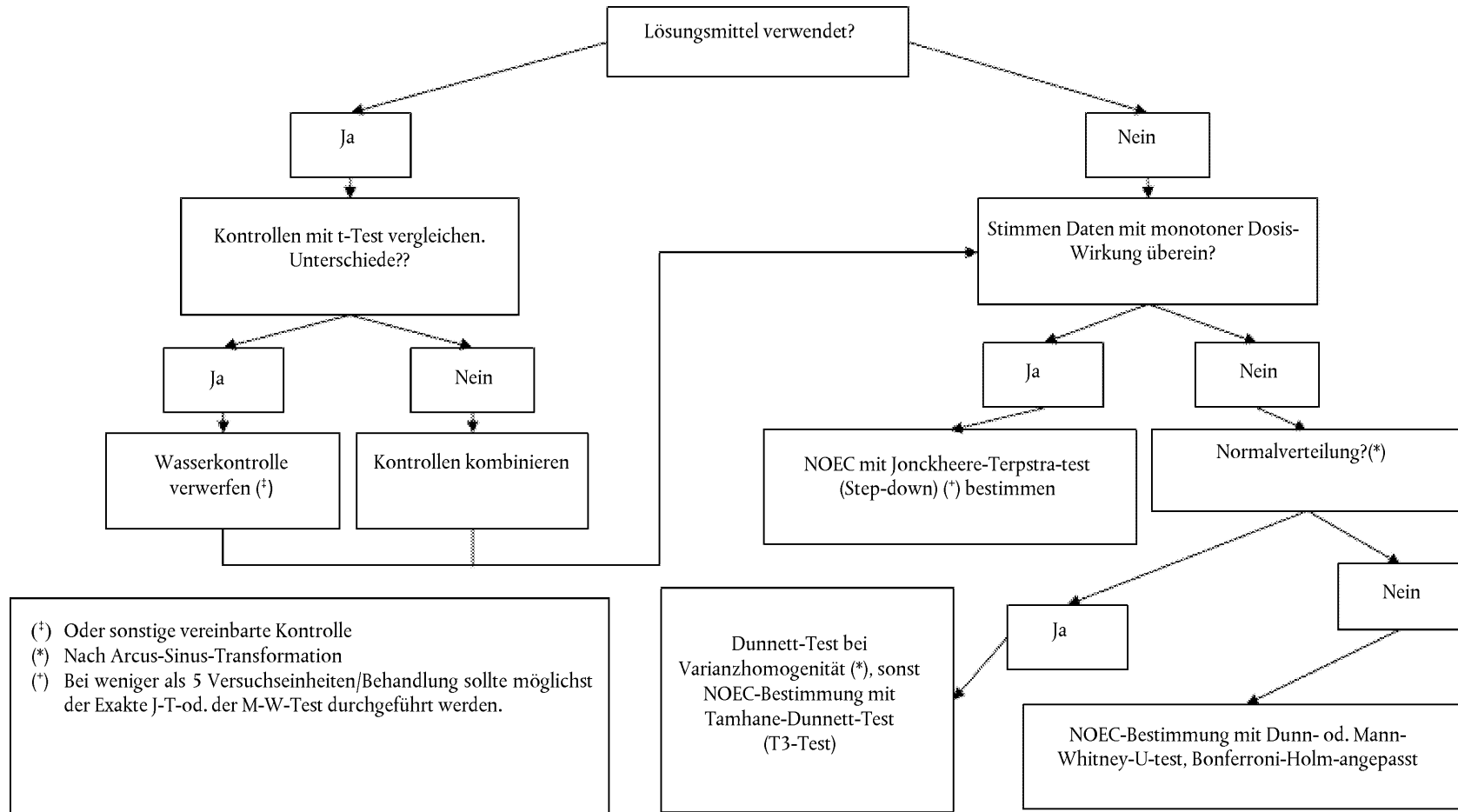
a. Die Objektträger müssen jeweils mit folgenden Informationen gekennzeichnet werden:

- i. Name des Labors
 - ii. Arten
 - iii. Proben-Nr. / Objektträger-Nr.
 - iv. Chemikalie / Behandlungsgruppe
 - v. Datum
- _____

Statistisches Flussdiagramm zur Vitellogenin-Analyse



Statistisches Flussdiagramm zur Analyse des Geschlechterverhältnisses



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-Programm 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 × 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 1 × 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 Färben 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 × 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) oder mit 70 %igem Ethanol gefüllt (zum Transport und zur anschließenden Aufbewahrung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). 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 feste Gewebe zur DNA-Extraktion verwendet werden (z. B. die Wirbelsäule oder eine Brustflosse).
3. Die DNA wird bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Rückwärtsprimer	0,5 µl (0,1 nmol/µl)	2,0 µM
Wasser in für die Molekularbiologie geeigneter Qualität	30,75 µl	
GoTaq-Polymerase	0,25 µl	1,25 U

- 47,5 µl werden in ein gekennzeichnetes dünnwandiges 0,5 ml-PCR-Röhrchen gegeben.
- 2,5 µl der gereinigten DNA werden in das entsprechend gekennzeichnete Röhrchen geben. 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 ± 2 °C denaturiert; danach folgen weitere 39 Zyklen von jeweils 1 Minute bei 94 ± 2 °C, 1 Minute bei 55 ± 2 °C, 1 Minute bei 72 ± 2 °C und schließlich nochmals 10 Minuten bei 72 ± 2 °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 × TAE-Puffer eingewogen.
- Die Agarose wird unter Erwärmung in einem Mikrowellengerät (ca. 2-3 min) aufgelöst.
- 2 Tropfen Ethidiumbromid werden hinzugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/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 × TAE-Puffer bedeckt.
- Von den Proben werden jeweils 20 µl in jeweils eine Vertiefung gefüllt; außerdem wird ein Molekulargewichtsmarker (100 bp 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 µg/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 Spermas 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 Prüfbecken

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 in Meerwasser entwickelt.
3. In den hier beschriebenen Methoden wird natürliches Meerwasser sowohl als wässrige Phase als auch als Bezugsquelle für Mikroorganismen genutzt. Analog zu den Methoden zur Prüfung der leichten biologischen Abbaubarkeit in Süßwasser 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 der analytischen Methode für gelösten organischen Kohlenstoff (DOC Die-Away-Tests) 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 organischen Kohlenstoffs beeinträchtigen. Es ist auf Grund der Konzentration des verwendeten Prüfstoffes ebenfalls erforderlich, Nährstoffe in den geschlossenen Flaschentest (Closed Bottle-Method) hinzuzugeben.
5. Insoweit handelt es sich bei den Methoden nicht um Tests 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 Ergebnisse der Prüfungen, die für Stoffe durchgeführt werden, die aufgrund ihrer Verwendungsformen und ihrer Entsorgung letztlich ins Meer gelangen können, 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, und nach dem primären biologischen Abbau kann eine spezifische chemische Analyse vorgenommen werden. Zur Prüfung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit werden ¹⁴C markierte Stoffe benötigt, damit der Abbau von löslichem organischem ¹⁴C sowie die Entstehung von ¹⁴CO₂ bei umweltrelevanten 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. Während Stoffe mit einer Wasserlöslichkeit unterhalb eines Wertes von etwa 5 mg C/l mit der Schüttelmethode nicht getestet werden können, lassen sich schlecht lösliche Stoffe prinzipiell zumindest mit einem geschlossenen Flaschen-Test untersuchen.

Tabelle

Vorteile und Nachteile des Schüttelkolben-Tests und des geschlossenen Flaschentests

METHODE	VORTEILE	NACHTEILE
SCHÜTTELKOLBEN	<ul style="list-style-type: none"> — einfache Apparatur (abgesehen vom C-Analysegerät) — eine Testdauer von 60 Tagen ist unproblematisch — keine Beeinflussung durch Nitrifikation — Anpassung zur Berücksichtigung flüchtiger Stoffe möglich 	<ul style="list-style-type: none"> — C-Analysegerät erforderlich — bei Verwendung von 5-40 mg DOC/l können Hemmwirkungen auftreten — Ermittlung des gelösten organischen Kohlenstoffs mit geringen Konzentrationen im Meerwasser ist schwierig (Chlorideffekt) — DOC ist bei Meerwasser manchmal hoch
GESCHLOSSENE FLASCHE	<ul style="list-style-type: none"> — einfache Apparatur — einfache Endbestimmung — durch 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 einem Wert von mehr als 25-40 mg C/l entsprechen. Außerdem darf der Prüfstoff nicht erheblich auf Glasflächen adsorbieren. Informationen zur Reinheit oder zu den relativen Anteilen der Hauptkomponenten des Prüfstoffes werden benötigt, damit die Testergebnisse entsprechend interpretiert werden können. Dies gilt insbesondere bei sehr knappem Testergebnis im Bereich des ‚Pass‘-Levels.

5. Informationen über die Toxizität des Prüfstoffes für Bakterien (beispielsweise gemessen anhand des Kurzzeit-Atemfrequenztests (4)) können für die Wahl geeigneter Prüfkonzentrationen zweckdienlich und für die korrekte Interpretation niedriger Abbaubarkeitswerte erforderlich 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 relativ 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), betragen bei Natriumbenzoat die ‚Lag‘-Phase (t_l) 1 bis 4 Tage und die Zeitdauer bis zu einem Abbau von 50 % (t_{50}) (ohne ‚Lag‘-Phase) 1 bis 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 Prüfstoffes, 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 Prüfstoffes 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 ± 2 °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) wurde kein Unterschied 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:

(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.	

Das Ausfällen aus Lösung (d) kann verhindert werden, indem ein Tropfen konzentrierter Salzsäure 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

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

Inokulum

15. 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) kann fakultativ (beispielsweise durch Plattenzählung mit Meerwasseragar) bestimmt werden. 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

16. 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 gewaschen und getrocknet werden. Auch vor der erstmaligen Verwendung sind die Kolben zu reinigen.
17. Die Prüfstoffe werden jeweils in zwei Kolben (Duplikate) zusammen mit einer einzelnen Flasche mit dem Referenzstoff untersucht. Zur Bestimmung des analytischen Blindwerts wird ein doppelter Blindtest durchgeführt, bei dem weder der Prüfstoff noch ein Referenzstoff verwendet werden. Die Prüfstoffe werden so im Prüfmedium gelöst (einfache Zugabe über eine konzentrierte Stammlösung), dass die gewünschten Ausgangskonzentrationen von gewöhnlich 5-40 mg DOC/l erhalten wird. 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 Versuchsaufbau einen Inhibitionstest in doppelter Ausführung vorzusehen. Die Prüfstoffe und die Referenzstoffe werden in das gleiche Gefäß gegeben. Die Konzentration des Referenzstoffes sollte identisch sein wie im Kontrollansatz (d. h. 20 mg DOC/l).
19. In die Erlenmeyer-Kolben werden geeignete Mengen an Testlösungen gegeben (bewährt hat sich eine Füllung bis etwa zur Hälfte des Fassungsvermögens); und diese anschließend 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 auf 15-20 (± 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 andere Verlustprozesse, wie Hydrolyse (ein Problem nur bei der spezifischen Analyse), eine Verflüchtigung oder eine Adsorption zu erwarten sind, ist anzuraten, eine physikalisch-chemische Kontrolle durchzuführen. Das kann durch Zugabe von Quecksilber(II)-chlorid (HgCl_2) ⁽¹⁾ (50-100 mg/l) in die Gefäße erfolgen, um die mikrobielle Aktivität zu unterbinden. 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.)

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 die Geschwindigkeit des biologischen Abbaus stark variiert. Die DOC-Analyse wird für die einzelnen Proben jeweils doppelt vorgenommen.

⁽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.

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 imprägniert 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 (~ 4 000 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 Prüfkonzentrationen (> 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; durch eine schrittweise ‚rückwärts‘- Auswahl der entsprechenden Proben für die Analyse ist es möglich, eine gute Beschreibung der Bioabbaukurve mit einer relativ geringen Anzahl analytischer Bestimmungen zu erhalten. Wenn am 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. Findet der Abbau am Tag 60 offensichtlich statt, aber ist noch kein Plateau erreicht, ist der Versuch zu verlängern.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

Auswertung der Ergebnisse

30. Die Ergebnisse der Analyse werden auf dem beigegeführten Datenblatt (Anlage 2) protokolliert; anschließend wird der biologische Abbau des Prüfstoffes 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 seit dem 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.
- gemessener Abbau in Prozent. nach 60 Tagen oder am Ende des Tests

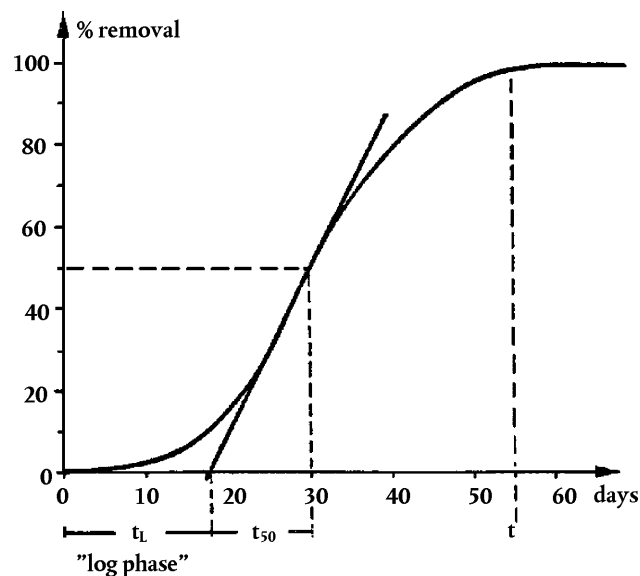
Diskussion der Ergebnisse.

Validität und Interpretation der Ergebnisse

34. Die mit den Referenzstoffen (z. B. Natriumbenzoat, Natriumacetat oder Anilin) ermittelten Ergebnisse sollten mit 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. Obwohl die Ergebnisse von Inhibitionstests auf Grund der Beteiligung von DOC durch den Prüfstoff nicht immer einfach zu interpretieren sind, ist eine signifikante Verringerung des gesamten gelösten Kohlenstoffs gegenüber der Kontrolle ein klares Anzeichen für toxische Effekte.

35. Wegen der Verwendung verhältnismäßig hoher Prüfkonzentrationen 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 ein Beispiel 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. Analog zur beschriebenen Schüttelmethode sind auch die Ergebnisse dieses Tests nicht als Indikatoren für eine leichte biologische Abbaubarkeit zu betrachten, sondern vielmehr zum Erhalt weiterer Informationen über die biologische Abbaubarkeit von Stoffen in der Meeresumwelt zu verwenden.

PRINZIP DER METHODE

3. Eine zuvor festgelegte Menge des Prüfstoffes 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 durch eine Ausdehnung des Tests auf mehr als 28 Tage wegen der dann meist auftretenden erheblichen Störungen keine verwendbaren Informationen erhalten wurden. 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, ob ein Test bei einem bestimmten Stoff durchzuführen ist, müssen einige Eigenschaften des Stoffes bekannt sein. Die Summenformel wird benötigt, um den theoretischen Sauerstoffbedarf (ThSB) zu berechnen (siehe Anlage 3). Ansonsten 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 der Hauptkomponenten des Prüfstoffes werden benötigt, damit die Testergebnisse entsprechend interpretiert werden können. Dies gilt insbesondere bei sehr Testergebnissen nahe am ‚Pass‘-Level.
7. Informationen über die Toxizität des Prüfstoffes für Bakterien (beispielsweise gemessen im Kurzzeit-Atemfrequenztests (4)) können für die Wahl geeigneter Prüfkonzentrationen 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 angemessen 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, betrug bei Natriumbenzoat die ‚Lag‘-Phase (t_l) 0-2 Tage und die Zeitdauer bis zu einem Abbau von 50 % (t_{50}) (ohne ‚Lag‘-Phase) 1-4 Tage. Für Anilin betragen die t_l -Werte 0-7 Tage und die t_{50} -Werte 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 (± 1 °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 Lagerung unter aeroben Bedingungen bei Testtemperatur im Dunkeln oder bei diffuser Beleuchtung. Bei Bedarf 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. Diese Vorbehandlung erfolgt nach der Alterung, falls verwendet.

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, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	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.

Das Ausfällen in der Lösung (d) kann verhindert werden, indem ein Tropfen konzentrierter Salzsäure 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 beigefügten 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 werden jeweils zwei Flaschen vorbereitet. 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 Prüfstoffes) 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:
- die Löslichkeit des gelösten Sauerstoffs im Meerwasser bei der jeweiligen Testtemperatur und beim jeweiligen Salzgehalt (siehe beigefügtes Nomogramm, Anlage 4);
 - der BSB der Blindprobe des Meerwassers und
 - der erwartete biologische Abbau des Prüfstoffes.
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 O_2 /l oder mehr betragen, wenn das Meerwasser nicht gealtert ist. Um eine signifikante Sauerstoffkonzentration nach der Oxidation des Prüfstoffes sicherzustellen, wird bei Stoffen, bei denen (ebenso wie bei den Referenzstoffen) unter den Testbedingungen ein vollständiger Abbau erwartet wird, mit einer Ausgangskonzentration des Prüfstoffes 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 Prüfstoffes 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 Prozesse (z. B. Hydrolyse oder Adsorption) abgebaut wird. Ein physikalisch-chemischer Kontrolltest kann durchgeführt werden durch Zugabe von Quecksilber(II)-chlorid (HgCl_2) ⁽¹⁾ (50-100 mg/l) zu zwei Gefäßen mit dem Prüfstoff, um das Wachstum von Mikroorganismen zu unterbinden. Ein signifikanter 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 des Prüfstoffs,
 - 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 spätere 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 einer Membranfiltration (0,2-0,45 µm) unterzogen oder 15 Minuten lang 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 beigefügten Datenblättern protokolliert (Anlage 5).

⁽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.

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 Prüfsubstanz auszudrücken. Als Abbau wird das Verhältnis des biochemischen Sauerstoffbedarfs entweder (vorzugsweise) zum theoretischen Sauerstoffbedarf (ThSB) oder zum chemischen Sauerstoffbedarf (CSD) 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 die 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 seit dem 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 Prüfdauer (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:

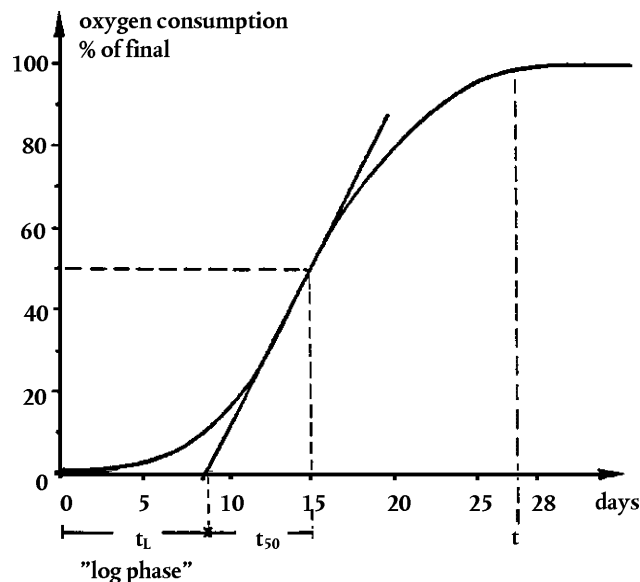
- auf einem Datenblatt eingetragene Analysedaten (beigefügt, Anlage 5);
- der Verlauf des Abbautests wird in einem Diagramm dargestellt, aus dem die ‚Lag‘-Phase (t_L), die Steigung und die Dauer (ab dem Ende der ‚Lag‘-Phase) bis zu einem Anteil von 50 % der durch die Oxidation des Prüfstoffes bewirkten endgültigen Sauerstoffzehrung (t_{50}) hervorgehen. Die ‚Lag‘-Phase kann aufgrund der grafischen Darstellung (in der beigefügten Abbildung) abgeschätzt werden oder einfach aufgrund des Zeitbedarfs 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 Prüfstoffes geringer ist als die Summe der BSB-Werte der getrennten Lösungen der beiden Stoffe.
44. Wegen der verhältnismäßig hohen Prüfkonzentrationen im Vergleich zu den meisten natürlichen Systemen (und entsprechend einem ungünstigen Verhältnis zwischen den Konzentrationen des Prüfstoffes 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 ein Beispiel 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 Prüfstoffes) 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 Infrarotspektrometrie 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.

Bei Verwendung der Persulfat-/UV-Methode (2) führen hohe Chloridkonzentrationen zu einer Verringerung der Oxidationseffizienz. Mit einem durch Zusatz von Quecksilber-(II)-nitrat modifizierten Oxidationsreagens kann diese Störung jedoch verhindert werden. Es wird empfohlen, dass zur Untersuchung der verschiedenen Typen chloridhaltiger Proben das maximal zulässige Probenvolumen verwendet wird. Hohe Salzkonzentrationen der mit der Verbrennungsmethode analysierten Proben können zur Bildung einer Salzsäure auf dem Katalysator und zu übermäßiger Korrosion des Verbrennungsrohrs führen. Daher sind die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen gemäß den Herstelleranweisungen (Handbuch) zu treffen.

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

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 Infrarotspektrometrie 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 1 000 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 Probentyp 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	a ₁					
		a ₂					
		mittlere C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		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)}					
	mittlere C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

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:

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

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

$$ThOD = \frac{16 \left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg O}_2/\text{mg Glukose}$$

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

$$ThOD = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg O}_2/\text{mg Stoff}$$

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

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

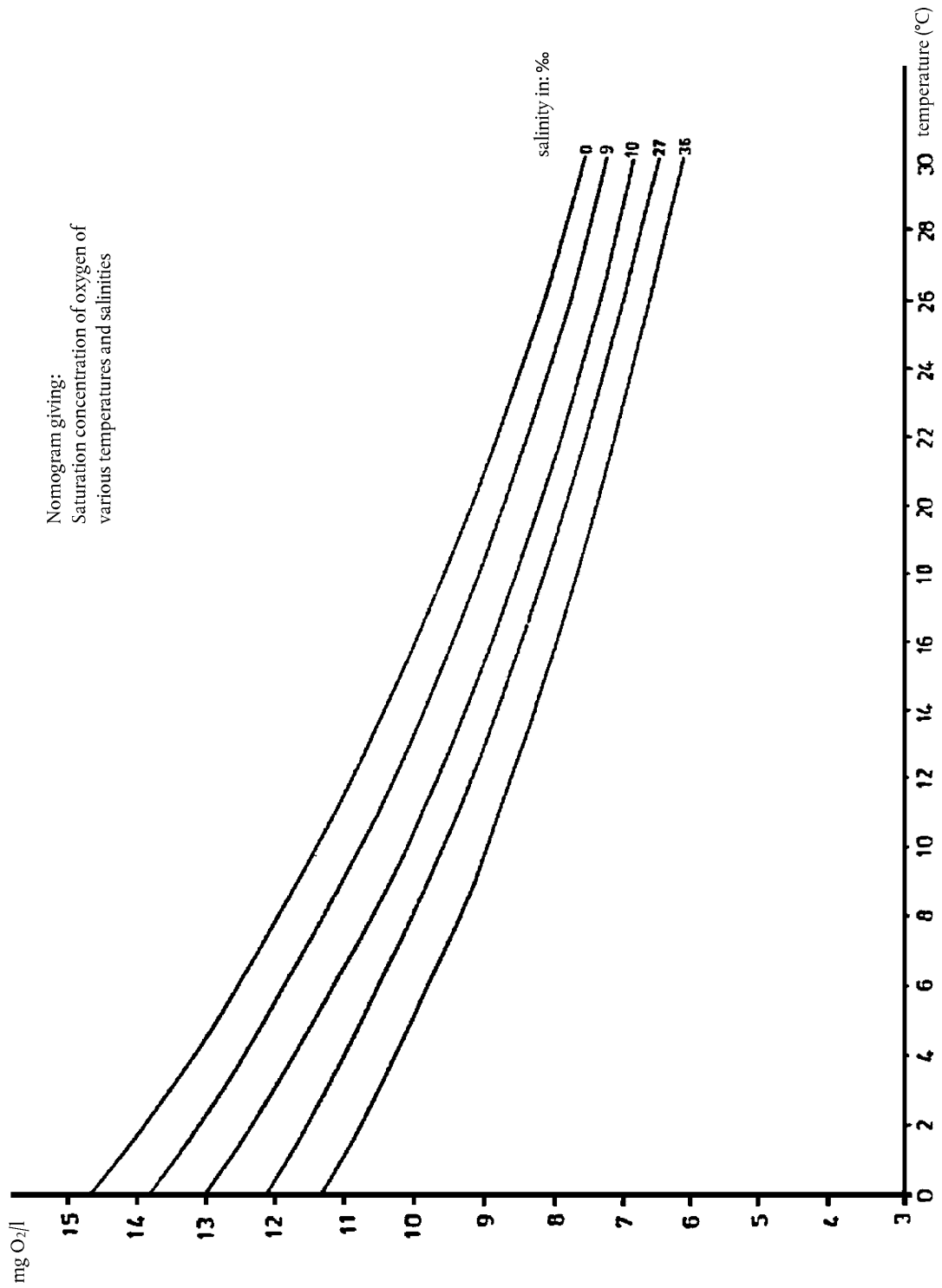
$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o \right]}{MW}$$

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

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

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg O}_2/\text{mg Stoff}$$

Anlage 4



Anlage 5

Biologischer Abbau in Meerwasser

GESCHLOSSENER FLASCHEN-TEST

DATENBLATT

1. **LABOR:**2. **DATUM DES PRÜFBEGINNS:**3. **PRÜFSTOFF:**

Name:

Konzentration der Stammlösung: mg/l

Ausgangskonz. in Meerwassermedium: mg/l

ThSB oder CSB: mg O₂/mg Prüfstoff4. **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/l6. **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	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

	Kolben Nr.		mg O ₂ /l nach n Tagen			
			0	5	15	28
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) (l)			
$\%D = \frac{(m_b - m_t) (l)}{\text{Testsubstanz (mg/l)} \times \text{ThOD}} \times 100$			

(l) 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 FAULSCHLAMM:
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 (Prüfmethode C.4, C.9, C.10 und C.11 (1) und OECD-Prüfrichtlinie TG 302C (2)). Die Ergebnisse dieser Tests konnten erfolgreich zur Vorhersage des Verhaltens von Chemikalien in der aeroben Umwelt, insbesondere in den aeroben Stufen der Abwasserbehandlung, verwendet werden. Verschiedene Anteile von wasserunlöslichen Chemikalien, sowie jene Stoffanteile, die an Feststoffe gebunden sind, werden aerob umgewandelt. Der größere Anteil dieser Stoffe wird jedoch an den primär ausgefallenen Schlamm gebunden, der in den Absetzbecken vom Rohabwasser getrennt wird, bevor der abgesetzte Schlamm bzw. der Überstand aerob umgewandelt wird. Der Schlamm, der einige der löslichen Stoffe im Porenwasser enthält, wird dann zur anaeroben Umwandlung in die beheizten Faulbehälter geführt. Bislang gibt es in dieser Reihe noch keine Tests zur Bewertung der anaeroben biologischen Abbaubarkeit in anaeroben Faulbehältern; der hier beschriebene Test soll diese Lücke schließen. Der Test ist nicht zwangsläufig auf andere, anoxische Umweltkompartimente übertragbar.
2. Respirometrische Verfahren zur Messung der Mengen an produzierten Gasen — vorwiegend Methan (CH_4) und Kohlendioxid (CO_2) unter anaeroben Bedingungen — wurden erfolgreich zur Bewertung der anaeroben biologischen Abbaubarkeit eingesetzt. Birch et al. (3) haben diese Verfahren untersucht und bezeichnen 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 (DIC = *Dissolved Inorganic Carbon*) im flüssigen Überstand 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 beschreibt ein Screeningverfahren 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 Prüfstoffes verwendet wird und da die Prüfdauer in der Regel nicht mit der Retentionszeit in anaeroben Faulbehältern übereinstimmt, decken sich die Prüfbedingungen nicht unbedingt mit den Bedingungen in anaeroben Faulbehältern; außerdem kann die Prüfung nicht zur Beurteilung der anaeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe unter verschiedenen Umweltbedingungen 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 Prognosen aufgrund der Ergebnisse dieser Prüfung sind weniger zuverlässig als beim aeroben biologischen Abbau, denn die Hinweise, die über das Verhalten von Prüfstoffen in Tests zur ‚leichten‘ biologischen Abbaubarkeit und in Simulationstests sowie in der aeroben Umwelt gewonnen wurden, reichen aus, um von einem Zusammenhang ausgehen zu können. Für die anaeroben Umweltbedingungen 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 Prüfstoffes im Vergleich zur Biomasse in diesen Prüfungen kann davon ausgegangen werden, dass ein Stoff, der als aerob abbaubar eingestuft wird, eher auch in einem anaeroben Faulbehälter abgebaut wird. Wenn Stoffe im Test nicht zu Gas umgewandelt werden, sind diese nicht zwangsläufig auch bei realistischeren Umweltbedingungen (Konzentration Stoff: Biomasse) persistent. 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 Prüfstoffes kann auch ihr Verschwinden überwacht werden (siehe Nummern 6, 30, 44 und 53).

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

4. Gewaschener Faulschlamm⁽¹⁾ mit niedrigen (< 10 mg/l) Konzentrationen an anorganischem Kohlenstoff (IC, inorganic carbon) wird etwa zehnfach auf eine Feststoffkonzentration von insgesamt 1-3 g/l verdünnt und bis

⁽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).

zu 60 Tage bei $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ 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 Gasraum (headspace) der Prüfgefäße wird gemessen. Das erzeugte CO_2 wird unter Prüfbedingungen zu einem erheblichen Teil in der flüssigen Phase gelöst oder in Karbonat oder Hydrogencarbonat umgewandelt. Dieser Anteil an anorganischem Kohlenstoff wird am Ende der Prüfung 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 Prozentanteil des gemessenen oder berechneten Anteils des als Prüfstoff hinzugefügten Kohlenstoffs ermittelt. Der Verlauf des biologischen Abbaus kann durch Zwischenmessungen der Gasproduktion allein gemessen werden. Außerdem kann durch spezifische Analysen zu Beginn und am Ende der Prüfung der biologische Primärabbau ermittelt werden.

INFORMATIONEN ZUM PRÜFSTOFF

7. Die Reinheit, Wasserlöslichkeit, Flüchtigkeit und das Adsorptionsverhalten des Prüfstoffs müssen bekannt sein, damit die Ergebnisse korrekt ausgewertet werden können. Der Gehalt des Prüfstoffs an organischem Kohlenstoff (% w/w) muss entweder aufgrund ihrer chemischen Struktur oder aus Messungen bekannt sein. Bei flüchtigen Prüfstoffen bietet die gemessene oder berechnete Henry-Konstante einen Anhaltspunkt dafür, ob die Prüfung geeignet ist. Angaben über die Toxizität des Prüfstoffs gegenüber anaeroben Bakterien sind wichtig für die Auswahl einer geeigneten Prüfkonzentration und die Interpretation der Ergebnisse bei einem geringen 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 eine Methode mit exakter Dosierung verwendet wird (siehe z. B. ISO 10634 (13)). Generell ist bei flüchtigen Stoffen im Einzelfall zu entscheiden. Beispielsweise müssen besondere Schritte eingeleitet werden, damit während der Prüfung kein Gas freigesetzt wird.

REFERENZSTOFFE

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

REPRODUZIERBARKEIT VON PRÜFERGEBNISSEN

10. In einem internationalen Ringtest (14) wurde eine gute Reproduzierbarkeit bei den Messungen des Gasdrucks in drei Replikaten 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. n_1	Mittlerer Abbau (bezogen auf die Gesamtdaten) (%)	Relative Standardabweichung (bezogen auf die Gesamtdaten) (%)	Valide Daten n_2	Mittlerer Abbau (aus validen Daten) (%)	Relative Standardabweichung (aus validen Daten) (%)	Daten > 60 % Abbau in validen Tests n_3
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 n_2

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 % weggelassen werden (wobei erstere auf suboptimale Bedingungen und letztere auf unbekannte Gründe zurückgeführt wurden), reduzierten sich die Variationskoeffizienten auf 26 % bzw. 23 %. Die Anteile ‚valider‘ Werte (Abbau von mindestens 60 %) betragen 70 % bei Palmitinsäure und 83 % bei Polyethylenglykol 400. Der prozentuale biologische Abbau, der aus dem Anteil an gelöstem anorganischem Kohlenstoff (DIC) ermittelt wurde, war verhältnismäßig gering, aber variabel. Bei Palmitinsäure bewegte der Wert sich zwischen 0-35 % (Mittelwert 12 %) bei einem Variationskoeffizienten von 92 %; für Polyethylenglykol 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 — funktionsicher 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; das Volumen des Gasraums (Headspace) muss etwa 10-30 % des Gesamtvolumens betragen. Wenn regelmäßig Biogas freigesetzt wird, sind ca. 10 % Gasraum (Headspace) 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 Serumseptum ⁽²⁾ und gepressten Aluminiumringen zu empfehlen;
- c. Druckmesser ⁽³⁾, 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;

⁽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 den Bedingungen dieses Versuchs mit einer Nadel durchstoßen werden.

⁽³⁾ 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.

Hinweis — Die Druckwerte werden direkt zur Berechnung des erzeugten Kohlenstoffs im Gasraum 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! — Die Mikroinjektionsspritzen 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. Präzisionsspritzen für Gas- und Flüssigproben;
- f. Magnetrührer und Rührfische (optional);
- g. Gasdichter Handschuhkasten (Glove Box) (empfohlen).

Reagenzien

14. In der gesamten Prüfung sind ausschließlich Reagenzien in Analysequalität zu verwenden.

Wasser

15. Destilliertes oder deionisiertes 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:

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.
Deoxygeniertes 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 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ /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 deoxygeniertem 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 deoxygeniertem 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 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	1 mg
Kobaltchlorid-Hexahydrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	100 mg
Nickelchlorid-Hexahydrat ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	10 mg
Dinatriumselenit (Na_2SeO_3)	5 mg
Deoxygeniertes Wasser wird hinzugegeben (Nummer 15).	auf 1 l

Prüfstoff

1. 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 deoxygeniert 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 Prüfsubstanzen 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 deoxygeniertem 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 Prüfkonzentration zu ermitteln, werden der Prüfstoff und der Referenzprüfstoff 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 charakterisiert 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 Hintergrundgasproduktion und 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 in der Prüfung 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 3 000 g); anschließend wird der Überstand entsorgt. Das entstandene Pellet wird in deoxygeniertem Medium (Nummern 16 und 17) suspendiert. Danach wird die Suspension nochmals zentrifugiert und wiederum die überstehende Flüssigkeit abgossen. 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 Faulschlammes) 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 einer Prüfung können für mehrere Prüfstoffe dieselben Blindkontrollen verwendet werden, sofern die Gasraumvolumina einheitlich sind.

28. Das verdünnte Inokulum wird hergestellt und in die Gefäße gegeben (z.B. mit einer Pipette mit großer Öffnung). Aliquote des gut gemischten Inokulums (Nummer 25) werden hinzugegeben, bis in allen Gefäßen die gleiche Konzentration an Gesamtfeststoffen besteht (1-3 g/l). Stammlösungen des Prüfstoffes und des Referenzstoffes werden erforderlichenfalls auf einen pH-Wert von $7 \pm 0,2$ eingestellt und hinzugefügt. Die Prüfsubstanz und der Referenzstoff sind in der jeweils geeigneten Weise hinzuzugeben (Nummer 19).
29. Die Prüfkonzentration an organischem Kohlenstoff sollte üblicherweise zwischen 20 und 100 mg/l (Nummer 4) liegen. Wenn der Prüfstoff toxisch ist, muss die Prüfkonzentration auf 20 mg C/l reduziert werden; diese Konzentration kann noch unterschritten werden, wenn mit speziellen Analysen nur der primäre biologische Abbau ermittelt werden soll. Es gilt zu beachten, dass es bei niedrigeren Prüfkonzentrationen zu größeren Unterschieden zwischen den Prüfergebnissen kommt.
30. In die Gefäße mit den Blindkontrollen ist anstelle einer Stammlösung, Suspension oder Emulsion eine entsprechende Menge der zur Dosierung des Prüfstoffes 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 Replik 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 Prüfstoffes und des Referenzstoffes bereits eingestellt wurde (siehe Nummern 19 und 20). Wenn der biologische Primärabbau gemessen werden soll, ist eine geeignete Probe aus dem Gefäß zur pH-Kontrolle oder aus einem zusätzlichen Prüfgefäß zu entnehmen; die Konzentration des Prüfstoffes 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 Gasraums 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 Klärschlamm (Nummer 25) und — nach Bedarf — deoxygeniertes 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 die Gleichgewichtseinstellung zu ermöglichen. Um die Freisetzung von überschüssigem Gas in die Umgebungsluft zu ermöglichen, 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 Gasraum 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 Untersuchungsverfahren 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 Gasraums) 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 Umgebungsluft freigesetzt werden. Alternativ wird der Gasdruck erst am Ende der Prüfung gemessen, um die Menge des erzeugten Biogases zu ermitteln.
35. Zwischenmessungen des Gasdrucks sind zu empfehlen, da ein Druckanstieg einen Anhaltspunkt dafür bietet, wann die Prüfung beendet werden kann; außerdem kann die Kinetik der Prüfung überwacht werden (siehe Nummer 6).
36. Normalerweise wird die Prüfung 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 der Prüfung 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 Faulschlamm 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 inakzeptablen 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 gedichteten Probengefäß ohne Gasraum 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 Gasraum 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 wird gegenüber der Entnahme sämtlicher Proben aus einem einzigen Gefäß bevorzugt. 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, ohne das Ablassen von überschüssigem Gas, wie im Folgenden beschrieben vorzunehmen:
 - 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 Gasraum (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 der Prüfung aus den Gefäßen mit dem Prüfstoff eine geeignete Menge der Probe für spezifische Analysen entnommen. Dadurch ändern sich die Volumina des Gasraums (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 mbar = 1 h Pa = 10^2 Pa; 1 Pa = 1 N/m²), das Volumen in Litern und die Temperatur in Grad Celsius gemessen.

Kohlstoff im Gasraum

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. N₂O) in erheblichen Mengen entsteht, ist die Formel [1] entsprechend abzuändern, um mögliche Effekte der entstehenden Gase abzubilden.

44. Nach den Gasgesetzen kann n ausgedrückt werden als:

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

Dabei sind:

p = Gasdruck (Pascal);

V = Gasvolumen (m³);

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

T = Inkubationstemperatur (Kelvin).

Durch Kombination der Gleichungen [1] und [2] und durch Rationalmachen ergibt sich für die Berechnung der Gasproduktion der Blindkontrolle:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0,1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Gleichung [3]}$$

Dabei sind:

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

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

V_h = Gasraumvolumen (l);

0,1 = Umrechnung Newton/m² in Millibar und m³ 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 Gasraum 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 Gasraum (m_h) mit der folgenden Gleichung [5] ermittelt werden:

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

Durch Rationalmachen wird die Gasproduktion in der Blindkontrolle berechnet

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

Dabei sind:

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

ΔV = Mittelwert des Unterschieds zwischen dem Volumen des im Gasraum 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 der Prüfung 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 Gasraum

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 ermittelt, die sich aus dem hinzugegebenen Prüfstoff ableitet:

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

Dabei sind:

m_v = Masse des Kohlenstoffs im Prüfstoff (mg);

C_c = Konzentration des 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, ermittelt anhand des Gases im Gasraum, wird mit der folgenden Gleichung [10] berechnet; mit Gleichung [11] wird die prozentuale Gesamtsumme für den biologischen 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 anhand des Gases im Gasraum (%);

D_t = Gesamtsumme 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 der Inkubationsdauer (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} = ‚scheinbare‘ Ausgangskonzentration des Prüfstoffs in den Blindkontrollen (mg/l);

S_{eb} = ‚scheinbare‘ 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 Referenzstoffes ein Plateau erreicht, das einem biologischen Abbau von mehr als 60 % entspricht (!).
52. Wenn der pH-Wert am Ende der Prüfung nicht mehr im Bereich 7 ± 1 liegt und kein ausreichender biologischer Abbau erfolgt ist, wird die Pufferkapazität des Mediums erhöht und der Test wiederholt.

(!) Die Bewertung ist zu wiederholen, wenn adsorptive und nicht lösliche Referenzstoffe verwendet werden.

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:

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

Prüfbedingungen:

- Volumina der verdünnten Flüssigkeit (V_l) und des Gasraums (V_g) im Gefäß;
- Beschreibung der Prüfgefäße, der wesentlichen Merkmale der Biogasmessung (z. B. Druckmessertyp) und des Geräts zur Analyse des Gehalts an anorganischem Kohlenstoff;
- Applikation der Prüf- und der Referenzsubstanz in das Prüfsystem: verwendete Prüfkonzentration und Verwendung von Lösungsmitteln;
- nähere Angaben zum verwendeten Inokulum: Name der Kläranlage, Angaben zur Herkunft des behandelten Abwassers (Betriebstemperatur, Verweilzeit des Abwassers in der Kläranlage, vorwiegend häusliche Abwässer usw.), Konzentration, erforderliche Belege für diese Angaben und Informationen zu Vorbehandlungen des Inokulums (Vorfäulung, 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 Gasraum und für die Flüssigkeit);
- statistische Aufbereitung der Daten, Prüfdauer 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.

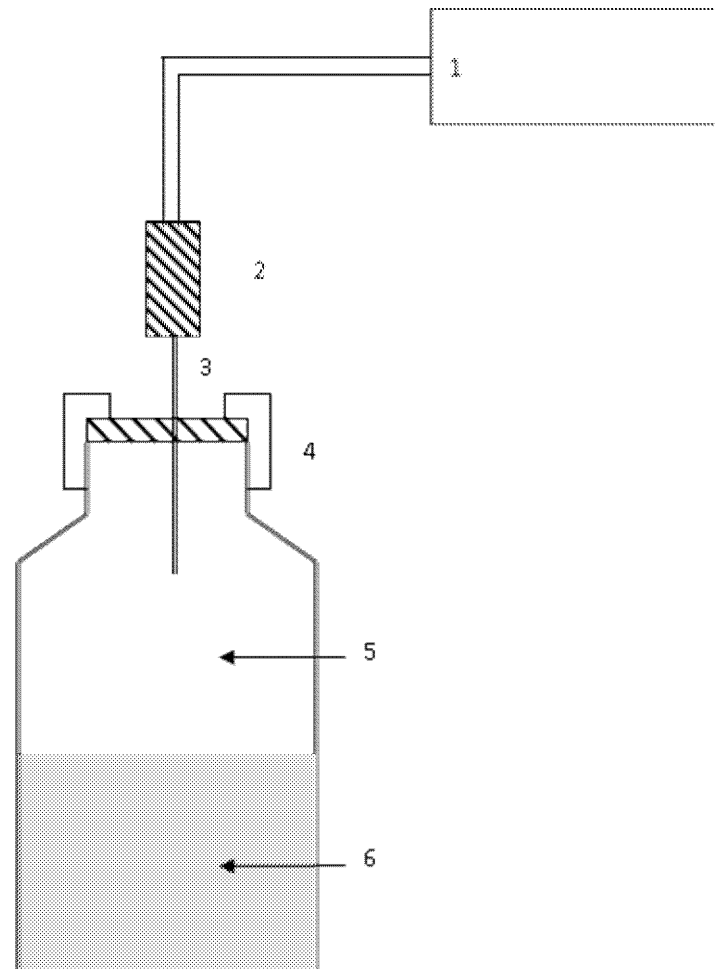
LITERATUR

- (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 — Gasraum (Headspace) (V_h)
- 6 — Faulschlamm-Inokulum, Volumen der Flüssigkeit (V_l)

Inkubation der PrüfgefäÙe bei einer Temperatur von $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$

—

Anlage 2

Umrechnung der Messwerte des Druckmessers

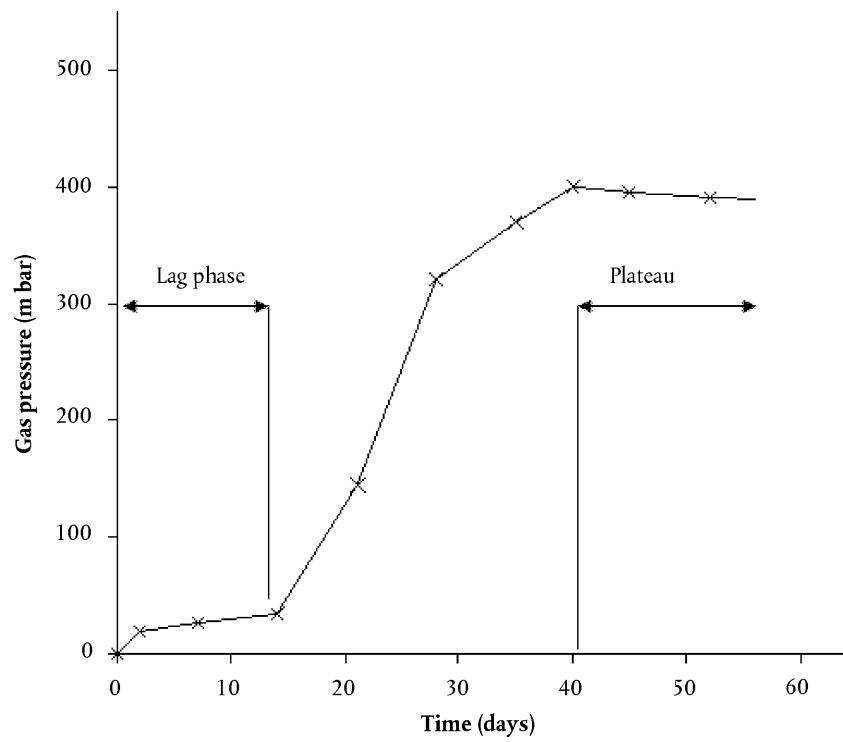
Anhand einer Standardkurve, die nach Injektion bekannter Luftvolumina bei einer Temperatur von mindestens $35 \pm 2 \text{ °C}$ in Serumflaschen mit einem Wasseranteil entsprechend dem Reaktionsgemisch (V_R) erstellt wurde, können die angezeigten Druckwerte Gasvolumina zugeordnet werden:

- Auf $35 \pm 2 \text{ °C}$ temperierte Wasserliquote 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 °C gestellt;
- der Druckmesser wird eingeschaltet, und nach der Stabilisierung der Anzeige wird das Gerät auf null gestellt;
- die Spritzenadel 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 $35 \pm 2 \text{ °C}$ 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 zur Prüfung der anaeroben biologischen Abbaubarkeit (Beispiel) — Datenblatt zum Prüfstoff

Labor: Prüfstoff: Test Nr.:
 Prüftemperatur: (°C): Volumen des Gasraums (V_h): (l) Volumen der Flüssigkeit (V_l): (l)
 Kohlenstoff im Prüfstoff C_{Cv}: (mg/l) m_v (l): (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)	Δp (Netto) Kumulativ (mbar)	mh Kohlenstoff im Gas- raum, C ⁽²⁾ (mg)	Dh Biologi- scher Ab- bau ⁽³⁾ (%)
	C _{IC, 1} Prüfung (mg)	C _{IC, 2} Prüfung (mg)	C _{IC, 3} Prüfung (mg)	C _{IC} Mittelwert Prüfung (mg)	C _{IC, 4} Blindkon- trolle (mg)	C _{IC, 5} Blindkon- trolle (mg)	C _{IC, 6} Blindkon- trolle (mg)	C _{IC} Mittelwert Blindkon- trolle (mg)	C _{IC, net} Test — Blind- kontrolle Mittelwert (mg)	m _l Flüssiger Kohlen- stoff ⁽⁴⁾ (mg)	MT Kohlenstoff insgesamt ⁽⁵⁾ (mg)	D _t Biologi- scher Ab- bau ⁽⁶⁾ (%)
Anorgani- scher Koh- lenstoff (Ende)												
pH-Wert (Ende)												

(1) Kohlenstoff im Prüfgefäß, m_v (mg): m_v = C_{Cv} × V_l
 (2) Kohlenstoff im Gasraum, m_h (mg) bei normaler Inkubationstemperatur (35 °C): m_h = 0,468 Δp × V_h
 (3) Biologischer Abbau berechnet aus dem Gas im Gasraum, D_h (%): D_h = (m_h × 100) / m_v
 (4) Kohlenstoff in der Flüssigkeit, m_l (mg): m_l = C_{IC,net} × V_l
 (5) Gasförmiger Kohlenstoff insgesamt, m_t (mg): m_t = m_h + m_l
 (6) Biologischer Abbau insgesamt, D_t (%): D_t = (m_t × 100) / m_v

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

Tag	p_1 (Ref.) (mbar)	p_2 (Ref.) (mbar)	p_3 (Ref.) (mbar)	p (Ref.) Mittelwert (mbar)	p_4 (Inhib.) (mbar)	p_5 (Inhib.) (mbar)	p_6 (Inhib.) (mbar)	p (Inhib.) Mittelwert (mbar)	p (Ref.) Ref. — Blind (mbar)	Δp (Ref.) Kumulativ (mbar)	MH Kohlenstoff im Gas- raum, C (2) (mg)	D_h Biologi- scher Ab- bau (3) (%)
	$C_{IC,1}$ Ref. (mg)	$C_{IC,2}$ Ref. (mg)	$C_{IC,3}$ Ref. (mg)	C_{IC} Mittelwerte Ref. (mg)	$C_{IC,4}$ Inhib. (mg)	$C_{IC,5}$ Inhib. (mg)	$C_{IC,6}$ Inhib. (mg)	C_{IC} Mittelwerte Inhib. (mg)	$C_{IC,net}$ Ref. — In- hib. (mg)	m_l Flüssiger Kohlen- stoff (4) (mg)	MT Kohlenstoff insgesamt (5) (mg)	D_t Biologi- scher Ab- bau (6) (%)
Anorgani- scher Koh- lenstoff (Ende)												
pH-Wert (Ende)												

(1) Kohlenstoff im Prüfgefäß, m_v (mg): $m_v = C_{c,v} \times V_l$

(2) Kohlenstoff im Gasraum, 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 Gasraum, D_h (%): $D_h = (m_h \times 100) / m_v$

(4) Kohlenstoff in der Flüssigkeit, m_l (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

(5) Gasförmiger Kohlenstoff insgesamt, m_t (mg): $m_t = m_h + m_l$

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

C.44. VERSICKERUNG 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 → Klärschlamm → Boden oder Luft → feuchte/trockene Deposition) in den Boden gelangen. Für eine Bewertung des mit diesen Chemikalien verbundenen Risikos müssen das Potenzial der Chemikalien zur Transformation und zur Verlagerung in tiefere Bodenschichten sowie eventuell das Eindringen in das Grundwasser ermittelt werden.
2. Das Versickerungspotenzial von Chemikalien im 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 Adsorptionsverhaltens und des Versickerungspotenzials (3)(4)(5).
3. Das in dieser Prüfmethode beschriebene Verfahren beruht auf der Bodensäulenchromatographie mit gestörten Böden (zur Begriffsbestimmung siehe Anlage 1). Das Versickerungspotenzial (i) des Prüfstoﬀs 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. In einem OECD-Workshop zur Auswahl von Böden/Sedimenten, der 1995 in Belgirate, Italien (12) stattfand, wurde eine 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 Versickerungstests 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 Regenlösung (Begriffsbestimmung siehe Anlage 1) gesättigt und äquilibriert bis ein Gleichgewicht 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 künstlich beregnet, und das Sickerwasser wird aufgefangen. Nach dem Versickerungsprozess wird der Boden aus den Säulen entnommen und je nach den zu untersuchenden Merkmalen in eine geeignete Anzahl an Bodensegmenten geteilt. Diese Bodensegmente 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 Versickerungsverhaltens in Bodensäulen können nicht markierte oder radioaktiv markierte Prüfchemikalien verwendet werden. Um das Versickerungsverhalten von Transformationsprodukten (gealterten Rückständen des Prüfstoﬀs) 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. Die meisten Chemikalien sollten in reiner Form appliziert werden. Nur bei Wirkstoffen von Pflanzenschutzmitteln können die fertigen Produkte zur Untersuchung des Versickerungsverhaltens des Ausgangsprüfstoﬀs verwendet werden. Dies ist besonders dann empfehlenswert, wenn das jeweilige Produkt die Freisetzungsrates des zu untersuchenden Prüfstoﬀs beeinflussen kann (z. B. Granulate oder Formulierungen zur kontrollierten Freisetzung). Bezüglich der für die betreffende Formulierung spezifischen Anforderungen an das jeweilige Prüfprotokoll kann es hilfreich sein, sich vor Durchführung einer Prüfung bei der zuständigen Behörde zu erkundigen. Bei Versickerungstests mit gealterten Rückständen ist der Ausgangsprüfstoﬀ in reiner Form zu verwenden.

(1) Säulenversickerungsstudien von Pflanzenschutzmitteln können Aufschluss über die Mobilität einer Prüfchemikalie und seine Transformationsprodukte geben und Batch-Adsorptionsstudien ergänzen.

9. Vor der Durchführung von Versickerungstests 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 Aufwandmenge 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 ihrer wesentlichen Transformationsprodukte (im Allgemeinen mindestens alle Transformationsprodukte, die in Konzentrationen von ≥ 10 % der applizierten Aufwandmenge in Abbaustudien nachgewiesen wurden, 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 Versickerungsverhalten (z. B. Atrazin oder Monuron) verwendet, von denen aus praktischen Erfahrungen bekannt ist, dass sie in mäßigem Umfang versickern (1)(8)(11). Eine nicht sorbierende und nicht abbaubare polare Referenzchemikalie (z. B. Tritium, Bromid, Fluoreszein oder Eosin) zur Nachverfolgung des Wassertransports 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 Versickerungstest ist die Summe der Prozentanteile der Prüfchemikalie, die nach der Versickerung in den Bodensegmenten und im Sickerwasser der Säulen nachgewiesen wird, als Wiederfindungsrate zu betrachten. Die Wiederfindungsraten müssen bei radioaktiv markierten Substanzen bei 90-110 % (11) und bei nicht markierten Substanzen bei 70-110 % liegen (8).

Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit der Analyseverfahren

16. Die Wiederholbarkeit der Analyseverfahren 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 die Prüfung werden Bodensäulen (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 der künstlichen Beregnung in die Bodensäulen können Kolbenpumpen, peristaltische Pumpen, Brauseköpfe, Mariottesche Flaschen oder einfache Tropftrichter verwendet werden.

Laborausrüstung und Chemikalien

21. Es wird die übliche Laborausrüstung insbesondere mit folgenden Bestandteilen benötigt:
- (1) Analysegeräte (u. a. GLC-, HPLC- und TLC-Ausrüstung) 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 CaCl_2 -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 fertige Formulierung (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 Versickerungsprozesses 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 formulierten Produkte 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 applizierten Dosis in den einzelnen Segmenten nachweisen zu können. Bei Wirkstoffen von Pflanzenschutzmitteln kann die applizierte Dosis auf Basis der empfohlenen maximalen Aufwandmenge (Einzelaapplikation) erfolgen und sowohl für den Wirkstoff als auch für gealterte Wirkstoffe sollte sich die applizierte Menge auf die Oberfläche der verwendeten Bodensäule beziehen ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Die zu applizierende 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]

π = 3,14.

Referenzchemikalie

25. In den Versickerungstests ist eine Referenzchemikalie zu verwenden (siehe Nummer 12). Die Referenzchemikalie ist in ähnlicher Weise wie die Prüfchemikalie auf die Oberfläche der Bodensäule aufzubringen und in ausreichender Menge, um eine angemessene Nachweisgenauigkeit entweder als interner Standard zusammen mit der Prüfchemikalie in derselben Bodensäule oder separat in einer eigenen Bodensäule zu gewährleisten. Vorzugsweise werden beide Chemikalien gemeinsam in derselben Säule zur Versickerung gebracht, außer wenn beide Chemikalien ähnlich markiert wurden.

Böden

Auswahl der Böden

26. Für die Versickerungsuntersuchungen 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 Versickerungsstudien. 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 Versickerungsstudien

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 Zulassung von Pflanzenschutzmitteln).

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 Versickerungsstudien (siehe vorstehende Tabelle 1) beschriebenen Böden. Dies gilt auch dann, wenn die betreffenden Kriterien nicht genau erfüllt werden.
28. Bei Versickerungstests 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 Versickerungstest mit den gealterten Rückständen verwendet werden. Angaben zu weiteren Eigenschaften der Böden (z. B. Klassifizierung, Tonmineralogie, spezifische Oberfläche) können bei der Interpretation der Prüfergebnisse 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 und lufttrocken aufbewahrt 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 Historie der Feldstandorte, an denen die Prüfböden 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 Versickerungsstudien nicht verwendet werden.

Prüfbedingungen

32. Während der Prüfung werden die Versickerungssäulen 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 Beregnungsmenge entspricht einem Niederschlag von 251 ml bei einer Wassersäule mit einem Innendurchmesser von 4 cm. Wenn für die Prüfung benötigt, kann die künstliche Beregnung modifiziert und die Dauer der Beregnung erhöht werden.

Prüfverfahren

Versickerung mit der Ausgangsprüfchemikalie

34. Mindestens zwei Bodensäulen werden bis zu einer Höhe von etwa 30 cm mit unbehandeltem, luftgetrocknetem und (mit einer Maschenweite von < 2 mm) gesiebtetem 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 Bodensäulen 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.

⁽¹⁾ Dies entspricht einem äußerst starken Niederschlag. Der durchschnittliche jährliche Niederschlag beträgt beispielsweise in Mitteleuropa 800-1 000 mm.

⁽²⁾ Gestörte Böden haben etwa folgende Schüttdichten (Beispiele):
Sandboden $1,66 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
lehmiger Sandboden $1,58 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
Lehmboden $1,17 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$
Schluffboden $1,11 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$

35. Nach dem Packen werden die Bodensäulen mit künstlichem Regen (0,01 M CaCl₂) von unten nach oben gesättigt, um in den Bodenporen vorhandene Luft durch Wasser zu verdrängen. Anschließend wird gewartet, bis die Säulen im Gleichgewicht sind 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 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 der Versickerung und dem Abtropfen der Säulen werden die Bodensäulen je nach den gemäß der Studie 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 ≥ 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 der Versickerung wird der gealterte Boden auf die Prüfchemikalie und ihre Transformationsprodukte analysiert.
40. Die Versickerungssäulen 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 vorgefeuchtet, 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 Versickerung wird vorgenommen, wie in Nummer 37 beschrieben.
43. Nach der Versickerung werden die Bodensegmente und das Sickerwasser auf die Prüfchemikalie, ihre Transformationsprodukte und nicht extrahierte Radioaktivität untersucht, wie in Nummer 38 erläutert. Um zu ermitteln, welcher Anteil der gealterten Rückstände in der obersten 2 cm starken Bodenschicht nach der Versickerung noch vorhanden ist, wird dieses Segment getrennt analysiert.

⁽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 Haupttransformationsprodukte zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf einer Abbaustudie entstehen. In diesen Fällen müssen unter Umständen Versickerungsstudien mit gealterten Rückständen unterschiedlicher Altersstadien durchgeführt werden.

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 in 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 Versickerungstests eine Referenzchemikalie verwendet wurde, kann die Versickerung 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 Versickerungsdaten verschiedener Chemikalien bei unterschiedlichen Bodentypen. Anlage 3 enthält Beispiele für RMF-Werte verschiedener Wirkstoffe in Pflanzenschutzmitteln.
46. Ungefähre Werte für K_{oc} (auf organischen Kohlenstoff normalisierter Adsorptionskoeffizient) und K_{om} (auf organische Bestandteile normalisierter Verteilungskoeffizient) können ebenfalls aus den Ergebnissen des Versickerungstests abgeleitet werden; Ausgangsparameter sind die durchschnittliche Versickerungsstrecke 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 während der Versickerung eher nicht gesättigt war.

Interpretation der Ergebnisse

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

Prüfbericht

48. Der Prüfbericht enthält die folgenden Angaben:

Prüfchemikalie und Referenzchemikalie (sofern verwendet):

- Trivialname, 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 für Böden, die für die Alterung der Prüfchemikalie verwendet wurden);
- Dauer der Lagerung des Bodens und Lagerbedingungen.

Prüfbedingungen:

- Daten der Durchführung der Prüfungen;
- Länge und Durchmesser der Versickerungssäulen;
- 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;
- Versickerungsstrecke 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. Keeney, 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. Keeney, 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 Versickerungsstrecke (*leaching distance*): [normaler Versickerungstest] unterste Schicht des Bodensegments, in der die Summe des wiedergefundenen Stoffs 50 % der insgesamt wiedergefundenen Prüfchemikalie entspricht, oder: [Versickerungstest mit gealterten Rückständen] unterste Schicht des Bodensegments, in der die Summe der wiedergefundenen Chemikalie 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).

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

Versickerungsstrecke: Unterstes Bodensegment, in dem nach der Versickerung 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 einer Chemikalie bezeichnet, unter der die Chemikalie nicht mehr von analytischen Artefakten unterschieden werden kann. Als Quantifizierungsgrenze (LOQ) gilt die Konzentration einer Chemikalie, unter der die Konzentration nicht mehr mit annehmbarer Genauigkeit bestimmt werden kann.

RMF, relativer Mobilitätsfaktor: (Versickerungsstrecke der Prüfchemikalie (cm)) / (Versickerungsstrecke 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;

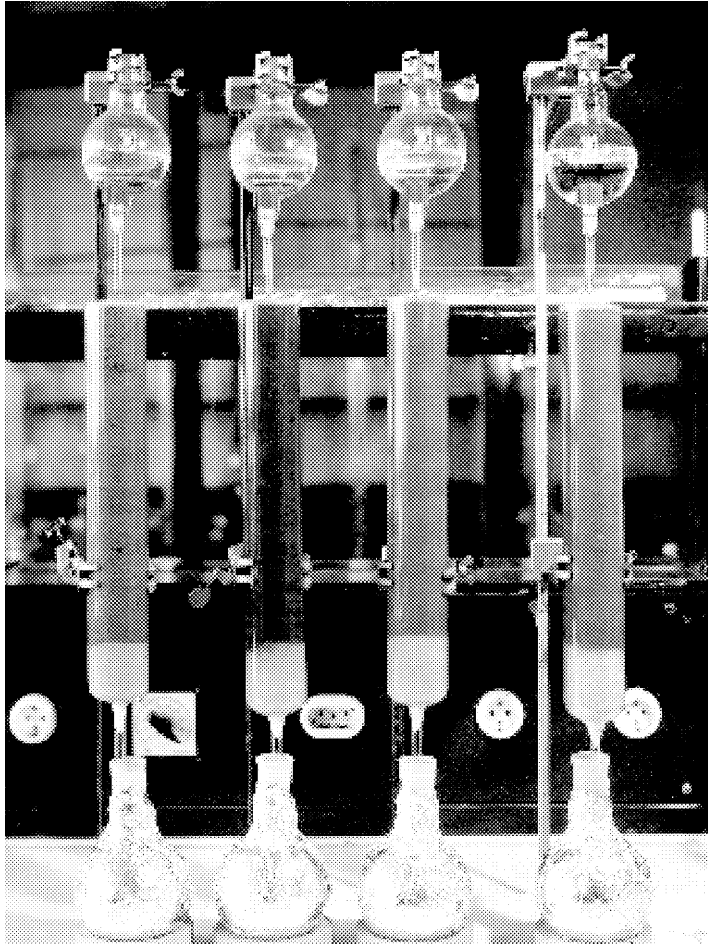
— gestört, d. h. so, wie die Böden gewöhnlich in bewirtschafteten Flächen vorkommen oder wie sie zur Verwendung bei dieser Prüfmethode durch Graben entnommen werden (2).

(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 Versickerungssäulen 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)

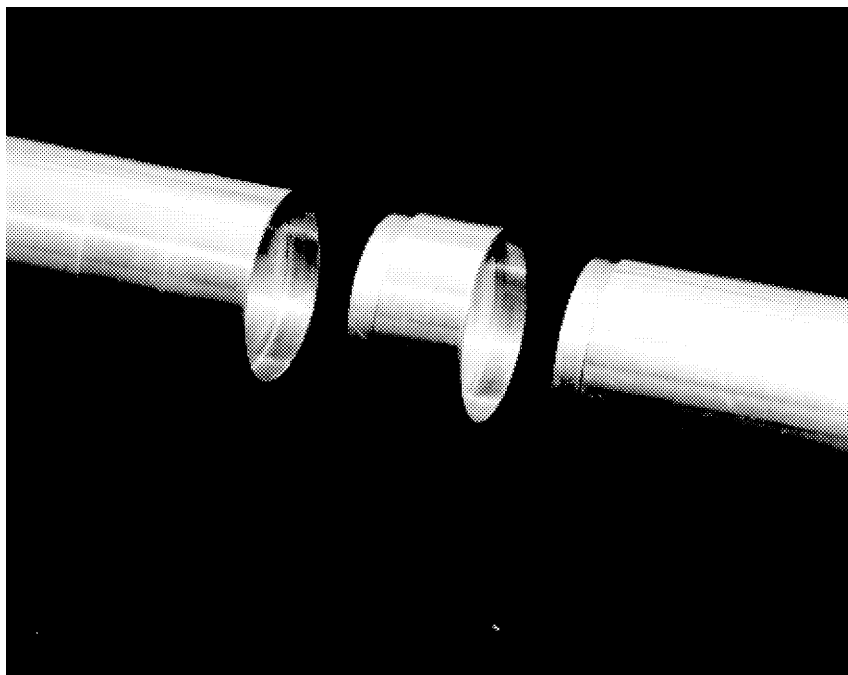
← Quarzsandschicht

← 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 Chemikalien 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
w 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):

$$RMF = \frac{\text{Versickerungsstrecke der Prüfchemikalie (cm)}}{\text{Versickerungsstrecke der Referenzchemikalie (cm)}}$$

(**) 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 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 Salzwasser 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 abgedeckt 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 (Eluat) aus dem Wasser, in die das behandelte Holz untergetaucht wurde; die Probenahme erfolgt nach zunehmenden Expositionsintervallen. Die Menge der Emissionen im Eluat hängt von der Oberfläche des Holzes und von der Expositionsdauer ab; zu ermitteln ist die Emissionsrate in $\text{mg}/\text{m}^2/\text{Tag}$. 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 Auswaschverhalten der Holzoberfläche mit Süßwasser wird hinsichtlich der Art und des Umfangs der Auswaschung nicht als gleichwertig mit dem Auswaschverhalten 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 zur Konditionierung vor Testbeginn sind zu spezifizieren.
7. Die verwendeten Holzproben müssen für die verwendeten Erzeugnisse repräsentativ sein (bezüglich der jeweiligen Art, der Dichte und sonstiger Merkmale).
8. Die Prüfung kann in Verbindung mit einer Druckimprägnierung (Penetrationsverfahren) oder einer Oberflächenbehandlung 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 (Eluat) werden im Laufe des Expositionszeitraumes hinreichend oft Proben entnommen und analysiert, um statistische Berechnungen vornehmen zu können. Aus den Ergebnissen der Analysen werden die Emissionsraten in $\text{mg}/\text{m}^2/\text{Tag}$ berechnet. Die Zeitintervalle der Probenahmen sind zu protokollieren. Prüfungen 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 Eluate 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 in der Prüfung verwendeten Proben für das handelsübliche Holz, der Repräsentativität des Wassers für natürliches Wasser und von der Repräsentativität des Expositionsschemas für die natürlichen Gegebenheiten ab.
13. Die Genauigkeit, die Präzision und die Wiederholbarkeit der Analysemethode sind vor Beginn der Prüfung 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 zwischen den 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 dieser Prüfung annehmbar.

PRÜFBEDINGUNGEN

Wasser

16. Szenarien für die Auswaschung in Süßwasser: Für den Auswaschungstest wird demineralisiertes 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. Mittels einer Analyse 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. Szenarien 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. Mittels einer Analyse der Wasserproben, die vor dem Tauchen der behandelten Proben entnommen wurden, kann der Anteil der zu untersuchenden Chemikalien 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 Prüfungen durchgeführt werden.
19. Für die Prüfungen 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 × 50 mm × 15 mm), deren Längsseiten parallel zur Faser verlaufen; es können aber auch andere Abmessungen (z. B. 50 mm × 150 mm × 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 Oberflächenbehandlung und Proben zur Prüfung einer Druckimprägnierung zu unterscheiden. Die Aufbringung der Versiegelung auf der Stirnseite muss nur bei der oberflächlichen Applikation vor der Behandlung erfolgen.
24. Bei einer Druckimprägnierung 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 Druckimprägnierung sowie eine oberflächlichen Applikation (etwa durch Tauchen, Sprühen oder Streichen).

Schutzmittel die mit einer Druckimprägnierung eingebracht werden

28. Von dem zu prüfenden Holzschutzmittel wird eine Lösung so hergestellt, dass die spezifizierte Aufnahme oder Retention erreicht wird, wenn das Mittel mit einer Druckimprägnierung eingebracht wird. Die Holzprobe wird gewogen und gemessen. Das Verfahren zur Druckimprägnierung 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/m³) 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 oberflächlichen Applikation aufzubringende Holzschutzmittel

30. Die oberflächlichen Applikation kann u. a. durch Tauchen, Sprühen oder Streichen der Holzproben erfolgen. Das Verfahren und die Dosis des Holzschutzmittels (z. B. in l/m²) 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 +/- 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 (Eluat) 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 Eluat 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 µg/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 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{Tag}$ wird berechnet, indem der Mittelwert der drei Messungen der drei Replikate durch die Anzahl der Tage im Tauchbad geteilt wird.

Prüfbericht

43. Der Prüfbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:
 - Name des Herstellers des zu untersuchenden Holzschutzmittels;
 - spezifischer und individueller Name oder Code des zu untersuchenden Holzschutzmittels;
 - Handelsname oder Trivialname 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 Druckimprägnierung bzw. des Applikationsverfahrens bei Oberflächlichenbehandlung;
 - Datum der Applikation des Holzschutzmittels und Bestimmung 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 holzerstörende 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

Prüfinstitut	
Holzschutzmittel	
Hersteller des Holzschutzmittels	
spezifischer und individueller Name oder Code des Holzschutzmittels	
Handelsname oder Trivialname des Holzschutzmittels	
Beistoffe	
Relevante Retention (Schutzmittelaufnahme) 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 Prüfparameter	(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	
mg/l	mg/l				mg/l	mg/l	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ²	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d	mg/m ² /d			
Datum																	
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 unbehandelter Proben korrigiert werden müssen, sind zunächst die Ergebnisse der unbehandelten 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 Stoffe 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 dazu neigen, sich in oder auf Sedimente zu verteilen, 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. Diese Prüfung bezieht sich auf stabile, neutrale organische Stoffe, die sich leicht an Sedimente binden. Die Bioakkumulation sedimentgebundener, stabiler metall-organischer 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 Stoffs 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. Diese Prüfung 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:
- Trivialname, 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 Aufnahmeperiode 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 Aufnahmeperiode, 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 Analyseverfahren 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 Prüfkonzentrationen 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 Aufnahmephase 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 in den Würmern der Prüf- und Kontrollansätze besteht). Wenn in der Aufnahmephase kein Gleichgewichtszustand erreicht wurde, kann aufgrund der Ergebnisse in der Eliminationsphase die Kinetik — BAF_k , und die 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 Aufnahmephase werden Messungen vorgenommen, bis der BAF ein Plateau oder einen Gleichgewichtszustand erreicht hat. Die Aufnahmephase beträgt in der Regel 28 Tage. Praktische Erfahrungen haben gezeigt, dass bei verschiedenen stabilen, neutralen organischen Stoffen bereits in einer Aufnahmephase 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 Aufnahmephase 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_w) und im Sediment (C_s) nach Erreichen eines offensichtlichen Gleichgewichtszustands als auch als kinetischer Bioakkumulationsfaktor (BAF_k), ausgedrückt als Verhältnis der Konstante der Aufnahme (Aufnahme aus dem Sediment) (k_a) 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 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 Aufnahmephase 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 Aufnahmephase.
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 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 Stoffs 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 Aufnahmephase 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

Prüfspezies

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 Einzel-Spezies 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 Absorberstoffen 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 CaCO_3 pro Liter (7). In der Prüfmethode C.1 (25) werden die pH- und Härtebereiche des rekonstituierten Wassers festgelegt. 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 Prüforganismen 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 künstliches Sediment empfohlen, welches auf dem im Zusammenhang mit Prüfmethode C.8 (40) beschriebenen künstlichen Boden beruht, 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 Luftraum 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 er in dem Sediment homogen verteilt ist. Unterproben (mit Replikaten) 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 eingestellt 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 Aufnahmephase 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. Es wird empfohlen, die Eliminationsphase 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 weiterer 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 von 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 dem Akklimatisierungsbecken 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 ≥ 40 % aufrechterhalten werden. Das Überstandswasser der Prüfflässe 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 Prüfbereich soll etwa 500-1 000 lx betragen. Die Prüftemperatur soll während des gesamten Tests bei 20 ± 2 °C liegen.

Prüfkonzentrationen

48. Die Bestimmung der Aufnahmekinetik erfolgt bei einer einzigen (möglichst niedrigen) Prüfkonzentration; 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 Prüfkonzentration 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 Messzeitpunkt (11) mindestens drei behandelte Replikate vorzusehen. Zusätzliche Replikate sind beispielsweise zu verwenden, wenn (optional) weitere Probandaten 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 Aufnahme- und der Eliminationsphase in Gefäße ohne Prüfstoﬀ gegeben werden können. Die Gesamtzahl der behandelten Replikate mit dem Prüfstoﬀ muss für die Aufnahme- und die Eliminationsphase ausreichend sein.
50. Alternativ können die für die Probenahme während der Eliminationsphase vorgesehenen Würmer in einem großen Behälter mit dotiertem Sediment aus derselben Charge wie bei der Ermittlung der Aufnahmekinetik des Prüfstoﬀs exponiert werden. Es muss nachgewiesen werden, dass die Testbedingungen (Sedimenttiefe, Sediment-Wasser-Verhältnis, Besatz, Temperatur, Wasserqualität usw.) den entsprechenden Parametern der für die Aufnahme- und der Eliminationsphase vorgesehenen Replikate vergleichbar sind. Am Ende der Aufnahme- und der Eliminationsphase 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 Aufnahme- und 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 Replikaten zu Beginn, 3 Replikaten am Ende der Aufnahme- und der Eliminationsphase). In diesem Fall sind 4 Replikate einer negativen Kontrolle (ohne Lösungsmittel) zur Probenahme am Ende der Aufnahme- und der Eliminationsphase 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 Aufnahme- und der Eliminationsphase müssen mindestens folgende Parameter des Überstandswassers gemessen werden:

Temperatur	Messung in jeweils einem Gefäß pro Prüfkonzentration und Datum der Probenahme und in einem Kontrollgefäß einmal wöchentlich sowie zu Beginn und am Ende der Aufnahme- 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 Prüfkonzentration 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 pro Prüfkonzentration mit dem Prüfstoff pro Zeitpunkt der Probenahme und in einem Kontrollgefäß einmal wöchentlich sowie zu Beginn und am Ende der Aufnahme- und der Eliminationsphase;
Gesamt-Wasserhärte	in mindestens einem Gefäß mit dem Prüfstoff und in einem Kontrollprüfgefäß zu Beginn und am Ende der Aufnahme- und der Eliminationsphase, ausgedrückt in mg/l CaCO ₃ ;
Gesamt-Ammoniakgehalt	in mindestens einem Gefäß mit dem Prüfstoff und in einem Kontrollprüfgefäß am Anfang und am Ende der Aufnahme- und der Eliminationsphase; ausgedrückt in mg/l NH ₄ ⁺ oder NH ₃ oder Ammoniak-N gesamt.

Probenahme und Analyse der Wurm-, Sediment- und Wasserproben

Probenahmeplan

53. Anlage 3 enthält Beispiele von Probenahmeplänen für eine Aufnahme- und eine Eliminationsphase von 28 Tagen und eine Eliminationsphase von 10 Tagen.
54. Vor dem Einsetzen der Würmer sowie in der Aufnahme- und in der Eliminationsphase werden von dem Wasser und dem Sediment in den Prüfbecken 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 den verschiedenen Kompartimenten des Prüfsystems zu überwachen.
55. Wurm-, Sediment- und Wasserproben werden jeweils in der Aufnahme- 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 Replikatbecken 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 ausreichenden Volumens zur Quantifizierung des Prüfstoﬀs in den Proben.
58. Das verbleibende Überstandswasser wird vorsichtig aus den Prüfbecken 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 ist zu entfernen. Die Würmer vorsichtig in ein vorgewogenes Gefäß geben und wiegen. Anschließend werden die Würmer durch Gefrieren (z. B. bei ≤ -18 °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 mit 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 Extraktionsverfahren). 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 Prüfkonzentration ausreichend sind. Außerdem muss gewährleistet werden, dass der Prüfstoff in den Kontrollbecken 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 Adsorbierstoffen 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. von Ausgangsstoff und seinen Abbauprodukten) ermittelt werden. Wenn analysetechnisch möglich, können aus der Quantifizierung des Ausgangsstoffs und der Abbauprodukte im Gleichgewichtszustand oder am Ende der Aufnahmeperiode 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 Aufnahmeperiode gemessenen Radioaktivität auf ein nachgewiesenes Abbauprodukt entfällt, sollte dieses Abbauprodukt identifiziert werden (5).

68. Wegen der geringen individuellen Biomasse kann die Konzentration des Prüfstoffs bei den einzelnen Würmern häufig nicht ermittelt werden, außer wenn der Test 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 Replikatbecken 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 dessen 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 Ausscheidungskinetik offensichtlich nicht erster Ordnung entspricht, 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 Prüfergebnisse sind mit Vorsicht zu bewerten, wenn die gemessenen Konzentrationen des Prüfstoffs in Testansätzen in der Nähe der Nachweisgrenze der jeweiligen Analyseverfahren liegen.
74. Klar definierte Aufnahme- und Eliminationskurven sind ein Anzeichen für die gute Qualität der Bioakkumulationsdaten. Im Allgemeinen sollten die Konfidenzintervalle der BAF-Werte bei gut konzeptionierten Untersuchungen nicht 25 % übersteigen (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 Prüfverfahren (z. B. statisch, semistatisch oder Durchfluss);
- Art und Eigenschaften der verwendeten Beleuchtung und Photoperiode(n);
- Versuchsaufbau (z. B. Anzahl, Material und Größe der Prüfbecken, 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 Prüfkonzentrationen, Dauer der Aufnahme- und Eliminationsphasen, Häufigkeit der Probenahme);
- Methode für die Vorbereitung des Prüfstoffs und Applikationsmethode sowie Begründung der Wahl einer bestimmten Methode;
- die nominalen Prüfkonzentrationen;
- 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);
- nominale 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 Prüfbecken (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 Prüfbecken 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/Feuchtmasse) 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 $\text{kg Sediment (Feuchtmasse)} \cdot \text{kg}^{-1} \text{Wurm (Feuchtmasse)}$), Sediment-Aufnahmekonstante k_s (ausgedrückt in $\text{g Sediment (Feuchtmasse)} \cdot \text{g}^{-1} \text{Wurm (Feuchtmasse)} \cdot \text{d}^{-1}$) und Eliminationskonstante k_e (ausgedrückt in d^{-1}); außerdem kann zusätzlich der BSAF (ausgedrückt in $\text{kg Sediment organischer Kohlenstoff} \cdot \text{kg}^{-1} \text{Lipidgehalt des Wurms}$) angegeben werden;
- nicht eliminierte Rückstände (NER) am Ende der Eliminationsphase;
- falls gemessen: Prozentanteile des Ausgangsstoffs, Abbauprodukte und gebundener Rückstände (d. h. Gehalt an Prüfstoff, der sich nicht mit gewöhnlichen Extraktionsmethoden extrahieren lässt) in den Testtieren;
- Methoden, die zur statistischen Datenanalyse verwendet wurden.

Auswertung der Ergebnisse

- Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Validitätskriterien gemäß Nummer 21;
- unerwartete oder ungewöhnliche Ergebnisse, z. B. unvollständige Elimination des Prüfstoffs aus den Testtieren; 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 bezogen auf die 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/an 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: die direkt anhand des Verhältnisses der Sediment-Aufnahmekonstante zu den Eliminationskonstanten (k_s und k_e , siehe unten) berechnet werden; werden als kinetischer Bioakkumulationsfaktor (BAF_k) bezeichnet.

Biokonzentration: Konzentrationszunahme (Anreicherung) des Prüfstoffs in oder an einem Organismus, ausschließlich aufgrund der Aufnahme über die Körperoberfläche, bezogen auf die 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 Anreicherung 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 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Lipidgehalt des Organismus; C_s wird in $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 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 untersucht 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 über dem Sediment stehende Wasser.

Plateau oder **Gleichgewichtszustand** (*steady state*): Gleichgewicht zwischen den während der Aufnahmeperiode 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 an Proben, die im Abstand von mindestens zwei Tagen genommen werden, um höchstens $\pm 20\%$ voneinander abzuweichen, bzw. wenn es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitabständen der drei Probenahmen 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 $\text{g Sediment}^{-1} \text{Wurm d}^{-1}$ 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 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 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, oder nicht.

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

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{-k_e \times t}) \quad \text{[Gleichung 1]}$$

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:

$$BSAF = BAF_k \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

Dabei sind:

f_{oc} = Fraktion des organischen Kohlenstoffs im Sediment wahlweise bezogen auf die Trocken- oder die Feuchtmasse;

f_{lip} = 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 Aufnahmephase empfohlen. Der aus der Aufnahmephase 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 Eliminationsphase 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 des vollständigen tierischen Kompartiments 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 weiterer 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 phase) mit 100 multipliziert wird:

$$NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ am Ende der Eliminationsphase (Durchschnitt)} \times 100}{C_a \text{ im Gleichgewichtszustand (Durchschnitt)}}$$

Anlage 3

Beispiel eines Probenahmeplans bei einem 28-Tägigen Bioakkumulationstest**a) Aufnahmephase (einschließlich einer 4-tägigen Equilibrierungsphase)**

Tag	Arbeitsschritte
- 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 von Replikaten zur Probenahme von Wasser- und Sedimentproben zur Ermittlung der Prüfstoffkonzentration; randomisierte Verteilung der Würmer auf die Prüfbecken; Aufbewahrung einer ausreichenden 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	Arbeitsschritte
- 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 von Replikaten zur Probenahme von Wasser-, Sediment- und Wurmproben zur Ermittlung der Prüfstoffkonzentration; 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 Prüfsubstoffkonzentration;
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	< 2µg/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 l 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 l hinzugegeben.

(c) Natriumbicarbonatlösung

2,59 g NaHCO_3 werden in entionisiertem Wasser gelöst; anschließend wird entionisiertes Wasser bis zu einem Volumen von 1 l hinzugegeben.

(d) Kaliumchloridlösung

0,23 g KCl werden in entionisiertem Wasser gelöst; anschließend wird entionisiertes Wasser bis zu einem Volumen von 1 l hinzugegeben.

Alle Chemikalien müssen Analysequalität haben.

Die Leitfähigkeit des destillierten oder entionierten 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 $K_{\text{S4,3}}$ 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</i> sp. (Brennnessel), fein gemahlen (Partikelgröße $\leq 0,5$ mm) oder ein Gemisch aus gemahlenden Blättern von <i>Urtica</i> sp. mit Alpha-Cellulose (1:1); nach Arzneimittelstandard, zum menschlichen Verzehr; zusätzlich zum trockenen Sediment	0,4 - 0,5
Calciumcarbonat	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 Brennnesselpulvers 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-Homogenisierungseinrichtung 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.). Ein übermäßiger Abbau 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 1 000 g (Trockenmasse) insgesamt 460 ml Wasser kommen; entsprechend ergibt sich eine Feuchtmasse des Sediments von 1 460 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 Sedimenttypen 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. 2 Blasen mit 0,45 µm gefilterter 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 die Entstehung von Ammoniak und das Wachstum von Pilzen auf ein Minimum begrenzen. 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 Anreicherung von Ammoniak zu vermeiden, ist das Überstandswasser mit einem Durchflusssystem oder mindestens einmal 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 abgelegt 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 (100-1 000 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 gefroren gelagert werden. In einem Becken hält das frische Substrat etwa zwei Monate.

Jede Wurmkultur wird mit 500-1 000 Würmern begonnen; die Würmer werden dreimal wöchentlich mit 10 ml einer Suspension mit 6 g Forellen-Starterfutter gefüttert (bei Erneuerung oder Durchflussbedingungen). 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, welches 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 können eine Feuchtmasse von 40-50 mg und eine Länge von 9-11 cm erreichen. Sie verfügen über 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 1 500 ml Sediment und Wasser bestehenden Medium mit 375 ml natürlichem nicht kontaminiertem Sediment (ca. 10 % TOC, ca. 17 % Partikel ≤ 63 μm), 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 Bedarf zwei- bis dreimal wöchentlich als Suspension angeboten werden. Alternativ können die Würmer auch mit aufgetautem Salat nach Bedarf 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 Eingravingsverhalten 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-Fischtest.
- (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 slugworms (*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., Buttel, 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 850.1000. Public Draft. EPA 712-C-96-113. U.S. Environmental Protection Agency.
- (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 CO₂ 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) Hoofman, 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., Göрге, 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“
-

ISSN 1977-0642 (elektronische Ausgabe)
ISSN 1725-2539 (Papierausgabe)



Amt für Veröffentlichungen der Europäischen Union
2985 Luxemburg
LUXEMBURG

DE