

TEIL C: METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER ÖKOTOXIZITÄT

ALLGEMEINE EINLEITUNG: TEIL C

Die nachstehend beschriebenen Prüfmethoden dienen dem Nachweis einiger der in Anhang VIII der Richtlinie 79/831/EWG angegebenen ökotoxischen Eigenschaften. Die Anmelder sollten sich im klaren darüber sein, daß dieser Text keine Methoden zum Nachweis der folgenden Eigenschaften unter Stufe 1 von Anhang VIII umfaßt:

- längerdauernde Toxizitätsuntersuchungen mit *Daphnia magna*;
- Prüfungen an höheren Pflanzen;
- längerdauernde Toxizitätsuntersuchungen an Fischen;

Methoden zum Nachweis dieser Eigenschaften werden nach ihrer endgültigen Abfassung in der Form einer weiteren Anpassung an den technischen Fortschritt veröffentlicht. Bis dahin sollten die Anmelder international anerkannte Methoden anwenden, die der zuständigen Behörde anzugeben sind.

C. 8

TOXIZITÄT FÜR REGENWÜRMER

PRÜFUNG IN KÜNSTLICHEM BODEN

1. METHODE

1.1. Einleitung

Bei dieser Laborprüfung wird die Prüfsubstanz einem künstlichen Boden zugesetzt; in diesem Boden werden die Würmer 14 Tage lang gehalten. Nach 14 Tagen (wahlweise nach 7 Tagen) wird die tödliche Wirkung der Substanz auf die Regenwürmer überprüft. Dieser Test ist eine Methode zur relativ schnellen Überprüfung der Wirkung von Chemikalien auf Regenwürmer bei Aufnahme über die Haut und die Nahrung.

1.2. Definition und Meßgröße

LC₅₀: Die Konzentration einer Substanz, durch die 50 % der Versuchstiere während der Versuchszeit getötet werden.

1.3. Referenzsubstanz

Mit einer Referenzsubstanz wird regelmäßig überprüft, daß sich die Empfindlichkeit des Prüfsystems nicht wesentlich geändert hat. Als Referenzsubstanz wird Chloracetamid p. a. empfohlen.

1.4. Prinzip der Prüfmethode

Der Boden ist ein sehr variables Medium; daher wird bei dieser Prüfung ein sorgfältig definierter künstlicher Lehmboden verwendet. Adulte Regenwürmer der Art *Eisenia foetida* (siehe Anmerkung in der Anlage) werden in einem definierten künstlichen Boden gehalten, der mit verschiedenen Konzentrationen der Prüfsubstanz behandelt wird. 14 Tage (wahlweise 7 Tage) nach Prüfbeginn wird der Gefäßinhalt in einer flachen Schale ausgebreitet. Die bei der jeweiligen Konzentration überlebenden Regenwürmer werden gezählt.

1.5. Qualitätskriterien

Die Prüfmethode muß hinsichtlich Prüfsubstanz und Prüforganismus so reproduzierbar wie möglich sein. Die Mortalität in den Kontrollen darf am Ende der Prüfung 10 % nicht überschreiten oder aber die Prüfung ist ungültig.

1.6. Beschreibung des Prüfverfahrens

1.6.1. Material

1.6.1.1. Prüfsubstrat

Ein definierter künstlicher Boden wird als Grundprüfsubstrat eingesetzt.

a) Grundsubstrat (in Prozent des Trockengewichts)

- 10 % Sphagnumtorf (so nahe wie möglich bei pH 5,5 bis 6,0; ohne sichtbare Pflanzenreste und fein gemahlen).
- 20 % Kaolinitkreide mit vorzugsweise mehr als 50 % Kaolinit.
- Etwa 69 % Industriequarzsand (überwiegend feiner Sand mit mehr als 50 % 0,05 bis 0,2 mm großen Teilchen). Wenn die Prüfsubstanz in Wasser ungenügend dispergierbar ist, werden 10 g pro Prüfgefäß aufbewahrt, die später mit der Prüfsubstanz gemischt werden.
- Etwa 1 % Kalziumcarbonat (CaCO₃), in Pulverform, chemisch rein, zur Einstellung des pH-Wertes auf 6,0 ± 0,5.

b) Prüfsubstrat

Das Prüfsubstrat enthält das Grundsubstrat, die Prüfsubstanz und deionisiertes Wasser. Der Wassergehalt beträgt etwa 25 bis 42 % des Trockengewichts des Grundsubstrats. Der Wassergehalt des Substrats wird bestimmt, indem eine Probe bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wird. Es ist eine wichtige Voraussetzung, daß der künstliche Boden durchnäßt ist, aber kein Wasser darauf steht. Um eine gleichmäßige Verteilung der Prüfsubstanz im Substrat zu erzielen, muß sorgfältig gemischt werden. Es muß im Prüfbericht angegeben werden, wie die Prüfsubstanz in das Substrat eingebracht wird.

c) Kontrollsubstrat

Das Kontrollsubstrat enthält das Grundsubstrat und Wasser. Wird ein Trägerstoff verwendet, so muß eine zusätzliche Kontrolle die gleiche Menge an Trägerstoff enthalten.

1.6.1.2. **Prüfgefäße**

Glasgefäße mit perforierten Kunststoffdeckeln, -platten oder -folien von ca. 1 Liter Inhalt werden mit einer Menge an feuchtem Prüf- oder Kontrollsubstrat gefüllt, die 500 g Trockengewicht des Substrats entspricht.

1.6.2. **Prüfbedingungen**

Die Gefäße werden in Klimakammern bei einer Temperatur von $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ und Dauerlicht gehalten. Die Lichtintensität beträgt 400 bis 800 Lux.

Die Versuchszeit beträgt 14 Tage, aber die Mortalität kann wahlweise 7 Tage nach Versuchsbeginn bewertet werden.

1.6.3. **Prüfverfahren**

Prüfkonzentration

Die Konzentrationen der Prüfsubstanz werden als Gewicht der Substanz pro Trockengewicht des Grundsubstrats (mg/kg) ausgedrückt.

Vorversuch

In einer Vorprüfung wird der Konzentrationsbereich bestimmt, in dem 0 bis 100 % Mortalität auftritt. Der Vorversuch liefert Informationen zu dem in der Hauptprüfung zu verwendenden Konzentrationsbereich.

Die Prüfsubstanz sollte bei folgenden Konzentrationen getestet werden: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg Substanz/kg Prüfsubstrat (Trockengewicht).

Wird eine vollständige Hauptprüfung durchgeführt, reichen 1 Prüfansatz pro Konzentration und 1 pro unbehandelte Kontrolle mit je 10 Würmern für die Vorprüfung aus.

Hauptprüfung

Die Ergebnisse des Vorversuchs werden eingesetzt, um mindestens 5 Konzentrationen in einer geometrischen Reihe zu wählen, die den Bereich von 0 bis 100 % Mortalität umfassen, und die sich durch einen konstanten Faktor unterscheiden, der 1,8 nicht überschreitet.

Über diese Konzentrationsreihe sollten sich der C_{50} -Wert und sein Vertrauensbereich so genau wie möglich bestimmen lassen.

In der Hauptprüfung werden mindestens 4 Prüfansätze pro Konzentration und 4 unbehandelte Kontrollen mit je 10 Würmern eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Parallelansätze werden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Ergeben zwei aufeinanderfolgende Konzentrationen, die sich um den Faktor 1,8 unterscheiden, 0 und 100 % Mortalität, so reichen diese beiden Werte aus, um den Bereich anzugeben, in dem der LC_{50} -Wert liegt.

Mischung des Grundprüfsubstrats und der Prüfsubstanz

Das Prüfsubstrat sollte möglichst immer ohne andere Trägerstoffe als Wasser angesetzt werden. Unmittelbar vor Prüfbeginn wird die in deionisiertem Wasser oder einem anderen Lösungsmittel emulgierte oder dispergierte Prüfsubstanz mit dem Grundprüfsubstrat gemischt oder aber sie wird mit einem feinen chromatographischen Sprüher oder etwas Ähnlichem gleichmäßig aufgesprüht.

Wenn die Prüfsubstanz wasserunlöslich ist, wird sie in dem kleinstmöglichen Volumen eines geeigneten organischen Lösungsmittels (z. B. Hexan, Aceton oder Chloroform) gelöst. Um die Prüfsubstanz zu lösen, zu dispergieren oder zu emulgieren, dürfen nur leicht flüchtige Lösungsmittel verwendet werden. Das Prüfsubstrat muß vor Gebrauch belüftet werden. Verdunstetes Wasser muß ersetzt werden. Die Kontrolle muß die gleiche Menge jeden Trägerstoffes enthalten.

Ist die Prüfsubstanz in organischen Lösungsmitteln nicht löslich, dispergierbar oder emulgierbar, werden 10 g eines Gemischs von fein gemahlenem Quarzsand und der zur Behandlung von 500 g künstlichem Boden (Trockengewicht) benötigten Menge an Prüfsubstanz mit 490 g Prüfsubstrat (Trockengewicht) gemischt.

Für jeden Prüfansatz wird feuchtes Prüfsubstrat in einer Menge, die 500 g Trockengewicht entspricht, in die einzelnen Glasgefäße gefüllt. Je 10 Würmer, die 24 Stunden lang zur Gewöhnung in einem entsprechend feuchten Grundsubstrat gehalten, dann schnell gewaschen und mit Filterpapier abgetupft wurden, werden auf das Prüfsubstrat gesetzt.

Um ein Austrocknen des Substrats zu vermeiden, werden die Gefäße mit perforierten Kunststoffdeckeln, -platten oder -folien zugedeckt und 14 Tage lang unter Versuchsbedingungen belassen.

Die Auswertung wird 14 Tage (und wahlweise 7 Tage) nach Prüfbeginn durchgeführt. Das Substrat wird auf einer Platte aus Glas oder rostfreiem Stahl ausgebreitet. Die Würmer werden untersucht und die Überlebenden gezählt. Regenwürmer gelten als tot, wenn sie nicht auf einen leichten mechanischen Reiz am Vorderende reagieren.

Anschließend an eine Untersuchung nach 7 Tagen wird das Substrat wieder in das Prüfgefäß eingefüllt und die überlebenden Regenwürmer werden wieder auf dasselbe Prüfsubstrat gesetzt.

- 1.6.4. **Prüforganismen**
 Als Prüforganismen werden adulte *Eisenia foetida* (siehe Anlage) (mindestens 2 Monate alt mit Clitellum) von 300 bis 600 mg Feuchtgewicht eingesetzt (zur Anzucht siehe Anlage).
2. **DATEN**
- 2.1. **Verarbeitung und Auswertung der Ergebnisse**
 Die Konzentrationen der Prüfsubstanz werden zusammen mit dem jeweils entsprechenden Prozentsatz an toten Regenwürmern angegeben.
 Wenn die Daten es zulassen, lassen sich der LC₅₀-Wert und der Vertrauensbereich ($p = 0,05$) nach Standardmethoden bestimmen (Litchfield und Wilcoxon, 1949, oder entsprechende Methode). Die LC₅₀ wird in mg Prüfsubstanz pro kg Trockengewicht des Prüfsubstrats angegeben.
 Ist die Konzentrationskurve zu steil, um eine Berechnung der LC₅₀ zuzulassen, dann genügt es, den Wert aufgrund der graphischen Darstellung abzuschätzen.
 Ergeben 2 aufeinanderfolgende Konzentrationen, die sich um den Faktor 1,8 unterscheiden, 0 und 100% Mortalität, so reichen diese beiden Werte aus, um den Bereich anzugeben, in dem die LC₅₀ liegt.
3. **ABSCHLUSSBERICHT**
- 3.1. **Prüfbericht**
 Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:
- die Feststellung, daß die Prüfung in Übereinstimmung mit den oben genannten Qualitätskriterien durchgeführt wurde;
 - welche Prüfung durchgeführt wurde (Vorprüfung und/oder Hauptprüfung);
 - die genaue Beschreibung der Prüfbedingungen oder die Feststellung, daß die Prüfung entsprechend der angegebenen Methode durchgeführt wurde; jede Abweichung muß angegeben werden;
 - die genaue Beschreibung, wie die Prüfsubstanz in das Grundprüfsubstrat eingebracht wurde;
 - Angaben zu den Prüforganismen (Art, Alter, Durchschnittsgewicht und Gewichtsbereich, Haltungs- und Anzuchtmethoden, Herkunft);
 - das zur Bestimmung der LC₅₀ angewendete Verfahren;
 - die Prüfergebnisse einschließlich aller verwendeten Daten;
 - die Beschreibung der beobachteten Symptome oder Veränderungen im Verhalten der Versuchstiere;
 - die Mortalität in den Kontrollen;
 - die LC₅₀ oder die höchste geprüfte Konzentration ohne Mortalität und die niedrigste geprüfte Konzentration mit einer Mortalität von 100% 14 Tage (wahlweise 7 Tage) nach Prüfbeginn;
 - das Auftragen der Konzentration-Wirkungs-Kurve;
 - die Ergebnisse, die mit der Referenzsubstanz erzielt wurden, entweder in Verbindung mit der vorliegenden Prüfung oder aus vorherigen Qualitätskontrollversuchen.
4. **LITERATUR**
- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207*, Beschluß des Rates C(81)30 final.
 - (2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms*. Chapman and Hall, London, 331 pp.
 - (3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriens de France, Ecologie et Systematique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.
 - (4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, Band 96, 1949, Seite 99.
 - (5) Commission of the European Communities, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*, Report EUR 8714 EN, 1983.
 - (6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

ANLAGE

Anzucht und Haltung der Würmer vor der Prüfung

Zur Anzucht werden 30 bis 50 adulte Würmer 14 Tage lang in einem Brutkasten mit frischem Substrat gehalten. Diese Tiere können für weitere Anzuchten verwendet werden. Die aus den Kokons geschlüpften Würmer werden für die Prüfung eingesetzt, wenn sie geschlechtsreif sind (nach 2 bis 3 Monaten bei den vorgeschriebenen Bedingungen).

Anzucht und Haltungsbedingungen

Klimakammer: 20 °C ± 2 °C vorzugsweise mit Dauerlicht (400 bis 800 Lux).

Brutkasten: Geeignete flache Behälter von 10 bis 20 Liter Inhalt.

Substrat: *Eisenia foetida* kann in verschiedenen tierischen Exkrementen angezogen werden. Es wird empfohlen, ein Gemisch von 50 Vol. % Torf und 50 Vol. % Kuh- oder Pferdedung zu verwenden. Der pH-Wert sollte bei 6 bis 7 liegen (er wird mit Kalziumcarbonat eingestellt); die Ionenleitfähigkeit sollte niedrig sein (weniger als 6 mmhos oder 0,5% Salzkonzentration). Das Substrat sollte feucht, aber nicht zu naß sein.

Neben der oben angegebenen Methode können auch andere bewährte Verfahren eingesetzt werden.

Anmerkung: Eisenia foetida gibt es in 2 Rassen, die von einigen Taxonomen als 2 verschiedene Arten bezeichnet werden (Bouche, 1972). Morphologisch sind sie ähnlich, doch zeigt *Eisenia foetida foetida* typische Querstreifen oder Bänder auf den Segmenten, während *Eisenia foetida andrei* diese nicht aufweist und fleckig rötlich gefärbt ist. Es sollte möglichst *Eisenia foetida andrei* verwendet werden. Andere Arten können eingesetzt werden, wenn das nötige Verfahren zur Verfügung steht.

C. 9

BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT

ZAHN-WELLENS-TEST

1. METHODE

1.1. Einleitung

Zweck des Verfahrens ist die Prüfung der potentiellen vollständigen biologischen Abbaubarkeit wasserlöslicher, nichtflüchtiger organischer Stoffe, indem diese in einem statischen Test relativ hohen Konzentrationen von Mikroorganismen ausgesetzt werden.

Eine physikalisch-chemische Adsorption an suspendierte Feststoffe kann auftreten und muß ggf. bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden (siehe 3.2).

Die Prüfsubstanzen werden in Konzentrationen verwendet, die DOC-Werten von 50 bis 400 mg/l oder CSB-Werten von 100 bis 1 000 mg/l entsprechen (DOC = Dissolved Organic Carbon, gelöster organischer Kohlenstoff; CSB = Chemischer Sauerstoffbedarf). Diese verhältnismäßig hohen Konzentrationen ermöglichen zuverlässige Analysen, Verbindungen mit toxischen Eigenschaften können den Abbauprozess verzögern oder hemmen.

Bei diesem Verfahren wird die Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs oder der chemische Sauerstoffbedarf zur Beurteilung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit der Prüfsubstanz benutzt.

Werden gleichzeitig spezifische Analysemethoden angewandt, kann die biologische Primär-Abbaubarkeit des Stoffes beurteilt werden (Abnahme der chemischen Ausgangsstruktur).

Mit diesem Verfahren können nur organische Stoffe geprüft werden, die bei der verwendeten Konzentration

- unter den Testbedingungen wasserlöslich sind,
- unter den Testbedingungen einen unbedeutenden Dampfdruck haben,
- die Bakterien nicht hemmen,
- im Testsystem nur beschränkt adsorbiert werden,
- nicht durch Schäumen aus der Testlösung verlorengehen.

Angaben über die relativen Anteile der wichtigsten Komponenten der Prüfsubstanz sind zur Interpretation der erzielten Ergebnisse insbesondere dann nützlich, wenn niedrige oder marginale Abbauwerte erhalten werden.

Informationen über die Toxizität des Stoffes gegenüber Mikroorganismen sind zur Interpretation niedriger Abbauwerte sowie zur Wahl der geeigneten Prüfkonzentration ebenfalls nützlich.

1.2. Definitionen und Einheiten

Der nach Ablauf des Tests erzielte Abbaugrad wird als „Biologische Abbaubarkeit im Zahn-Wellens-Test“ angegeben:

$$D_T (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

D_T = Abbau (%) zur Zeit T ,

C_A = DOC(oder CSB)-Werte des Prüfansatzes 3 Stunden nach Beginn des Tests (mg/l),

C_T = DOC(oder CSB)-Werte des Prüfansatzes zur Zeit der Probenahme (mg/l),

C_B = DOC(oder CSB)-Werte des Blindansatzes zur Zeit der Probenahme (mg/l),

C_{BA} = DOC(oder CSB)-Werte des Blindansatzes 3 Stunden nach Beginn des Tests (mg/l).

Der Abbaugrad wird auf ganze Prozentzahlen gerundet.

Als prozentualer Abbau wird der Prozentsatz der DOC-(oder CSB)-Verminderung der Prüfsubstanz angegeben.

Die Differenz zwischen dem nach 3 Stunden gemessenen und dem berechneten oder vorzugsweise gemessenen Anfangswert stellt eine nützliche Information über die Eliminierung des Stoffes dar (siehe 3.2 „Interpretation der Ergebnisse“).

1.3. Referenzsubstanzen

Bei der Untersuchung neuer Stoffe können in einigen Fällen Referenzsubstanzen nützlich sein; spezifische Substanzen können jedoch nicht empfohlen werden.

1.4. Prinzip der Methode

Belebtschlamm, mineralische Nährstoffe und die Prüfsubstanz als einzige Kohlenstoffquelle werden in wässriger Lösung in ein Glasgefäß von 1 bis 4 Liter Volumen mit Rührwerk und Belüftungsvorrichtung gegeben. Die Suspension wird bei 20 bis 25 °C bei diffusem Licht oder in einem dunklen Raum bis zu 28 Tage gerührt und belüftet. Der Abbau wird verfolgt, indem die DOC-(oder CSB-)Werte der Lösung nach Filtration täglich oder in anderen geeigneten Zeitabständen gemessen werden. Das Verhältnis zwischen dem zur Zeit der Probenahme eliminierten DOC- (oder CSB-)Wert und dem 3 Stunden nach Beginn des Tests gemessenen Wert wird als Prozentsatz des biologischen Abbaus angegeben und dient als Maß des Abbaugrades zum betreffenden Zeitpunkt. Das Ergebnis wird jeweils gegen die Zeit graphisch aufgetragen und der biologische Abbau als Kurve dargestellt.

Wird ein spezifisches Analyseverfahren angewandt, so können Änderungen in der Konzentration der Ausgangs- Verbindung, die infolge des biologischen Abbaus auftreten, gemessen werden (Biologischer Primärabbau).

1.5. Qualitätskriterien

In einem Ringversuch ergab sich eine befriedigende Reproduzierbarkeit des Tests.

Die Empfindlichkeit des Verfahrens ist weitgehend abhängig von der Variabilität des Blindansatzes und in geringem Ausmaß von der Genauigkeit der Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs sowie der Konzentration der Prüfsubstanz in der Kultursuspension.

1.6. Prüfverfahren

1.6.1. Vorbereitung

1.6.1.1. Reagenzien

Wasser: Trinkwasser mit einem Gehalt an organischem Kohlenstoff $< 5 \text{ mg/l}$. Die Konzentration der Kalzium- und Magnesiumionen darf insgesamt $2,7 \text{ mMol/l}$ nicht übersteigen; sonst ist eine ausreichende Verdünnung mit deionisiertem oder destilliertem Wasser erforderlich.

Schwefelsäure, p. a.: 50 g/l

Natriumhydroxidlösung, p. a.: 40 g/l

Mineralische Nährlösung: in 1 Liter deionisiertem Wasser ist folgendes zu lösen:

Ammoniumchlorid, NH_4Cl , p. a.: 38,5 g

Natriumdihydrogenphosphat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, p. a.: 33,4 g

Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , p. a.: 8,5 g

Dikalium-mono-hydrogenphosphat, K_2HPO_4 , p. a.: 21,75 g.

Dieser Ansatz dient sowohl als Nähr- als auch als Pufferlösung.

1.6.1.2. Geräte

Glasgefäße mit 1 bis 4 Liter Volumen (z. B. zylindrische Gefäße).

Rührwerk mit Rührelement aus Glas oder Metall an einem geeigneten Stiel (Das Rührelement sollte sich 5 bis 10 cm über dem Boden des Gefäßes bewegen). Auch ein magnetisches Rührwerk mit einem 7 bis 10 cm langen Magnetstab kann benutzt werden.

Glasrohr von 2 bis 4 mm Innendurchmesser zur Belüftung. Die Rohröffnung sollte sich rund 1 cm über dem Boden des Gefäßes befinden.

Zentrifuge (rd. 3 550 g).

pH-Meßgerät.

Gerät zur Messung des gelösten Sauerstoffs.

Papierfilter.

Membranfiltrationsgerät.

Membranfilter, Porengröße $0,45 \mu\text{m}$. Die Membranfilter dürfen weder Kohlenstoff freisetzen noch während der Filtration absorbieren.

Analysegerät zur Bestimmung des Gehalts an organischem Kohlenstoff und Ausrüstung zur Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs.

1.6.1.3. Vorbereitung des Inokulums

Belebtschlamm aus einer biologischen Kläranlage wird gewaschen, indem er mit Wasser (der vorgeschriebenen Qualität) wiederholt zentrifugiert oder sedimentiert wird.

Der Belebtschwamm muß in einem geeigneten Zustand sein. Er ist in einer einwandfrei arbeitenden Kläranlage erhältlich. Um möglichst viele Bakterienarten oder Stämme zu erhalten, sollten evtl. Inokula aus verschiedenen Quellen gemischt werden (z. B. Schlamm aus verschiedenen Kläranlagen, Bodenextrakte, Flußwasser usw.). Das Gemisch ist nach obiger Beschreibung zu behandeln.

Zur Prüfung der Aktivität des Belebtschlammes siehe „Funktionskontrolle“ (unter 1.6.2).

1.6.1.4. Zubereitung der Testlösungen

In das Testgefäß sind 500 ml Wasser, 2,5 ml/l mineralische Nährlösung und Belebtschlamm in einer Menge von 0,2 bis 1,0 g/l Trockenmasse im Endgemisch zu geben. Man gebe genügend Stammlösung der Prüfsubstanz hinzu, um eine DOC-Konzentration von 50 bis 400 mg/l in der Kultursuspension zu erhalten. Die entsprechenden CSB-Werte sind 100 bis 1 000 mg/l. Dann wird mit Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 1 bis 4 Liter aufgefüllt. Das zu wählende Gesamtvolumen ist abhängig von der Anzahl Proben für die DOC- oder CSB-Bestimmungen und vom für das Analyseverfahren benötigten Probevolumen.

In der Regel sind 2 Liter ausreichend. Gleichzeitig mit jeder Testserie ist zumindest eine Kontrolle durchzuführen; der Kontrollansatz (Blindprobe) hierfür enthält nur Belebtschlamm und Mineralnährlösung und wird mit Wasser auf das gleiche Volumen wie die Prüfansätze aufgefüllt.

1.6.2. Durchführung der Prüfung

Die Kulturgefäße werden bei diffusem Licht oder in einer Dunkelkammer bei 20 bis 25 °C inkubiert und mit Hilfe eines magnetischen Rührwerks oder eines Schraubenpropellers gerührt. Die Belüftung erfolgt mit Druckluft, die — falls erforderlich — mit einem Wattefilter oder einer Waschflasche zu reinigen ist. Es ist dafür zu sorgen, daß sich der Schlamm nicht absetzt und die Sauerstoffkonzentration nicht unter 2 mg/l sinkt.

Der pH-Wert ist in regelmäßigen Abständen zu prüfen (z. B. täglich) und ggf. auf 7 bis 8 einzustellen.

Verdunstungsverluste werden vor jeder Probenahme mit deionisiertem oder destilliertem Wasser ausgeglichen. Hierfür ist es zweckmäßig, das Flüssigkeitsniveau am Gefäß vor Beginn des Tests zu markieren. Nach jeder Probenahme wird bei ausgeschalteter Belüftung und Rührung eine neue Marke angebracht. Die ersten Proben werden jeweils drei Stunden nach Beginn des Tests entnommen, um die Absorption der Prüfsubstanz an den Belebtschlamm zu ermitteln.

Die Elimination der Prüfsubstanz wird verfolgt, indem täglich oder in anderen regelmäßigen Zeitabständen die DOC- oder CSB-Werte bestimmt werden. Die Proben aus dem Prüfansatz und die Blindproben werden durch ein sorgfältig gewaschenes Papierfilter filtriert. Die ersten 5 ml des Filtrats sind zu verwerfen. Schwer zu filtrierende Suspensionen können zuvor durch Zentrifugation (10 Minuten) vorgereinigt werden. Die DOC- und DSB-Bestimmungen werden mindestens doppelt durchgeführt. Die Ansätze werden bis zu 28 Tage inkubiert.

Anmerkung: Proben, die nach dieser Behandlung noch trüb sind, werden durch Membranfilter filtriert. Die Membranfilter dürfen keine organischen Stoffe freisetzen oder adsorbieren.

Funktionskontrolle des Belebtschlammes

Parallel zu jeder Testserie ist ein Ansatz mit einer Substanz, deren Abbauverhalten bekannt ist, zu prüfen, um die Abbau-Kapazität des Belebtschlammes zu kontrollieren. Diäthylenglykol hat sich hierfür als zweckmäßig erwiesen.

Adaptation

Werden Analysen in relativ kurzen Zeitabständen (z. B. täglich) durchgeführt, so läßt sich die Adaptation aufgrund der Abbaukurve klar erkennen (siehe Abbildung 2). Der Test sollte deshalb nicht unmittelbar vor einem Wochenende begonnen werden. Erfolgt die Adaptation am Ende der normalen Testdauer, so kann der Test bis zum vollständigen Abbau der Prüfsubstanz verlängert werden.

Anmerkung: Ist eine eingehendere Kenntnis über das Verhalten des adaptierten Belebtschlammes erforderlich, so wird dieser nach folgendem Verfahren ein weiteres Mal mit der gleichen Prüfsubstanz inkubiert:

Rührwerk und Belüftung werden ausgeschaltet, damit sich der Belebtschlamm absetzen kann. Die überstehende Flüssigkeit wird entfernt, man füllt mit Wasser (Testqualität) auf 2 Liter auf, rührt 15 Minuten lang und läßt den Schlamm absetzen. Die überstehende Flüssigkeit wird wiederum entfernt und der Test mit dem verbleibenden Schlamm und der gleichen Prüfsubstanz wie oben unter 1.6.1.4 und 1.6.2 beschrieben wiederholt. Der Belebtschlamm kann auch durch Zentrifugieren anstatt durch Absetzen gewonnen werden.

Der adaptierte Schlamm kann mit frischem Belebtschlamm gemischt werden, so daß wiederum 0,2 bis 1 g Trockengewicht pro Liter in der Kultursuspension erreicht werden.

Vorbereitung für die Analyse

Die Proben werden in der Regel durch ein sorgfältig gewaschenes Papierfilter filtriert (zum Waschen verwende man entionisiertes Wasser).

Trübe Proben werden durch Membranfilter (0,45 µm) filtriert.

Die DOC-Konzentration wird in Probefiltraten (die ersten 5 ml werden verworfen) mit dem TOC-Meßgerät doppelt bestimmt. Kann das Filtrat nicht am gleichen Tag analysiert werden, so muß es bis zum nächsten Tag im Kühlschrank aufbewahrt werden. Von längeren Lagerungen wird abgeraten.

Die CSB-Konzentration der Probefiltrate wird nach dem in der Literaturangabe (?) beschriebenen Verfahren bestimmt.

2. DATEN UND AUSWERTUNG

Die DOC- und CSB-Konzentrationen werden in den Proben, wie oben in 1.6.2 beschrieben, mindestens doppelt bestimmt. Der Abbau zum Zeitpunkt T wird nach der unter 1.2 oben angegebenen Formel mit den Definitionen berechnet.

Der Abbaugrad wird auf ganze Prozentzahlen aufgerundet. Der nach Ablauf des Tests erreichte Abbau wird als „Biologische Abbaubarkeit im Zahn-Wellens-Test“ angegeben.

Anmerkung: Wird vor Ablauf der Testzeit ein vollständiger Abbau erreicht und dieses Ergebnis in einer zweiten Analyse am nächsten Tag bestätigt, so kann die Prüfung beendet werden.

3. SCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Substanzkonzentration zu Beginn des Tests;
- sämtliche Informationen und experimentellen Ergebnisse, die mit der Prüfsubstanz, ggf. der Referenzsubstanz sowie der Blindprobe erhalten wurden;
- Substanzkonzentration nach drei Stunden;
- Abbau-Kurve mit Beschreibung;
- Datum und Ort der Entnahme der Organismen, Stand der Adaptation, verwendete Konzentration usw.;
- wissenschaftliche Gründe für jedwede Änderungen des Testverfahrens.

3.2. Interpretation der Ergebnisse

Eine fortschreitende Abnahme des DOC (CSB) innerhalb von Tagen oder Wochen weist auf einen biologischen Abbau des Teststoffes hin.

Eine physikalisch-chemische Adsorption kann jedoch in manchen Fällen auch eine Rolle spielen; ein Hinweis darauf besteht, wenn während der ersten drei Stunden eine vollständige oder teilweise DOC-(CSB-)Abnahme festgestellt wird und der Unterschied zwischen der überstehenden Flüssigkeit in den Proben aus dem Kontrollgefäß und dem Testgefäß unerwartet niedrig ist.

Soll zwischen vollständigem (oder teilweise) biologischem Abbau und Adsorption unterschieden werden, sind weitere Tests erforderlich. Hierfür bieten sich mehrere Möglichkeiten an; am besten verwendet man jedoch überstehende Kultursuspension aus dem Prüfansatz als Inokulum in einem Grundstufen-Test (vorzugsweise in einem respirometrischen Test).

Prüfsubstanzen, die eine weitgehende, nicht durch Adsorption bedingte Abnahme des DOC-(CSB)Gehalts in diesem Test aufweisen, sind als potentiell biologisch abbaubar zu betrachten. Eine partielle nichtadsorptive Abnahme weist darauf hin, daß der Stoff zumindest teilweise biologisch abbaubar ist.

Erfolgt keine oder nur eine geringe DOC-(CSB)Abnahme, kann dies möglicherweise auf einer Hemmung der Mikroorganismen durch den zu prüfenden Stoff beruhen. Eine Hemmung kann sich auch durch Auflösung und Verlust des Schlammes sowie einer Trübung der überstehenden Kultursuspension zeigen. In solchen Fällen ist die Prüfung mit einer niedrigeren Konzentration des zu prüfenden Stoffes zu wiederholen.

Durch spezifische Analysemethoden oder den Einsatz ^{14}C -markierter Prüfsubstanzen läßt sich evtl. eine höhere Empfindlichkeit erreichen. Wird ^{14}C -markierte Prüfsubstanz verwendet, läßt sich durch Nachweis des entstehenden $^{14}\text{CO}_2$ bestätigen, daß ein biologischer Abbau stattgefunden hat.

Werden die Ergebnisse auch in Form des biologischen Primär-Abbaus angegeben, so sollten, wenn möglich, Angaben über die Veränderungen der chemischen Struktur gemacht werden, die die mangelnde Wiederauffindung der Ausgangssubstanz begründen.

Die Eignung der Analysemethode sowie die damit bestimmten Werte im Nährmedium ohne Zusatz der Prüfsubstanz müssen angegeben werden.

4. LITERATUR

- (1) OECD Paris, 1981, *Test Guideline 302 B*, Beschluß des Rates C(81) 30 Final.
- (2) Anhang V C.9 Abbaubarkeit: Chemischer Sauerstoffbedarf Richtlinie der Kommission 84/449/EWG (*Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* Nr. L 251 vom 19. September 1984).

Anlage

BEISPIEL EINER AUSWERTUNG

Organische Verbindung: 4-Äthoxybenzoesäure
Theoretische Testkonzentration: 600 mg/l
Theoretischer DOC-Gehalt: 390 mg/l
Impfgut (Inokulum): Kläranlage . . .
Konzentration: 1 Gramm Trockensubstanz/l
Stand der Adaptation: nicht adaptiert
Analyse: DOC-Bestimmung
Probemenge: 3 ml
Kontrollsubstanz: Diäthylenglykol
Toxizität der Verbindung: keine toxische Wirkung unter 1 000 mg/l
 Angewandter Test: Gärröhrentest

Zeit	Kontrollsubstanz				Prüfsubstanz		
	Blindansatz DOC ⁽¹⁾ mg/l	DOC ⁽¹⁾ mg/l	Netto DOC mg/l	Abbau %	DOC ⁽¹⁾ mg/l	Netto DOC mg/l	Abbau %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 Std.	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 Tag	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 Tage	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 Tage	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 Tage	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 Tage	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 Tage	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 Tage	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 Tage	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

⁽¹⁾ Mittelwerte aus dreifacher Bestimmung.

Abbildung 1

Beispiele von Abbau-Kurven

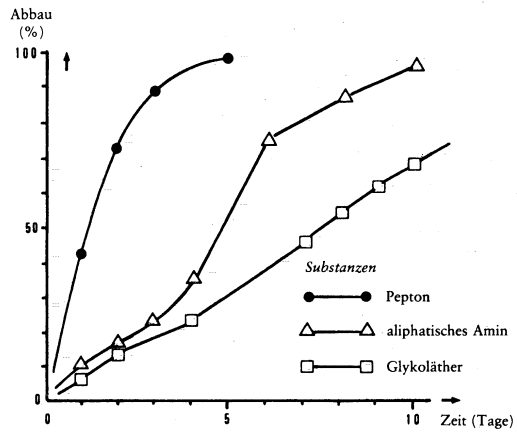
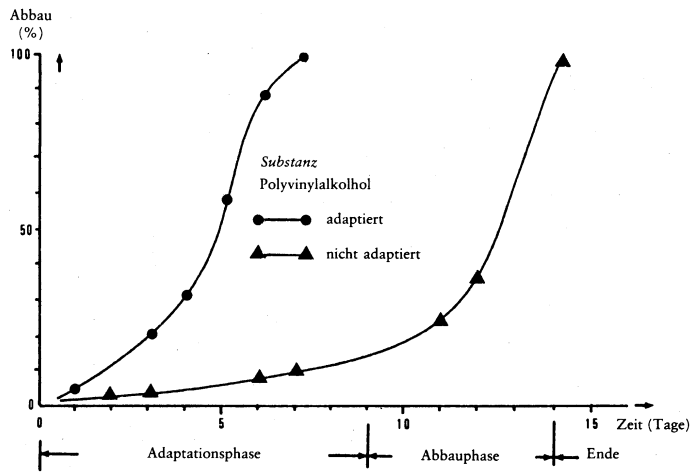


Abbildung 2

Beispiel für eine Adaptation des Schlammes



C. 10

BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT

SIMULATIONSTEST MIT BELEBTSCHLAMM

1. METHODE

1.1. Einleitung

1.1.1. Allgemeines

Die Methode ist nur für organische Substanzen geeignet, die bei den im Test verwendeten Konzentrationen

- in dem zur Herstellung der Testlösungen erforderlichen Maße in Wasser löslich sind;
- unter den Prüfbedingungen einen vernachlässigbar niedrigen Dampfdruck haben;
- die Bakterien nicht hemmen.

Angaben über die relativen Anteile der wichtigsten Bestandteile der Prüfsubstanz sind für die Interpretation der Ergebnisse nützlich, insbesondere wenn die Abbauwerte niedrig oder marginal sind.

Informationen über die Toxizität der Substanz für Mikroorganismen können für die Interpretation niedriger Abbauwerte und die Wahl der geeigneten Prüfkonzentrationen von Nutzen sein.

1.1.2. Prüfung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit (DOC⁽¹⁾/CSB⁽²⁾-Analyse)

Zweck des Verfahrens ist die Prüfung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen durch Messung der Abnahme der Prüfsubstanz sowie möglicher Metaboliten in einer Belebtschlamm-Modellanlage bei einer Konzentration von 12 mg DOC/l (oder etwa 40 mg CSB/l). 20 mg DOC/l haben sich als günstig erwiesen.

Der Gehalt der Prüfsubstanz an organischem Kohlenstoff (oder der chemische Sauerstoffbedarf) müssen bekannt sein.

1.1.3. Bestimmung der biologischen Primär-Abbaubarkeit (Spezifische Analyse)

Zweck dieses Verfahrens ist die Prüfung der biologischen Primär-Abbaubarkeit einer Substanz in einer Belebtschlamm-Modellanlage bei einer Konzentration von etwa 20 mg Substanz/l unter Verwendung einer substanzspezifischen Analysemethode (niedrige oder höhere Konzentrationen können eingesetzt werden, wenn die analytische Methode und die Toxizität dies erlauben). Dieses Verfahren ermöglicht die Beurteilung der Primär-Abbaubarkeit der Substanz (Verschwinden der ursprünglichen chemischen Struktur).

Es ist *nicht* Zweck dieses Verfahrens, die Mineralisierbarkeit der Prüfsubstanz zu bestimmen.

Für die quantitative Analyse der Prüfsubstanz muß ein geeignetes Verfahren zur Verfügung stehen.

1.2. Definitionen und Einheiten

1.2.1. DOC/CSB-Analyse

Die Abnahme der Substanz ist gegeben durch

$$DR = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100\% \quad [1 a)]$$

Darin sind:

DR = DOC- (oder CSB-)Abnahme in % bei der gegebenen mittleren Verweilzeit, bezogen auf die eingesetzte Prüfsubstanz,

T = Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf in mg DOC/l (oder mg CSB/l),

E = DOC- (oder CSB-)Konzentration im Ablauf in mg/l,

E₀ = DOC- (oder CSB-)Konzentration im Ablauf der Kontrollanlage in mg/l.

Als Abbau wird die prozentuale DOC- (oder CSB-)Abnahme bei der gegebenen Verweilzeit, bezogen auf die eingesetzte Prüfsubstanz, angegeben.

⁽¹⁾ DOC = Dissolved Organic Carbon = Gelöster organischer Kohlenstoff.

⁽²⁾ CSB = Chemischer Sauerstoffbedarf.

1.2.2. *Spezifische Analyse*

Die prozentuale Elimination der Prüfsubstanz aus der wäßrigen Phase (R_w) innerhalb der gegebenen mittleren Verweilzeit ist gegeben durch

$$R_w = \frac{C_1 - C_0}{C_1} \times 100 \% \quad [1 \text{ b}]$$

Darin sind:

C_1 = Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf der Prüfanlage (mg Substanz/l, bestimmt durch spezifische Analyse),

C_0 = Konzentration der Prüfsubstanz im Ablauf der Prüfanlage (mg Substanz/l, bestimmt durch spezifische Analyse).

1.3. **Referenzsubstanzen**

Wenn eine neue Substanz untersucht wird, sind Referenzsubstanzen in manchen Fällen nützlich. Hier kann jedoch noch keine bestimmte Substanz empfohlen werden.

1.4. **Prinzip der Methoden**

Um die vollständige biologische Abbaubarkeit zu prüfen, sind zwei Belebtschlamm-Modellanlagen (OECD Confirmatory Test-Einheit oder „Porous pot“), die parallel betrieben werden, erforderlich. Die Prüfsubstanz wird dem Zulauf (synthetisches oder kommunales Abwasser) einer der beiden Anlagen zugesetzt, während die andere Anlage nur das Abwasser erhält.

Um die biologische Primär-Abbaubarkeit mit Hilfe spezifischer Analysen der Prüfsubstanz im Zu- und Ablauf zu bestimmen, ist nur eine Anlage erforderlich.

Die DOC- (oder CSB-)Konzentrationen werden in den Abläufen gemessen, oder es werden die Konzentrationen der Prüfsubstanz über die spezifische Analyse bestimmt.

Der Gesamt-DOC-Gehalt der Nährlösung (Abwasser + Prüfsubstanz) muß nicht gemessen, sondern kann als Summe der beiden Einzelwerte angegeben werden.

Bei DOC- (oder CSB-)Messungen geht man davon aus, daß die Differenz der Konzentrationen zwischen Prüf- und Kontrollablauf auf nicht abgebaute Prüfsubstanz beruht.

Mit Hilfe spezifischer Analysen läßt sich die Änderung der Konzentration der Ausgangssubstanz messen (biologischer Primär-Abbau).

Die Anlagen können nach einem Überimpfungsverfahren gekoppelt betrieben werden.

1.5. **Qualitätskriterien**

Die Ausgangskonzentration der Prüfsubstanz ist unter Berücksichtigung der Art der Analyse und ihrer jeweiligen Erfassungsgrenze zu wählen.

1.6. **Beschreibung des Prüfverfahrens**

1.6.1. *Vorbereitung*

1.6.1.1. **Geräte**

Wenn nicht mit spezifischer Analytik gearbeitet wird, werden zwei Modellanlagen gleichen Typs benötigt. Zwei Anlagentypen stehen zur Verfügung, die wahlweise eingesetzt werden können:

OECD-Confirmatory-Test-Anlage

Die Anlage besteht aus einem Vorratsgefäß (A) für das Abwasser, einer Dosierpumpe (B), einem Belüftungsgefäß (C), einem Absetzgefäß (D), einem Druckluftheber (E) zur Rückführung des Belebtschlammes sowie einem Sammelgefäß für den behandelten Ablauf (F).

Die Gefäße A und F müssen aus Glas oder geeignetem Kunststoff bestehen und mindestens 24 Liter fassen. Die Pumpe (B) muß einen konstanten Zustrom des Abwassers zum Belüftungsgefäß erlauben. Jedes geeignete System, das einen bestimmten Zustrom sowie eine bestimmte Konzentration gewährleistet, kann eingesetzt werden.

Bei normalem Betrieb wird die Höhe des Absetzgefäßes (D) so eingestellt, daß das Volumen der Kultursuspension im Belüftungsgefäß 3 Liter beträgt. In der kegelförmigen Spitze des Belüftungsgefäßes befindet sich ein gesinterter, poröser Stein zur Belüftung. Die Belüftungsrate muß mit Hilfe eines Durchflußmessers kontrolliert werden. Der Druckluftheber (E) ist so eingestellt, daß der Belebtschlamm kontinuierlich und regelmäßig vom Absetzgefäß in das Belüftungsgefäß zurückgeführt wird.

„Porous pot“-Anlage

Der „Porous pot“ ist folgendermaßen konstruiert: Poröse Polyethylenfolien (Dicke: 2 mm; max. Porengröße: 95 µ) bilden einen Zylinder (Ø : 14 cm) mit einem konischen Ende (45°) (siehe Abbildung 1 und 2 in Anlage 2). Der „Porous pot“ befindet sich in einem undurchlässigen Gefäß (Ø 15 cm) aus geeignetem Kunststoff, das in seinem zylindrischen Teil in der Höhe von 17,2 cm bei einem Volumen von 3 Liter einen Auslaß aufweist. Am oberen Ende des Innengefäßes ist ein starrer Halterungsring aus Kunststoff so angebracht, daß zwischen Außen- und Innengefäß 0,5 cm Ablaufraum liegen. Der „Porous pot“ kann in ein durch einen Thermostaten kontrolliertes Wasserbad montiert werden. Über eine Luftzufuhr zum Boden des Innengefäßes wird mit Hilfe eines geeigneten Verteilers belüftet.

Die Gefäße (A) und (E) müssen aus Glas oder einem geeigneten Kunststoff bestehen und mindestens 24 Liter fassen. Die Pumpe (B) muß einen konstanten Zustrom des Abwassers in das Belüftungsgefäß erlauben. Jedes geeignete System kann verwendet werden, vorausgesetzt, daß ein bestimmter Zustrom und eine bestimmte Konzentration gewährleistet sind.

Zusätzliche „Porous-pot“-Gefäße sind erforderlich, damit ein Gefäß, das während des Gebrauchs verstopft ist, ersetzt werden kann. Verstopfte Gefäße werden 24 Stunden in Hypochloritlösung gelegt und anschließend gründlich mit Leitungswasser gespült.

1.6.1.2. Filtration

Es sind Membranfiltrationsgeräte und Membranfilter (Porengröße: 0,45 µ) erforderlich. Die Membranfilter dürfen weder Kohlenstoff freisetzen noch die Substanz beim Filtrieren adsorbieren.

1.6.1.3. Abwasser

Es kann wahlweise geeignete synthetische Nährlösung oder kommunales Abwasser verwendet werden.

Beispiel für synthetische Nährlösung

Pro Liter Leitungswasser sind zu lösen:

Pepton:	160 mg,
Fleischextrakt:	110 mg,
Harnstoff:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
CaCl ₂ ·2H ₂ O:	4 mg,
MgSO ₄ ·7H ₂ O:	2 mg,
K ₂ HPO ₄ :	28 mg.

Häusliches Abwasser

Es ist jeden Tag frisch vom Überlauf der mechanischen Stufe einer Kläranlage, die hauptsächlich kommunale Abwässer reinigt, zu entnehmen.

1.6.1.4. Stammlösung der Prüfsubstanz

Es wird eine Lösung der Prüfsubstanz, z. B. 1 %ig, angesetzt. Die Konzentration der Prüfsubstanz muß bestimmt werden, um ein geeignetes Volumen zur Einstellung der erforderlichen Prüfkonzentration in der Kultursuspension ermitteln zu können. Dies wird dann entweder dem Abwasser zugesetzt oder kontinuierlich über eine zweite Pumpe direkt in das Belüftungsgefäß gegeben.

1.6.1.5. Inokulum

Anmerkung: Wird kommunales Abwasser verwendet, ist es wenig zweckmäßig, ein Inokulum mit geringer Bakterienkonzentration zu wählen; hier ist Belebtschlamm einzusetzen.

Es können Inokula verschiedener Herkunft eingesetzt werden.

Hier werden drei Beispiele für geeignetes Impfgut angegeben:

a) Inokulum aus Kläranlagenablauf

Das Inokulum wird vorzugsweise dem Ablauf einer gut arbeitenden Kläranlage, in der hauptsächlich kommunale Abwässer gereinigt werden, entnommen. Die Suspension muß zwischen Probenahme und Verwendung aerob gehalten werden. Zur Aufbereitung des Inokulums wird die Probe durch ein grobes Filter gegeben, wobei die ersten 200 ml verworfen werden. Das Filtrat wird bis zur Verwendung aerob gehalten. Das Impfgut muß am gleichen Tag verwendet werden. Zur Beimpfung müssen mindestens 3 ml eingesetzt werden.

b) Misch-Inokulum

Inokulum aus einem Kläranlagenablauf:

Siehe oben.

Inokulum aus Boden:

100 g Gartenboden (fruchtbarer, nicht steriler Boden) werden in 1 Liter chlorfreiem Trinkwasser suspendiert. (Böden mit sehr hohem Gehalt an Ton, Sand oder Humus sind ungeeignet.) Nach dem Umrühren läßt man die Suspension für 30 Minuten absetzen. Der Überstand wird durch ein großes Filter gegeben, wobei die ersten 200 ml verworfen werden. Das Filtrat wird sofort und bis zur Verwendung belüftet. Das Inokulum muß am gleichen Tag verwendet werden.

Inokulum aus Oberflächenwasser

Ein weiterer Anteil des Mischinokulums wird von einem mesosaprobischen Oberflächenwasser gewonnen. Die Probe wird durch ein grobes Filter gegeben, wobei die ersten 200 ml verworfen werden. Bis zur Verwendung wird das Filtrat aerob gehalten. Das Inokulum muß am gleichen Tag verwendet werden.

Die drei verschiedenen Impfsuspensionen werden zu gleichen Teilen gut gemischt. Mindestens 3 ml dieser Suspension sind für die Beimpfung einzusetzen.

c) Inokulum aus Belebtschlamm

Ein Volumen von nicht mehr als 3 Liter Belebtschlamm (Gehalt an suspendierten Feststoffen bis zu 2,5 g/l) vom Belüftungsbecken einer Kläranlage, die hauptsächlich kommunales Abwasser reinigt, wird als Inokulum verwendet.

1.6.2. Prüfverfahren

Der Test wird bei einer Raumtemperatur von 18° C bis 25° C durchgeführt. Gegebenenfalls kann der Test bei einer niedrigeren Temperatur (bis zu 10 °C) durchgeführt werden: Wenn die Prüfsubstanz unter diesen Bedingungen abgebaut wird, sind normalerweise keine weiteren Untersuchungen erforderlich. Wird die Substanz jedoch nicht abgebaut, muß der Test bei 18 bis 25° C wiederholt werden.

1.6.2.1. Anlaufphase: Schlamm- und Stabilisierung der Anlagen

Die Schlammwachstums-/Stabilisierungsphase ist der Zeitraum, in dem die Konzentration der im Belebtschlamm suspendierten Feststoffe und der Betrieb der Anlagen bei den gegebenen Betriebsbedingungen ein Fließgleichgewicht erreichen.

Die Anlaufphase ist der Zeitraum beginnend mit der ersten Zugabe der Prüfsubstanz bis zu dem Zeitpunkt, zu dem ihre Abnahme ein Plateau erreicht (d. h. ein verhältnismäßig konstanter Wert gemessen wird). Dieser Zeitraum darf sechs Wochen nicht überschreiten.

Die Auswertungsphase ist ein Zeitraum von drei Wochen, beginnend drei Wochen nachdem die Abnahme der Prüfsubstanz einen relativ konstanten und gewöhnlich hohen Wert erreicht hat. Für Substanzen, die in den ersten sechs Wochen wenig oder gar nicht abgebaut werden, werden die darauffolgenden drei Wochen als Auswertungsphase gewählt.

Zunächst wird in die für den Test vorgesehene Anlage (oder die Anlagen) das mit Abwasser gemischte Inokulum gefüllt. Dann wird die Belüftung (und bei Verwendung der OECD-Confirmatory-Test-Anlage) durch Mammutpumpe sowie das Dosiergerät in Betrieb gesetzt.

Der Zulauf (Abwasser) ohne Prüfsubstanz muß das Belüftungsgefäß entweder mit einer Rate von 1 Liter/Std. oder von 1/2 Liter/Std. durchfließen; dies ergibt eine mittlere Verweilzeit von drei bzw. sechs Stunden.

Die Belüftung muß so reguliert sein, daß der Inhalt im Belüftungsgefäß immer in Suspension ist und der Gehalt an gelöstem Sauerstoff mindestens 2 mg/l beträgt.

Ein Schäumen muß mit geeigneten Mitteln verhindert werden. Antischäummittel, die den Belebtschlamm hemmen, dürfen nicht eingesetzt werden.

Schlamm, der sich am oberen Ende der Belüftungsgefäße (und im Falle der „OECD-Confirmatory Test“-Anlage am Boden des Absetzgefäßes sowie im Rücklaufsystem) angesammelt hat, muß mindestens einmal täglich durch Bürsten oder andere geeignete Maßnahmen in die Kultursuspension zurückgeführt werden.

Wenn der Schlamm sich nicht absetzt, kann seine Dichte durch Zugabe von 2 ml einer 5%igen Eisen(III)chloridlösung erhöht werden; dies wird so oft wie nötig wiederholt.

Der Ablauf wird 20 bis 24 Stunden lang in den Gefäßen (E) oder (F) gesammelt; bevor eine Probe genommen wird, muß gründlich gemischt werden. Die Gefäße (E) oder (F) sind sorgfältig zu reinigen.

Um die Effektivität des Verfahrens zu verfolgen und zu kontrollieren, werden CSB oder DOC des Filtrats vom gesammelten Ablauf mindestens zweimal wöchentlich gemessen. Ebenso werden CSB und DOC des filtrierten Zulaufs bestimmt. Zur Filtration werden Membranfilter, Porengröße 0,45µm benutzt; die jeweils ersten 20 ml des Filtrats werden verworfen.

Die Differenz im CSB- oder DOC-Gehalt aufeinanderfolgender Messungen wird geringer, wenn sich der Abbauprozess stabilisiert.

Der Trockensubstanzgehalt (in g/l) des Belebtschlammes im Belüftungsgefäß sollte ebenfalls zweimal wöchentlich bestimmt werden. Die Anlagen können nach zweierlei Arbeitsweisen betrieben werden: Entweder wird der Trockensubstanzgehalt des Belebtschlammes zweimal wöchentlich bestimmt (falls er höher als 2,5 g/l liegt, muß der überschüssige Belebtschlamm verworfen werden) oder es werden täglich 500 ml der Kultursuspension aus den Belüftungsgefäßen entfernt, so daß sich für den Schlamm eine mittlere Verweilzeit von sechs Tagen ergibt.

Wenn die gemessenen und geschätzten Parameter (dies sind: Effektivität des Verfahrens (CSB- oder DOC-Abnahme, Schlammkonzentration, Absetzbarkeit des Schlammes, Trübung des Überstands usw.) der beiden Anlagen ausreichend stabil sind, kann die Prüfsubstanz, wie unter 1.6.2.2 beschrieben, in den Zulauf einer der beiden Anlagen gegeben werden.

Alternativ kann die Prüfsubstanz zu Beginn der Schlammwachstumsphase (1.6.2.1.) hinzugefügt werden, insbesondere dann, wenn Belebtschlamm als Inokulum eingesetzt wird.

1.6.2.2. Prüfverfahren

Unter Einhaltung der Betriebsbedingungen der Anlaufphase wird die Stammlösung der Prüfsubstanz (etwa 1 %ig) dem Zulauf der Prüfanlage zugesetzt, so daß die Substanz in der gewünschten Konzentration vorliegt (etwa 10–20 mg DOC/l oder 40 mg CSB/l).

Die Stammlösung kann hierfür entweder täglich dem Abwasser beigemischt oder mittels eines getrennten Pumpsystems der Kultursuspension zugesetzt werden. Die Konzentration kann schrittweise bis zur gewünschten Konzentration erhöht werden. Wenn die Prüfsubstanz auf den Belebtschlamm nicht toxisch wirkt, können auch höhere Konzentrationen als oben angegeben geprüft werden.

In die Kontrollanlage wird nur Abwasser, aber keine Prüfsubstanz gegeben. Vom Ablauf werden geeignete Mengen für die Analyse entnommen und membranfiltriert (Porengröße 0,45 µm), wobei die ersten 20 ml des Filtrats verworfen werden.

Die filtrierten Proben müssen entweder am gleichen Tag analysiert oder bis zur Analyse durch geeignete Methoden konserviert werden (z. B. durch 0,05 ml einer 1 %igen Quecksilberchloridlösung/10 ml Filtrat oder indem sie bei 2 bis 4 °C bis zu 24 Stunden oder bei –18 °C für längere Zeit aufbewahrt werden).

Die Anlaufphase ab Zugabe der Prüfsubstanz sollte sechs Wochen nicht überschreiten; die Auswertungsphase sollte nicht kürzer als drei Wochen sein, so daß 14 bis 20 Bestimmungen für die Berechnung des Endergebnisses zur Verfügung stehen.

Gekoppelte Anlagen

Die Anlagen werden gekoppelt, indem 1 × täglich 2,5 Liter der Kultursuspension (einschl. Schlamm) aus den Belüftungsgefäßen zwischen den beiden Anlagen ausgetauscht werden. Wenn die Prüfsubstanz stark adsorbiert, werden 1,5 Liter des Überstands aus den Absetzgefäßen entnommen und jeweils in das Belüftungsgefäß der anderen Anlage gegeben.

1.6.2.3. Analytik

Um das Verhalten der Prüfsubstanz zu verfolgen, werden zwei Arten von Analysen durchgeführt:

DOC- und CSB-Analysen

Die DOC-Konzentrationen werden in doppelter Ausführung mit einem Kohlenstoffanalysator gemessen und/oder die CSB-Werte nach Lit. 2 bestimmt.

Spezifische Analyse

Die Konzentrationen der Prüfsubstanz werden mit einer geeigneten analytischen Methode bestimmt. Wenn möglich, soll auch die an den Schlamm adsorbierte Substanz erfaßt werden.

2. DATEN UND AUSWERTUNG

2.1. Gekoppelte Anlagen

Wird das Verfahren mit gekoppelten Anlagen angewandt, ist die prozentuale Abnahme (DR) gemäß 1.2.1 täglich zu berechnen.

Diese täglich berechneten Werte der Abnahme werden zu DR_c korrigiert, da die Übertragung von Material durch die Überimpfung zu berücksichtigen ist. Dies erfolgt nach Gleichung [2] für eine mittlere Aufenthaltszeit von drei Stunden und nach Gleichung [3] für eine mittlere Retentionszeit von sechs Stunden.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Der Mittelwert der Reihe von DRc-Werten wird errechnet, die Standardabweichung ergibt sich nach Gleichung [4]

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n-1}} \quad [4]$$

Darin sind:

S_{DRc} = Standardabweichung der Reihe von DRc-Werten,

\overline{DRc} = Mittelwert der DRc-Werte,

n = Anzahl der Bestimmungen.

Ausreißer in der Reihe der DRc-Werte werden nach geeigneten statistischen Verfahren, z. B. nach Nalimov [6], bei einer statistischen Sicherheit von 95 % eliminiert; Mittelwert und Standardabweichung werden aus den ausreißerfreien DRc-Daten neu berechnet:

Das Endresultat wird dann mit der Gleichung [5] errechnet.

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} S_{DRc} \quad [5]$$

Darin sind:

$t_{n-1; \alpha}$ = Tabellenwert von t für n Wertepaare von e und E_0 und einem statistischen Vertrauensbereich P ($P = 1 - \alpha$), wobei P = 95 % gesetzt wird (1).

Als Ergebnis wird der Mittelwert mit einer Sicherheit von 95 %, die jeweilige Standardabweichung, die Anzahl an Daten der ausreißerfreien DRc-Werte sowie die Anzahl der Ausreißer angegeben.

Beispiel:

$DRc = 98,6 \pm 2,3\%$ DOC-Abnahme,

$s = 4,65\%$ DOC-Abnahme,

$n = 18$,

x = Anzahl der Ausreißer.

2.2. Nicht gekoppelte Anlagen

Die Betriebsleistung der Anlagen kann folgendermaßen überprüft werden:

$$\% \text{ Abnahme des CSB oder DOC} = \frac{\text{CSB oder DOC des Abwassers} - \text{CSB oder DOC des Ablaufs}}{\text{CSB oder DOC des Abwassers}} \times 100$$

Wenn die täglich gemessene Abnahme graphisch dargestellt wird, werden alle Trends, z. B. eine Adaptation, verdeutlicht.

2.2.1. Verfahren mit CSB/DOC-Bestimmungen

Die täglich gemessene prozentuale Abnahme DR wird gemäß 1.2.1 berechnet. Der Mittelwert der Reihe von DR-Werten wird errechnet; die Standardabweichung ergibt sich nach [6]

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

Darin sind:

S_{DR} = Standardabweichung der Reihe von DR-Werten,

\overline{DR} = Mittelwert der DR-Werte,

n = Anzahl der Bestimmungen.

Ausreißer in der Reihe der DR-Werte werden nach geeigneten statistischen Verfahren, z. B. nach Nalimov [6], bei einer statistischen Sicherheit von 95 % eliminiert; Mittelwert und Standardabweichung werden aus den ausreißerfreien DR-Daten neu berechnet.

Das Endresultat wird dann mit der Gleichung [7] errechnet.

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} S_{DR} \quad [7]$$

Darin sind:

$t_{n-1;\alpha}$ = Tabellenwert von t für n Wertepaare von E und E_O und einem statistischen Vertrauensbereich P ($P = 1 - \alpha$), wobei P = 95 % gesetzt wird (1).

Als Ergebnis wird der Mittelwert mit Toleranzgrenzen bei einer statistischen Sicherheit von 95 %, die jeweilige Standardabweichung und die Anzahl an Daten der ausreißerfreien DR-Werte sowie die Anzahl der Ausreißer angegeben.

Beispiel:

DR = (98,6 ± 2,3 %) DOC-Abnahme,

s = 4,65 % DOC-Abnahme,

n = 18,

x = Anzahl der Ausreißer.

2.2.2. Verfahren mit spezifischer Analyse

Die Eliminierung der Prüfsubstanz in % aus der wäßrigen Phase (R_W) wird gemäß 1.2.2 berechnet.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- das in Anlage 3 gegebene Formblatt mit den Betriebsbedingungen des Tests;
- die Angabe der verwendeten Anlage (OECD Confirmatory Test oder „Porous pot“);
- die Angabe der Verfahrensweise: gekoppelte oder nicht gekoppelte Anlagen;
- eine Beschreibung des Abwassers: künstliches oder kommunales Wasser; bei kommunalem Abwasser: Datum oder Ort der Probenahme;
- die Art des Inokulums; Datum und Ort der Probenahme;
- die Angabe und Beschreibung der Methoden, nach denen spezifische Analysen durchgeführt wurden;
- eine graphische Auftragung der CSB- und DOC-Abnahme gegen die Zeit während der Anlauf- und der Bewertungszeit;
- die analytische Wiederfindungsrate der Prüfsubstanz als CSB oder DOC in der Stammlösung;
- bei Durchführung spezifischer Analysen: graphische Auftragung der prozentualen Abnahme der Prüfsubstanz aus der wäßrigen Phase gegen die Zeit während der Anlauf- und Bewertungsphase;
- die mittlere Abnahme von DOC, CSB oder Prüfsubstanz und die Standardabweichungen aus den Ergebnissen während der Auswertungsphase, nachdem sich die Abnahme der Prüfsubstanz stabilisiert oder sich eine Periode stabiler Verhältnisse eingestellt hat;
- eine graphische Auftragung der Belebtschlammkonzentration gegen die Zeit;
- alle den Belebtschlamm betreffenden Manipulationen und Beobachtungen (Verwerfen von überschüssigem Schlamm, Eisen(III)chlorid usw.);
- die im Test eingesetzte Konzentration der Prüfsubstanz;
- alle Ergebnisse der Schlammanalysen;
- alle Informationen und Versuchsergebnisse über die Prüfsubstanz und — falls verwendet — über die Kontrollsubstanz;
- wissenschaftliche Begründung für alle etwaigen Verfahrensänderungen.

3.2. Interpretation der Ergebnisse

Ursache für eine geringe Abnahme der Prüfsubstanz in der wäßrigen Phase kann eine Hemmung der Mikroorganismen durch die Prüfsubstanz sein. Dies kann sich auch an einer Schlammauflösung und an einem Schlammverlust zeigen, was zu einem trüben Überstand sowie zu einer abnehmenden Effektivität der CSB- oder DOC-Abnahme in der Anlage führt.

Physikochemische Adsorption kann manchmal eine Rolle spielen. Zwischen biologischem Abbau des Moleküls und physikochemischer Adsorption kann unterschieden werden, wenn der Schlamm nach einer Desorption analysiert wird.

Soll zwischen vollständigem (oder teilweisem) biologischen Abbau und Adsorption unterschieden werden, sind weitere Tests erforderlich. Hierfür bieten sich mehrere Möglichkeiten an; am besten verwendet man jedoch den Überstand aus dem Absetzgefäß als Inokulum in einem Grundstufen-Test (vorzugsweise mit respiratorischer Messung).

Hohe DOC- oder CSB-Abnahmen werden in der Regel durch biologischen Abbau verursacht; bei geringer Abnahme kann dagegen nicht zwischen biologischem Abbau und Elimination und Adsorption unterschieden werden. Zeigt beispielsweise eine lösliche Verbindung eine hohe Adsorptionsrate von 98 % und werden täglich 10 % des Überschufschlammes entfernt, so ist allein hierdurch eine Elimination bis zu 40 % möglich. Werden täglich 30 % des Überschufschlammes entfernt, kann die Elimination aufgrund der Adsorption an und der Entfernung mit Überschufschlamm auf 65 % steigen (4).

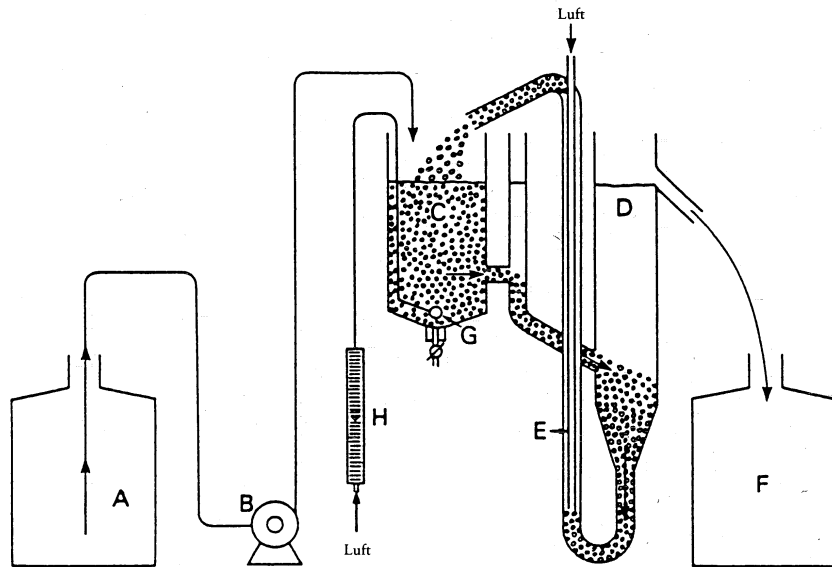
Bei spezifischen Analysen muß darauf geachtet werden, welche Bedeutung die Struktur der Substanz für die eingesetzte spezifische Analyse hat. Eine Abnahme der Substanz, bestimmt durch spezifische Analyse, kann nicht als Mineralisierung der Substanz interpretiert werden.

4. LITERATUR

- (¹) OECD, Paris 1981, *Test Guideline 303 A*, Beschluß des Rates C(81)30 final.
- (²) Anhang V; C 9; Abbaubarkeit — Chemischer Sauerstoffbedarf — Richtlinie der Kommission 84/449/EWG (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 251 von 1984).
- (³) H. A. Painter and E. F. King, *WRC Porous Pot method for assessing biodegradability*. Technical Report TR70. June 1978, Water Research Center, Vereinigtes Königreich.
- (⁴) Wierich P., and Gerike P., The Fate of Soluble, Recalcitrant, and Absorbing Compounds in Activated Sludge Plants — *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol 5, Nr. 2 — June 1981, S. 161 bis 171.
- (⁵) Richtlinien 82/242/EWG und 82/243/EWG des Rates (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 109 vom 22. 4. 1982), zur Anpassung der Richtlinien 73/404/EWG und 73/405/EWG des Rates — *Biodegradability of detergents* — Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 347 vom 17. 12. 1973.
- (⁶) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie* 303 (1980), S. 406 bis 408.

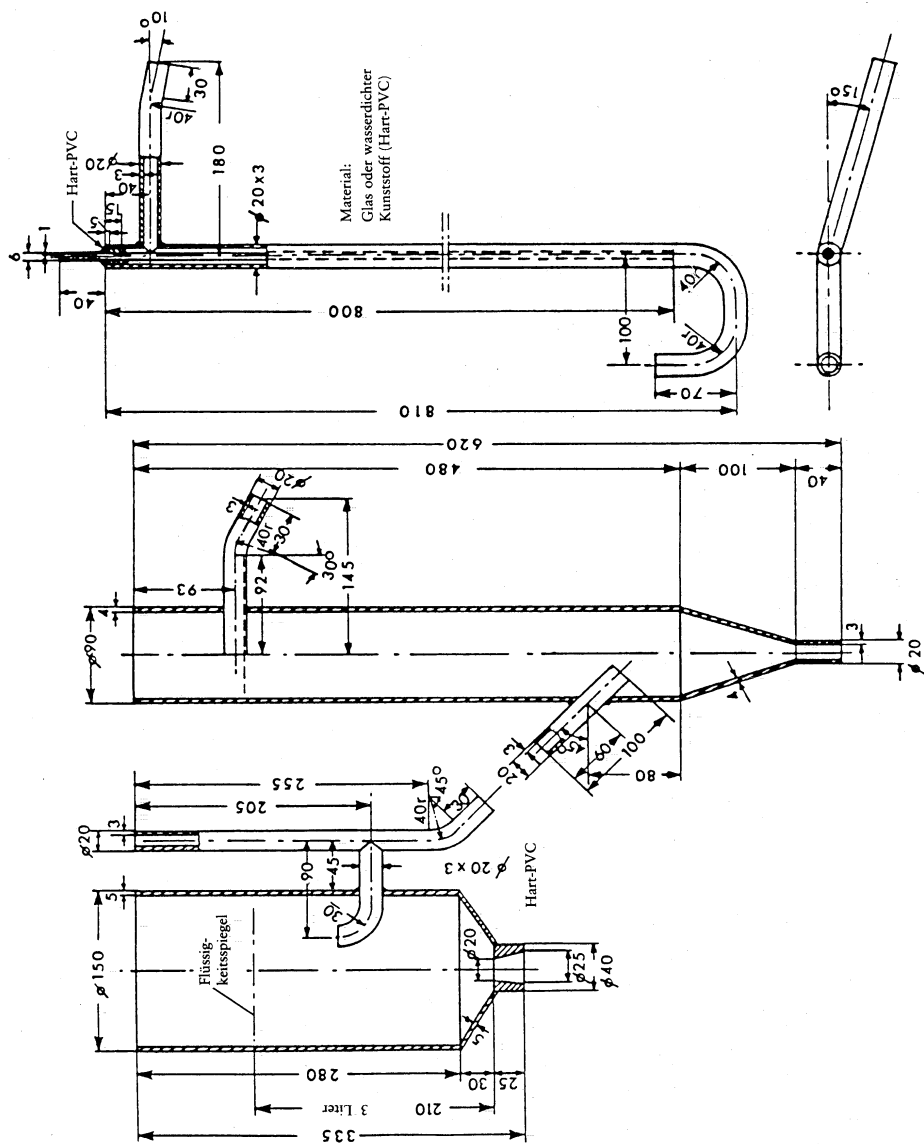
ANLAGE 1

Abbildung 1...



- | | |
|--|-----------------------------------|
| A = Vorratsgefäß, | E = Druckluftheber, |
| B = Dosiergerät, | F = Sammelgefäß, |
| C = Belüftungsgefäß (Volumen 3 Liter), | G = Verteiler, |
| D = Absetzgefäß, | H = Belüftungsmesser (wahlweise). |

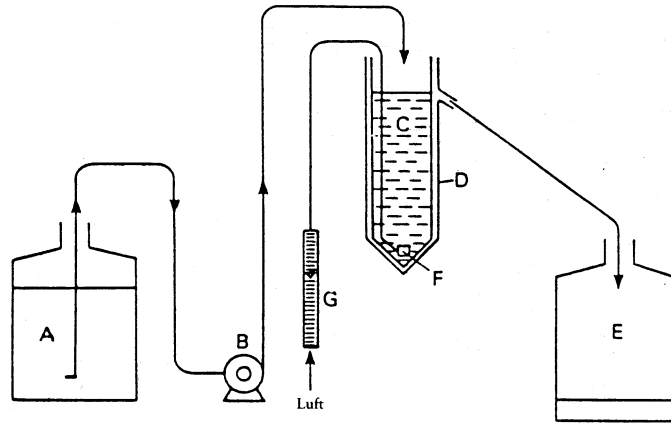
Abbildung 2



ANLAGE 2

Abbildung 1

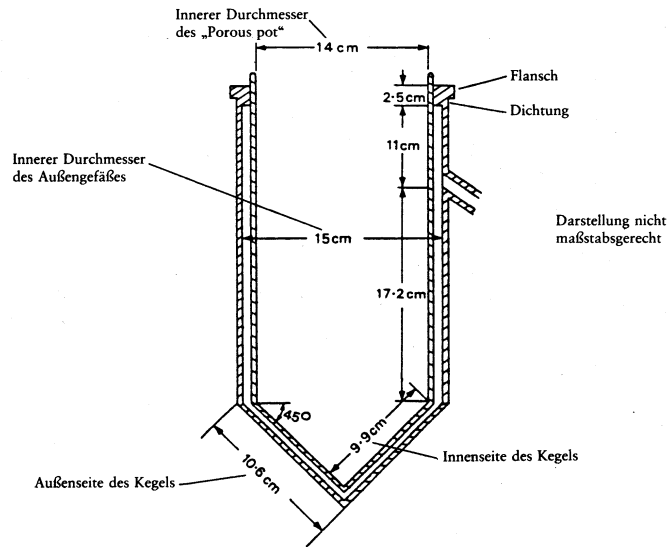
„Porous pot“-Anlage



- | | |
|---------------------------------|-----------------------------------|
| A = Vorratsgefäß, | E = Auffanggefäß, |
| B = Dosierpumpe, | F = Lüftungsstein, |
| C = Poren-Belüftungsgefäß, | G = Belüftungsmesser (wahlweise). |
| D = undurchlässiges Außengefäß, | |

Abbildung 2

Einzelheiten der 3-Liter-„Porous pot“-Belüftungseinheit



Anlage 3

Betriebsbedingungen des Simulationstests mit Belebtschlamm

In jeder Gruppe durchgeführte Kontrollen

Anlage

OECD Confirmatory
Porous Pot

Betriebsweise

einzelne Anlage
gekoppelte Anlage
nicht gekoppelte Anlage

Überimpfung

keine
Belebtschlamm
Überstand

Mittlere Verweilzeit

3 Stunden
6 Stunden

Ausgangsnährmedium

kommunales Abwasser
synthetisches Abwasser

Inokulum

Kläranlagenablauf
Mischinokulum
Belebtschlamm

Zugabe der Prüfsubstanz

bei Beginn
schrittweiser Anstieg
nach der Schlamm Bildung

Analysen

spezifisch
CSB
DOC

BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT

BELEBTSCHLAMM: PRÜFUNG DER ATMUNGSHEMMUNG

1. METHODE

1.1. Einleitung

Die beschriebene Methode dient zur Bestimmung der Auswirkungen einer Prüfsubstanz auf Mikroorganismen durch Messen der Sauerstoffzehrung. Die Prüfung erfolgt unter festgelegten Bedingungen bei unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfsubstanz.

Zweck dieser Methode ist die Schaffung eines schnellen Auswahlverfahrens, mit dem sich Substanzen feststellen lassen, die sich ungünstig auf Kläranlagen mit aeroben Mikroorganismen auswirken, sowie die Angabe geeigneter, nicht hemmender Konzentrationen von Prüfsubstanzen, die bei Prüfungen der biologischen Abbaubarkeit eingesetzt werden können.

Ein Vorversuch kann der eigentlichen Prüfung vorausgehen. Er liefert Informationen über den in der eigentlichen Prüfung zu verwendenden Konzentrationsbereich.

Die Versuchsdurchführung schließt zwei Kontrollen ohne Prüfsubstanzen ein, von denen die eine zu Beginn und die andere am Ende der Prüfreiheit durchgeführt wird. Jede Belebtschlammprobe ist außerdem mit Hilfe einer Referenzsubstanz zu überprüfen.

Dieses Verfahren ist am einfachsten bei Substanzen anzuwenden, die aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit und geringen Flüchtigkeit voraussichtlich im Wasser verbleiben.

Für Substanzen mit begrenzter Löslichkeit im Prüfmedium kann der EC_{50} -Wert möglicherweise nicht bestimmt werden.

Wenn die Prüfsubstanz eine Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung bewirkt, können die auf der Sauerstoffaufnahme beruhenden Ergebnisse zu falschen Schlußfolgerungen führen.

Zur Durchführung der Prüfung sind folgende Informationen von Nutzen:

- Wasserlöslichkeit,
- Dampfdruck,
- Strukturformel,
- Reinheit der Prüfsubstanz.

Empfehlung:

Belebtschlamm kann pathogene Organismen enthalten und ist daher mit Vorsicht zu handhaben.

1.2. Definitionen und Einheiten

Als Sauerstoffzehrung wird der Sauerstoffverbrauch der im Belebtschlamm enthaltenen Mikroorganismen bezeichnet. Diese Zehrung wird im allgemeinen in mg O_2 je mg Schlamm und Stunde ausgedrückt.

Zur Berechnung der Hemmwirkung einer Prüfsubstanz bei einer bestimmten Konzentration wird die Sauerstoffzehrung als Prozentsatz der Sauerstoffzehrung der gemittelten Werte der beiden Kontroll-Zehrungen ausgedrückt:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{RC_1 + RC_2}\right) \times 100 = \text{Hemmung in Prozent}$$

Hierbei sind:

R_s = Sauerstoffzehrung bei der geprüften Konzentration der Prüfsubstanz,

RC_1 = Sauerstoffzehrung der Kontrolle 1,

RC_2 = Sauerstoffzehrung der Kontrolle 2.

Bei diesem Verfahren ist die EC_{50} die Konzentration der Prüfsubstanz, bei der die Sauerstoffzehrung 50% der in der Kontrolle unter gleichen Bedingungen erreichten Zehrung ausmacht.

1.3. Referenzsubstanzen

Es wird empfohlen, 3,5-Dichlorphenol, das als Hemmstoff bekannt ist, als Referenzsubstanz zu verwenden und bei jeder einzelnen Belebtschlammprobe hiermit die EC_{50} zu prüfen, um eine anomale Empfindlichkeit des Schlammes festzustellen.

1.4. Prinzip der Prüfmethode

Die Sauerstoffzehrung eines Belebtschlammes, der mit einer genormten Menge synthetischen Abwassers beschickt wurde, wird nach Kontaktzeiten von 30 Minuten und/oder 3 Stunden gemessen. Ebenso wird die Sauerstoffzehrung desselben Belebtschlammes, dem jedoch unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz zugesetzt wurden, gemessen. Die Hemmwirkung der Prüfsubstanz bei einer bestimmten Konzentration wird als Prozentsatz der durchschnittlichen Sauerstoffzehrung von zwei Kontrollen ausgedrückt. Aus Bestimmungen bei verschiedenen Konzentrationen wird die EC_{50} errechnet.

1.5. Qualitätskriterien

Die Prüfergebnisse sind gültig, sofern:

- die Sauerstoffzehrungen der beiden Kontrollen sich um höchstens 15 % voneinander unterscheiden;
- der EC_{50} -Wert (30 Minuten und/oder 3 Stunden) von 3,5-Dichlorphenol im zulässigen Bereich von 5 bis 30 mg/l liegt.

1.6. Beschreibung der Prüfmethode

1.6.1. Reagenzien

1.6.1.1. Lösungen der Prüfsubstanz

Die Lösungen der Prüfsubstanz werden aus einem Stammsatz zu Beginn jeder Untersuchung frisch zubereitet. Für das unten empfohlene Verfahren ist eine Konzentration von 0,5 g/l im Stammsatz geeignet.

1.6.1.2. Lösung der Kontrollsubstanz

Eine 3,5-Dichlorphenol-Lösung kann z. B. wie folgt zubereitet werden: 0,5 g 3,5-Dichlorphenol in 10 ml 1 M NaOH auflösen, mit destilliertem Wasser auf etwa 30 ml verdünnen, umrühren und gleichzeitig 0,5 M H_2SO_4 bis zum Beginn der Ausfällung zugeben — hierzu sind etwa 8 ml erforderlich — und schließlich die Mischung mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen. Der pH-Wert sollte dann etwa 7–8 betragen.

1.6.1.3. Synthetisches Abwasser

Synthetisches Abwasser wird durch Auflösen folgender Stoffmengen in einem Liter Wasser hergestellt:

- 16 g Pepton,
- 11 g Fleischextrakt,
- 3 g Harnstoff,
- 0,7 g NaCl,
- 0,4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,
- 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
- 2,8 g K_2HPO_4 ,

Anmerkung 1: 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.

Anmerkung 2: Wenn das vorbereitete synthetische Abwasser nicht sofort benutzt wird, wird es im Dunkeln bei 4 °C unter Bedingungen, die keine Veränderung seiner Zusammensetzung verursachen, für nicht länger als eine Woche aufbewahrt. Das synthetische Abwasser kann auch vor der Lagerung sterilisiert werden, oder Pepton und Fleischextrakt können kurz vor dem Versuchsansatz zugegeben werden. Es wird vor Gebrauch gründlich gemischt und der pH-Wert eingestellt.

1.6.2. Geräte

Meßanlage: Die Form der Anlage ist nicht entscheidend. Es darf jedoch kein Luftraum in der gefüllten Meßflasche sein, und die Sauerstoffelektrode muß genau in deren Hals passen.

Ergänzend zur normalen Laboratoriumsausrüstung sind insbesondere folgende Geräte erforderlich:

- Meßanlage
- Belüftungseinrichtung
- pH-Elektrode
- O_2 -Elektrode.

1.6.3. *Vorbereitung des Inokulums*

Als Inokulum für die Prüfung wird Belebtschlamm aus einer vorwiegend kommunalen Kläranlage verwendet.

Falls notwendig, können grobe Teilchen daraus durch kurzzeitiges Absetzen, z. B. für 15 Minuten, und Dekantieren der oberen Schicht abgetrennt werden. Alternativ kann der Schlamm durch kurzzeitiges Mischen — einige Sekunden — mit einem Hochleistungsrührer homogenisiert werden. Zusätzlich sollte bei Verdacht auf Anwesenheit von Hemmstoffen der Schlamm mit Trinkwasser oder einer isotonischen Lösung gewaschen werden. Der Überstand wird nach Zentrifugation dekantiert. (Dieser Vorgang wird dreifach wiederholt.)

Eine kleine Menge des Schlammes wird gewogen und getrocknet. Daraus kann die Menge feuchten Schlammes berechnet werden, die in Wasser suspendiert werden muß, um einen Schlammgehalt zwischen 2 und 4 g/l einzustellen. Dies ergibt einen Schlammgehalt zwischen 0,8 und 1,6 g/l im Kulturmedium, wenn die unten vorgeschlagene Verfahrensweise befolgt wird.

Kann der Schlamm nicht am Tag der Entnahme verwendet werden, gibt man 50 ml synthetischen Abwassers zu jedem Liter des wie oben beschrieben zubereiteten Belebtschlammes hinzu. Diese Mischung wird dann bis zur Verwendung am nächsten Tag sowie während des Versuchs bei 20 ± 2 °C belüftet. Vor der Verwendung wird der pH-Wert der Mischung geprüft und — falls erforderlich — mit Hilfe einer Natriumbikarbonatlösung auf einen pH-Wert von 6,0 bis 8,0 abgepuffert.

Die in der Flüssigkeit suspendierten Feststoffe sind nach dem im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Verfahren zu bestimmen.

Muß die gleiche Schlammprobe an aufeinanderfolgenden Tagen (höchstens 4 Tage) verwendet werden, gibt man weitere 50 ml synthetischen Abwassers pro Liter Schlamm am Ende jedes Arbeitstages hinzu.

1.6.4. *Durchführung der Prüfung*

Kontaktzeit/Dauer:	30 Minuten und/oder 3 Stunden unter ständiger Belüftung
Wasser:	Trinkwasser (entchlort, falls erforderlich)
Luftversorgung:	saubere, ölfreie Luft. Luftstrom: 0,5 bis 1 Liter/Minute
Meßanlage:	Gefäß mit flachem Boden, beispielsweise eine BSB-Flasche
Sauerstoffmeßgerät:	geeignete Sauerstoffelektrode mit Anzeige
Nährlösung:	synthetisches Abwasser (siehe oben)
Prüfsubstanz:	die Prüflösung wird zu Beginn der Prüfung frisch zubereitet
Referenzsubstanz:	beispielsweise 3,5-Dichlorphenol (mindestens 3 Konzentrationen)
Kontrollen:	beimpfter Ansatz ohne Prüfsubstanz
Temperatur:	20 ± 2 °C.

Für eine dreistündige Kontaktzeit kann folgendes Versuchsverfahren sowohl für die Prüf- als auch für die Referenzsubstanz angewandt werden:

Es werden mehrere Gefäße (beispielsweise 1-Liter-Bechergläser) verwendet.

Es sind mindestens 5 Konzentrationen, die sich durch einen konstanten Faktor (möglichst nicht über 3,2) unterscheiden, zu verwenden.

Zum Zeitpunkt „0“ werden 16 ml des synthetischen Abwassers mit Wasser auf 300 ml aufgefüllt. Dann werden 200 ml des Inokulums zugesetzt und die Gesamtmischung (500 ml) in das erste Gefäß gegeben (erste Kontrolle C₁).

Die Versuchsgefäße sollten kontinuierlich belüftet werden, so daß sichergestellt ist, daß die Konzentration an gelöstem Sauerstoff 2,5 mg/l nicht unterschreitet und daß unmittelbar vor Messung der Sauerstoffzehrung die Sauerstoffkonzentration mindestens 6,5 mg/l beträgt.

Zum Zeitpunkt „15 Minuten“ (15 Minuten sind ein willkürliches, jedoch geeignetes Intervall) wird der oben beschriebene Vorgang wiederholt. Diesmal werden jedoch 100 ml der Prüfsubstanz-Stammlösung zu den 16 ml synthetischen Abwassers zugegeben und anschließend mit Wasser auf 300 ml aufgefüllt. Dann wird das Inokulum zugesetzt und das Volumen auf 500 ml aufgefüllt. Diese Mischung wird in das zweite Gefäß gegeben und wie oben beschrieben belüftet.

Dieser Vorgang wird in Abständen von 15 Minuten mit unterschiedlichen Mengen der Prüfsubstanz-Stammlösung wiederholt, um eine Reihe von Gefäßen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfsubstanz zu erhalten. Schließlich wird eine zweite Kontrolle hergestellt (C₂).

Nach drei Stunden wird der pH-Wert gemessen, dann eine gut gemischte Probe des Inhalts des ersten Gefäßes in die Meßanlage gegeben und die Sauerstoffzehrung über einen Zeitraum von höchstens 10 Minuten gemessen.

Diese Zehrungsmessung wird mit den Inhalten der einzelnen Gefäße in Intervallen von 15 Minuten durchgeführt, so daß die Kontaktzeit in jedem Gefäß drei Stunden beträgt.

Die Referenzsubstanz wird bei jeder Probe des Inokulums auf die gleiche Weise geprüft.

Ein geändertes Verfahren (beispielsweise mit mehr als einem Sauerstoffmeßgerät) ist erforderlich, falls die Messungen nach 30 Minuten Kontaktzeit durchgeführt werden sollen.

Ist eine Messung des chemischen Sauerstoffbedarfs erforderlich, werden weitere Gefäße mit Prüfsubstanz, synthetischem Abwasser und Wasser, jedoch ohne Belebtschlamm, vorbereitet. Der Sauerstoffbedarf wird nach einer Belüftungszeit von 30 Minuten und/oder drei Stunden Kontaktzeit gemessen und aufgezeichnet.

2. DATEN UND AUSWERTUNG

Die Sauerstoffzehrung wird aus der Aufzeichnung des Meßschreibers zwischen etwa 6,5 mg O₂/l und 2,5 mg O₂/l oder, bei niedriger Sauerstoffzehrung, über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen und als mg O₂/l · h berechnet.

Der Teil der Zehrungskurve, bei dem die Zehrung gemessen wird, sollte linear sein.

Sofern die Sauerstoffzehrungen der beiden Kontrollen mehr als 15 % voneinander abweichen oder der EC₅₀-Wert (30 Minuten und/oder 3 Stunden) der Referenzsubstanz nicht im gültigen Bereich liegt (5 bis 30 mg/l für 3,5-Dichlorphenol), ist die Prüfung ungültig und muß wiederholt werden.

Der Prozentsatz der Hemmung wird für jede Prüfkonzentration wie oben beschrieben berechnet, auf normalem Logarithmenpapier (oder Wahrscheinlichkeitspapier) gegen die Konzentration aufgetragen und der EC₅₀-Wert hieraus ermittelt. 95 %-Vertrauensbereiche der EC₅₀-Werte werden nach Standardverfahren ermittelt.

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Prüfsubstanz: chemische Kenndaten;
- Prüfsystem: Herkunft, Konzentration sowie sämtliche Vorbehandlungen des Belebtschlammes.

Prüfbedingungen:

- pH der Kulturlösung vor der Zehrungsmessung;
 - Temperatur bei der Prüfung;
 - Dauer der Prüfung;
 - Referenzsubstanz und ihr gemessener EC₅₀-Wert;
 - abiotische Sauerstoffzehrung (sofern diese auftritt).
- Ergebnisse
- sämtliche gemessenen Werte;
 - Hemmkurve und Verfahren zur Berechnung des EC₅₀-Wertes;
 - EC₅₀-Wert und — falls möglich — EC₂₀- und EC₁₀-Werte mit 95 %-Vertrauensbereichen;
 - sämtliche Beobachtungen sowie Abweichungen von diesem Prüfverfahren, die möglicherweise das Ergebnis beeinflusst haben.

3.2. Interpretation der Werte

Der EC₅₀-Wert sollte vornehmlich nur als Hinweis auf die mögliche Toxizität der Prüfsubstanz, entweder gegenüber dem Belebtschlamm bei der Abwasserbehandlung oder gegenüber Abwasser-Mikroorganismen, angesehen werden, da die in der Umwelt stattfindenden komplexen Wechselwirkungen bei einer Laboratoriumsprüfung nicht vollständig simuliert werden können.

Weiterhin können nitrifikationshemmende Substanzen atypische Hemmkurven verursachen. Solche Kurven sollten deshalb mit Vorsicht interpretiert werden.

4. LITERATUR

- (1) International Standard ISO 8192—1986
 - (2) Broecker, B. and Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, S. 165.
 - (3) Brown D., Hitz, H. R. and Schaefer L., *Chemosphere* 10, 245 (1981).
 - (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries) *Recommended Method No. 103*, also Described by
 - (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, (1976), S. 80.
 - (6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, (1977), S. 247.
 - (7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*, Beschluß des Rates C(81)30 endg.
-

BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT

MODIFIZIERTER S.C.A.S-TEST

1. METHODE

1.1. Einleitung

Zweck des Verfahrens ist die Prüfung der potentiellen vollständigen biologischen Abbaubarkeit von wasserlöslichen, nichtflüchtigen organischen Stoffen, die längere Zeit relativ hohen Konzentrationen von Mikroorganismen ausgesetzt werden. Durch tägliche Zugabe von Abwasser als Nährlösung werden die Mikroorganismen während der Versuchszeit am Leben erhalten. An Wochenenden kann das Abwasser bei 4 °C aufbewahrt werden. Wahlweise kann auch das „synthetische“ Abwasser des OECD-Bestätigungstestes verwendet werden.

Tritt eine physikalisch-chemische Adsorption der Prüfsubstanz an die suspendierten Feststoffe auf, muß dies bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden (siehe Randziffer 3.2.). Wegen der langen Verweilzeit der flüssigen Phase in der Belüftungseinheit (36 Stunden) und der zwischenzeitlichen Zugabe von Nährstoffen simuliert der Test nicht die in einer Kläranlage üblichen Bedingungen. Die für verschiedene Prüfsubstanzen vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, daß das biologische Abbaupotential des Tests hoch ist.

Die Testbedingungen sind für die Selektion und/oder Adaptation von Mikroorganismen, die die Prüfsubstanzen abzubauen vermögen, äußerst günstig.

(Dieses Verfahren kann auch zur Herstellung akklimatisierten Impfgutes für andere Prüfungen angewandt werden.)

Bei dieser Methode wird die Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) als Maß zur Beurteilung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit der Prüfsubstanz benutzt. Der Gehalt an gelöstem organischem Kohlenstoff ist vorzugsweise nach Ansäuerung und strippen und *nicht* als Differenz zwischen Gesamtkohlenstoffgehalt und anorganischem Kohlenstoff zu bestimmen.

Werden gleichzeitig spezifische Analysen durchgeführt, kann der Primärabbau (Verschwinden der chemischen Ausgangsstruktur) des Stoffes beurteilt werden.

Mit diesem Verfahren können nur organische Stoffe geprüft werden, die bei der verwendeten Konzentration

- in Wasser löslich sind (mindestens 20 mg DOC/L);
- einen niederen Dampfdruck aufweisen;
- die Bakterien nicht hemmen;
- innerhalb des Prüfsystems nicht nennenswert adsorbieren;
- nicht durch Schäumen aus der Testlösung verlorengehen.

Der organische Kohlenstoffgehalt der Prüfsubstanz ist zu bestimmen.

Informationen über die relativen Anteile der Hauptkomponenten der Prüfsubstanz sind für die Interpretation der Ergebnisse insbesondere dann nützlich, wenn niedrige oder marginale Abbau-Werte erhalten werden.

Informationen über die Toxizität des Stoffes gegenüber Mikroorganismen sind zur Interpretation niedriger Abbauwerte sowie zur Auswahl geeigneter Prüfkonzentrationen nützlich.

1.2. Definitionen und Einheiten

C_T = Konzentration der Prüfsubstanz, bestimmt als zu Beginn der Belüftungszeit vorhandener oder hinzugegebener organischer Kohlenstoff (mg/L);

C_t = Konzentration des organischen Kohlenstoffs in der nach Belüftung und anschließender Sedimentation überstehenden Flüssigkeit in der Prüfeinheit (mg/L);

C_c = Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs in der nach Belüftung und anschließender Sedimentation überstehenden Flüssigkeit der Kontrolleinheit (mg/L).

Der biologische Abbau wird in dieser Vorschrift als Abnahme des Gehalts an organischem Kohlenstoff definiert. Er läßt sich wie folgt darstellen:

1. als prozentuale Abnahme D_{da} der täglich hinzugegebenen Stoffmenge:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

D_{da} = Abbau/Tägliche Zugabe.

2. Als prozentuale Abnahme D_{ssd} der zu Beginn eines jeden Tages im Testsystem vorhandenen Stoffmenge:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ci} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ci} - C_{ci}} \times 100 \quad [2 a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2 b)]$$

D_{ssd} = Abbau/Stoff zu Beginn des Tages.

Die Indizes i und $(i+1)$ beziehen sich auf den Tag der Messung. Gleichung 2a) wird empfohlen, wenn der DOC-Gehalt der entnommenen Kultursuspension täglichen Schwankungen unterworfen ist, während Gleichung 2b) benutzt werden kann, wenn der DOC-Gehalt von Tag zu Tag relativ konstant bleibt.

1.3. Referenzsubstanzen

Bei der Untersuchung neuer Stoffe können in einigen Fällen Referenzsubstanzen nützlich sein; jedoch können keine spezifischen Substanzen empfohlen werden.

In Anlage 1 werden Daten von mehreren Verbindungen, die in Ringversuchen geprüft worden sind, angegeben. Mit ihnen kann gelegentlich eine Kalibrierung der Methode vorgenommen sowie ein Vergleich mit Ergebnissen, die mit anderen Methoden erhalten wurden, durchgeführt werden.

1.4. Prinzip der Methode

Belebtschlamm aus einer Kläranlage wird in eine Belüftungseinheit, die halbkontinuierlich betrieben wird (Semi-Continuous Activated Sludge unit, SCAS-Einheit), gegeben. Die Prüfsubstanz sowie häusliches Abwasser werden zugesetzt und das Gemisch 23 Stunden lang belüftet. Danach läßt man den Schlamm absetzen und nimmt die überstehende Flüssigkeit ab.

Der im Kulturgefäß verbleibende Schlamm wird sodann mit einer weiteren aliquoten Menge der Prüfsubstanz sowie mit Abwasser gemischt und das Verfahren wird wiederholt.

Der biologische Abbau wird durch Bestimmung des DOC-Gehalts nach Sedimentation des Schlammes in der überstehenden Flüssigkeit ermittelt. Dieser Wert wird mit dem entsprechenden der Kontrolleinheit verglichen.

Wird ein spezifisches Analyseverfahren angewandt, so können Veränderungen in der Konzentration der Ausgangsverbindung, die infolge des biologischen Abbaus (Primär-Abbau) auftreten, gemessen werden.

1.5. Qualitätskriterien

Die Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens, das auf der Messung der DOC-Abnahme beruht, ist noch nicht überprüft worden. (Ist der biologische Primär-Abbau zu ermitteln, so können sehr präzise Daten für Stoffe erhalten werden, die weitgehend abgebaut werden.)

Die Empfindlichkeit des Verfahrens ist weitgehend von den Schwankungen des Kontrollwerts und in geringerem Ausmaß von der Genauigkeit der Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs und der Konzentration der Prüfsubstanz in der Kultursuspension zu Beginn der einzelnen Zyklen abhängig.

1.6. Prüfverfahren

1.6.1. Vorbereitung

Eine ausreichende Zahl von sauberen Kulturgefäßen (wahlweise kann auch die ursprüngliche SCAS-Einheit, die ein Volumen von 1,5 l faßt, angewandt werden) und Belüftungsrohren für jede Prüfsubstanz sowie die Kontrolle werden zusammengesetzt. Die den Prüfeinheiten zugeführte Druckluft muß, durch ein Wattefilter gereinigt, frei von organischem Kohlenstoff sein und zur Verminderung der Evaporationsverluste zuvor mit Wasser gesättigt werden.

Eine Mischprobe mit 1 bis 4 g suspendierten Feststoffen/l wird einer Belebtschlammanlage, in der vorwiegend häusliche Abwässer behandelt werden, entnommen.

Für jede Belüftungseinheit sind rund 150 ml Belebtschlamm erforderlich.

Stammlösungen der Prüfsubstanz werden in destilliertem Wasser zubereitet; normalerweise ist eine Konzentration von 400 mg organischen Kohlenstoffs/l erforderlich, um eine Konzentration der Prüfsubstanz von 20 mg Kohlenstoff/l zu Beginn jedes Belüftungszyklus, wenn kein biologischer Abbau erfolgt, einzustellen.

Höhere Konzentrationen sind zulässig, wenn die Toxizität gegenüber den Mikroorganismen dies erlaubt. Der Gehalt der Stammlösungen an organischem Kohlenstoff wird gemessen.

1.6.2. *Prüfbedingungen*

Der Test ist bei einer Temperatur von 20 bis 25 °C durchzuführen. Es wird eine hohe Konzentration aerober Mikroorganismen verwendet (1 bis 4 g/l suspendierte Feststoffe); die effektive Verweilzeit im Kulturgefäß beträgt 36 Stunden. Die kohlenstoffhaltigen Substanzen im zugesetzten Abwasser werden in der Regel innerhalb der ersten acht Stunden nach Beginn eines jeden Belüftungszyklus weitestgehend oxidiert. Danach atmet der Schlamm endogen; während dieser Zeit ist die Prüfsubstanz das einzig verfügbare Substrat, wenn sie nicht ebenfalls sofort abgebaut worden ist. Diese Rahmenbedingungen schaffen, zusammen mit der täglichen Wiederbeimpfung bei Verwendung von häuslichem Abwasser als Nährmedium, sowohl für die Akklimatisierung als auch für einen weitgehenden biologischen Abbau sehr günstige Voraussetzungen.

1.6.3. *Durchführung der Prüfung*

Eine gemischte Belebtschlamm-Probe wird einer geeigneten kommunalen Kläranlage, die vorwiegend häusliche Abwässer behandelt, oder einer Laboratoriumsanlage entnommen und bis zur Verwendung im Laboratorium unter aeroben Bedingungen gehalten. In jede Prüf- und Kontrolleinheit werden 150 ml (werden die Original-SCAS-Prüfeinheiten verwendet, so sind die angegebenen Volumina zu verzehnfachen) der Belebtschlamm-Suspension gegeben und dann belüftet. Nach 23 Stunden wird die Belüftung ausgeschaltet und man läßt den Schlamm 45 Minuten absetzen. Dann werden die Ablaufstutzen der einzelnen Gefäße geöffnet und aus jedem 100 ml der überstehenden Flüssigkeit entnommen. Von einer unmittelbar vor Gebrauch gezogenen Probe häuslicher Abwässer, aus dem die gröberen Partikel nach Sedimentation entfernt wurden, werden je 100 ml zu dem in den Belüftungseinheiten verbliebenen Schlamm gegeben. Sodann wird wieder belüftet. In dieser Phase werden keine Prüfsubstanzen zugesetzt. In die Einheiten wird so oft häusliches Abwasser gegeben, bis nach dem Absetzen des Schlamms eine klare überstehende Flüssigkeit erhalten wird. Dies dauert in der Regel bis zu zwei Wochen; in dieser Zeit nähert sich der gelöste organische Kohlenstoff in der überstehenden Schicht nach Abschluß der Belüftungszyklen einem konstanten Wert.

Am Ende dieser Phase werden die einzelnen abgesetzten Schlämme gemischt und jeweils 50 ml des daraus erhaltenen Mischschlammes wiederum in die einzelnen Einheiten gegeben.

95 ml abgesetztes Abwasser und 5 ml Wasser werden in den Kontrollansatz und 95 ml des abgesetzten Abwassers und 5 ml der Prüfsubstanz-Stammlösung (400 mg/l) werden in jede Prüfeinheit gegeben. Dann wird wieder für 23 Stunden belüftet. Danach läßt man den Schlamm 45 Minuten absetzen, worauf die überstehende Schicht abgenommen und auf den Gehalt an organischem Kohlenstoff untersucht wird.

Das oben beschriebene Füll- und Entnahmeverfahren wird während der Testdauer täglich wiederholt.

Vor dem Absetzen müssen eventuell die Wände der Einheiten gereinigt werden, um eine Anhaftung von Feststoffen oberhalb des Flüssigkeitsniveaus zu verhindern. Für jede Einheit sind getrennte Schaber oder Bürsten zu verwenden, um eine gegenseitige Kontamination zu vermeiden.

Im Idealfall wird der Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff in der überstehenden Kultursuspension täglich bestimmt; weniger häufige Analysen sind jedoch zulässig. Vor der Analyse werden die Suspensionen durch gewaschene Membranfilter von 0,45 µm filtriert oder zentrifugiert. Membranfilter sind geeignet, wenn sichergestellt ist, daß sie weder Kohlenstoff freisetzen noch Stoffe bei der Filtration adsorbieren. Die Temperatur der Probe darf bei der Zentrifugation 40 °C nicht übersteigen.

Die Dauer der Prüfung ist für gering oder nicht biologisch abbaubare Verbindungen unbestimmt; nach bisherigen Erfahrungen sollte sie mindestens 12, höchstens jedoch 26 Wochen betragen.

2. **DATEN UND AUSWERTUNG**

Die Gehalte an gelöstem organischen Kohlenstoff in den nach der Sedimentation überstehenden Kultursuspensionen der Prüf- und Kontrolleinheiten werden gegen die Zeit graphisch aufgetragen.

Nach Abschluß des biologischen Abbaus sollten sich die Werte der Prüfansätze demjenigen des Kontrollansatzes nähern. Bleibt die Differenz zwischen diesen beiden Werten während drei aufeinanderfolgender Messungen konstant, so werden noch so viele Messungen vorgenommen, wie es zur statistischen Auswertung der Daten erforderlich ist, und der prozentuale biologische Abbau der zu prüfenden Substanz wird berechnet (D_{da} oder D_{ssd} , siehe Randziffer 1.2.).

3. ABSCHLUSSBERICHT

3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- sämtliche Informationen über die Art des Abwassers, den Typ der benutzten Belüftungseinheit und die mit dem zu prüfenden Stoff, der Kontrolle sowie gegebenenfalls mit der Referenzsubstanz erhaltenen Versuchsergebnisse;
- Temperatur;
- Abbaukurve mit Beschreibung der Berechnungsweise (siehe Randziffer 1.2);
- Datum und Ort der Entnahme des Belebtschlammes und des Abwassers;
- Stand der Adaptation, Konzentration usw.;
- wissenschaftliche Gründe für jedwede Änderung des Prüfverfahrens;
- Unterschrift und Datum.

3.2. Interpretation der Ergebnisse

Da der mit diesem Verfahren zu prüfende Stoff biologisch nicht leicht abbaubar ist, wird jede ausschließlich auf biologischen Abbau zurückzuführende Abnahme des DOC-Gehalts in der Regel über Tage oder Wochen nur langsam erfolgen. Ausgenommen sind die Fälle, in denen eine plötzliche Akklimatisierung eintritt, erkennbar an einer raschen DOC-Abnahme.

Eine physikalisch-chemische Adsorption kann jedoch oftmals eine wichtige Rolle spielen; dies ist daran erkenntlich, daß der zugesetzte gelöste organische Kohlenstoff von Anfang an vollständig oder teilweise verschwindet. Die danach auftretenden Effekte sind von Faktoren wie dem Adsorptionsgrad und der Konzentration der suspendierten Partikel in der den Belüftungseinheiten entnommenen Suspension abhängig. Die Differenz zwischen den DOC-Konzentrationen in der Kontrolle und dem Prüfansatz nimmt zunächst in der Regel von geringen Anfangswerten fortschreitend zu und bleibt dann während der restlichen Versuchszeit konstant, sofern keine Akklimatisierung erfolgt.

Soll zwischen vollständigem (oder teilweise) biologischem Abbau und Adsorption unterschieden werden, sind weitere Tests erforderlich. Hierfür bieten sich mehrere Möglichkeiten an; am besten verwendet man jedoch den Belebtschlamm aus der Prüfeinheit oder die nach Sedimentation daraus erhaltene Kultursuspension als Inokulum in einem Grundstufen-Test (vorzugsweise respirometrisch).

Prüfsubstanzen, die eine weitgehende, nicht durch Adsorption bedingte Abnahme des DOC-Gehalts in diesem Test aufweisen, sind als potentiell biologisch abbaubar zu betrachten. Eine partielle nichtadsorptive Abnahme weist darauf hin, daß der Stoff zumindest teilweise biologisch abbaubar ist.

Erfolgt keine oder nur eine geringe Abnahme des gelösten organischen Kohlenstoffs, kann dies möglicherweise auf einer Hemmung der Mikroorganismen durch den zu prüfenden Stoff beruhen. Diese kann sich auch durch Auflösung und Verlust des Schlammes sowie einer Trübung der überstehenden Kultursuspension zeigen. In solchen Fällen ist die Prüfung mit einer niedrigeren Konzentration des zu prüfenden Stoffes zu wiederholen.

Durch spezifische Analysemethoden oder den Einsatz ¹⁴C-markierter Prüfsubstanzen läßt sich eventuell eine höhere Empfindlichkeit erreichen. Wird ¹⁴C-markierte Prüfsubstanz verwendet, läßt sich durch Nachweis des entstehenden ¹⁴CO₂ bestätigen, daß ein biologischer Abbau stattgefunden hat.

Werden die Ergebnisse auch in Form des biologischen Primär-Abbaus angegeben, so sollten, wenn möglich, Angaben über die Veränderungen der chemischen Struktur gemacht werden, die die mangelnde Wiederauffindung der Ausgangssubstanz begründen.

Die Validierung der Analysemethode sowie die damit bestimmten Werte im Nährmedium ohne Zusatz der Prüfsubstanz müssen angegeben werden.

4. LITERATUR

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*, Beschluß des Rates C(81)30 endg.

Anlage 1

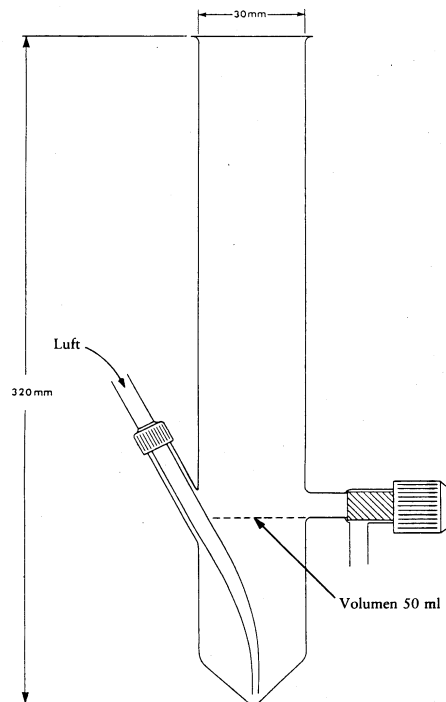
S.C.A.S.-Test: Beispiel der Ergebniseingabe

Substanz	C_T (mg/l)	$C_T - C_c$ (mg/l)	Prozent biologischer Abbau D_{da}	Testdauer (Tage)
4-Acetylamino-Benzolsulfonat	17,2	2,0	85	40
Tetraäthylen-Benzolsulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-Nitrophenol	16,9	0,8	95,3	40
Diethylenglykol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Cyclopentantetracarboxylat	17,9	3,2	81,1	120

ANLAGE 2

Beispiel der Testapparatur

Abbildung 1



C.13 BIOKONZENTRATION : DURCHFLUSS-FISCHTEST

1. METHODE

Diese Biokonzentrationsmethode entspricht der OECD TG 305 (1996).

1.1 EINLEITUNG

Die Methode beschreibt ein Verfahren zur Charakterisierung des Potentials verschiedener Substanzen zur Biokonzentration in Fischen unter Durchflußbedingungen. Obwohl Durchflußtests generell stark zu bevorzugen sind, sind - unter der Voraussetzung, daß die Validitätskriterien erfüllt werden - auch semistatische Methoden zulässig.

Die Methode gibt genügend Einzelheiten für die Durchführung des Tests vor, räumt gleichzeitig jedoch auch ausreichend Spielraum zur Anpassung des Versuchsaufbaus an die jeweiligen Laborgegebenheiten und zur Änderung der Eigenschaften der Prüfsubstanzen ein. Sie wird am effizientesten für stabile organische Chemikalien mit $\log P_{ow}$ -Werten zwischen 1,5 und 6,0 (1) eingesetzt, kann aber auch noch für superlipophile Substanzen (mit $\log P_{ow} > 6,0$) verwendet werden. Der vorläufig geschätzte Wert des Biokonzentrationsfaktors (BCF), manchmal auch als K_B bezeichnet, für solche superlipophilen Substanzen wird voraussichtlich höher sein als der aufgrund von Laborversuchen erwartete steady-state Biokonzentrationsfaktor (BCF_{ss}). Schätzwerte des Biokonzentrationsfaktors für organische Chemikalien mit $\log P_{ow}$ -Werten von bis zu ca. 9,0 können anhand der Gleichung von Bintein et al (2) ermittelt werden. Zu den Parametern, die das Biokonzentrationspotential charakterisieren, gehören die Aufnahmekonstante (k_1), die Ausscheidungskonstante (k_2) sowie der BCF_{ss} .

Radioaktiv markierte Prüfsubstanzen können die Analyse von Wasser- und Fischproben erleichtern und für die Entscheidung, ob die Abbauprodukte identifiziert und quantifiziert werden sollten, herangezogen werden. Wenn die gesamten radioaktiven Rückstände gemessen werden (z.B. durch Verbrennung oder Solubilisierung von Gewebe), basiert der BCF auf der Ausgangsverbindung, auf allen zurückgehaltenen Stoffwechselprodukten sowie dem assimilierten Kohlenstoff. Der BCF, der auf der Grundlage der gesamten radioaktiven Rückstände ermittelt wird, kann daher nicht direkt mit einem BCF verglichen werden, der allein aus der spezifischen chemischen Analyse der Ausgangsverbindung abgeleitet wurde.

In Untersuchungen mit radioaktiven Markierungen können Aufarbeitungsschritte zur Bestimmung des BCF auf der Grundlage der Ausgangsverbindung herangezogen werden; ferner können die Hauptstoffwechselprodukte charakterisiert werden, falls dies für notwendig erachtet wird. Auch ist es aufgrund der Analyse und Identifizierung der Rückstände in den Geweben möglich, Untersuchungen des Fischstoffwechsels mit Biokonzentrationsuntersuchungen zu kombinieren.

1.2 DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Biokonzentration/Bioakkumulation bezeichnet den Anstieg der Konzentration der Prüfsubstanz in oder auf einem Organismus (oder bestimmten Gewebeteilen davon) im Verhältnis zur Konzentration der Prüfsubstanz im umgebenden Medium.

Der Biokonzentrationsfaktor (BCF oder K_B) bezeichnet zu jeder Zeit während der Aufnahmephase dieses Akkumulationstests das Verhältnis der gegebenen Konzentration der Prüfsubstanz in/auf den Fischen oder bestimmten Gewebeteilen davon (C_f as $\mu\text{g/g}$ (ppm)) zur Konzentration der Chemikalie im umgebenden Medium (C_w as $\mu\text{g/ml}$ (ppm)).

Der steady-state Biokonzentrationsfaktor (BCF_{ss} oder K_B) ändert sich über einen längeren Zeitraum nicht wesentlich; die Konzentration der Prüfsubstanz im umgebenden Medium ist während dieser Zeit konstant.

Ein Plateau oder der steady-state (Fließgleichgewicht) in der graphischen Darstellung der gegen die Zeit aufgetragenen Prüfsubstanz in Fisch (C_f) ist erreicht, wenn die Kurve parallel zur Zeitachse verläuft und wenn drei aufeinanderfolgende C_f -Analysen, die auf Proben durchgeführt werden, die im Abstand von mindestens zwei Tagen genommen wurden, um nicht mehr als $\pm 20\%$ voneinander abweichen, bzw. wenn es keine bedeutenden Unterschiede zwischen den drei Probenahmephasen gibt. Werden gepoolte Proben analysiert, sind mindestens vier aufeinanderfolgende Analysen erforderlich. Für Prüfsubstanzen, die nur langsam aufgenommen werden, ist ein zeitlicher Abstand zwischen den Probenahmen von sieben Tagen geeigneter.

Biokonzentrationsfaktoren, die direkt aus den kinetischen Geschwindigkeitskonstanten (k_1/k_2) berechnet werden, werden als kinetische Konzentrationsfaktoren BCF_K bezeichnet.

Der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (P_{ow}) bezeichnet das Verhältnis der Löslichkeit einer Chemikalie in n-Oktanol und Wasser im Gleichgewicht (Methode A.8), auch als K_{ow} bezeichnet. Aus dem Logarithmus P_{ow} kann auf das Potential einer Chemikalie zur Biokonzentration in aquatischen Organismen geschlossen werden.

Die Expositions- oder Aufnahmephase bezeichnet die Zeit, während der die Fische der Prüfchemikalie ausgesetzt sind.

Die Aufnahmekonstante (k_1) ist der numerische Wert, der die Geschwindigkeit des Anstiegs in der Konzentration der Prüfsubstanz in/auf den Versuchsfischen (oder bestimmten Gewebeteilen davon) bezeichnet, während die Fische gegenüber dieser Chemikalie exponiert sind (k_1 wird in Tag^{-1} angegeben).

Die Post-Expositions- oder Ausscheidungphase bezeichnet die Zeit nach der Umsetzung der Versuchsfische aus dem Medium, das die Prüfsubstanz enthält, in ein Medium ohne diese Substanz, während der der Abbau (oder der Nettoverlust) der Substanz in den Versuchsfischen (oder bestimmten Gewebeteilen davon) untersucht wird.

Die Ausscheidungskonstante (k_2) ist der numerische Wert, der die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme der Prüfsubstanz in den Versuchsfischen (oder bestimmten Gewebeteilen davon) definiert, die der Umsetzung der Versuchsfische aus einem Medium, das die Prüfsubstanz enthält, in ein Medium ohne diese Substanz (k_2 wird in Tag^{-1} angegeben) folgt.

1.3 PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Der Test besteht aus zwei Phasen: der Expositions-/Aufnahmephase und der Post-Expositions-/Ausscheidungphase. Während der Aufnahmephase werden verschiedene Fischgruppen einer Spezies mindestens zwei Konzentrationen der Prüfsubstanz ausgesetzt. Anschließend werden sie für die Ausscheidungphase in ein Medium ohne die Prüfsubstanz eingesetzt. Eine Ausscheidungphase ist immer erforderlich, es sei denn, die Aufnahme der Substanz während der Aufnahmephase war unbedeutend (der BCF beträgt z.B. weniger als 10). Die Konzentration der Prüfsubstanz in/auf den Fischen (oder bestimmten Gewebeteilen davon) wird in beiden Phasen des Tests beobachtet. Zusätzlich zu den beiden Testkonzentrationen wird eine Kontrollgruppe von Fischen unter - abgesehen von der fehlenden Prüfsubstanz - gleichen Bedingungen gehalten, um eventuelle schädigende Wirkungen, die während des Biokonzentrationstests beobachtet werden, mit einer entsprechenden Kontrollgruppe vergleichen zu können und um Backgroundkonzentrationen der Prüfsubstanz zu erhalten.

Die Aufnahmephase dauert 28 Tage, sofern nicht schon zu einem früheren Zeitpunkt ein Gleichgewicht erreicht wird. Die Dauer der Aufnahmephase und die Zeit bis zur Einstellung des Fließgleichgewichts kann anhand der Gleichung in Anhang 3 abgeleitet werden. Die Ausscheidungsperiode beginnt dann mit der Umsetzung der Fische in ein anderes, sauberes Testgefäß, das ein bis auf die Prüfsubstanz identisches Medium enthält. Wenn möglich, sollte der Biokonzentrationsfaktor nicht nur als Verhältnis (BCF_{ss}) der Konzentration in den Fischen (C_f) und im Wasser (C_w) bei offensichtlichem Fließgleichgewicht berechnet werden, sondern auch als kinetischer Biokonzentrationsfaktor BCF_K , d.h. als Verhältnis der Aufnahme- (k_1) und Ausscheidungskonstanten (k_2) unter Annahme einer Kinetik erster Ordnung. Wenn die Meßdaten offensichtlich nicht einer Kinetik erster Ordnung folgen, sollten komplexere Modelle verwendet werden (Anhang 5).

Wird innerhalb von 28 Tagen kein Fließgleichgewicht erreicht, sollte die Aufnahmephase so lange verlängert werden, bis sich ein Fließgleichgewicht einstellt, oder bis zu 60 Tage; danach beginnt die Ausscheidungphase.

Die Aufnahmekonstante, die Ausscheidungskonstante (oder Konstanten, wenn komplexere Modelle verwendet werden), der Biokonzentrationsfaktor und, wenn möglich, die Konfidenzgrenzen eines jeden dieser Parameter werden anhand des Modells berechnet, das die gemessenen Konzentrationen der Prüfsubstanz in den Fischen und im Wasser am besten beschreibt.

Der BCF wird als Funktion des gesamten Naßgewichts der Fische ausgedrückt. Für gewisse Zwecke können jedoch auch bestimmte Gewebeteile oder Organe (z.B. Muskeln, Leber) verwendet werden, sofern die Fische groß genug sind, oder die Fische können in eßbare (Filet) und nicht-eßbare (Viszera) Fraktionen unterteilt werden. Da bei vielen organischen Substanzen eine eindeutige Beziehung zwischen dem Biokonzentrationspotential und der Lipophilie besteht, gibt es auch eine entsprechende Beziehung zwischen dem Lipidgehalt der Versuchsfische und der beobachteten Biokonzentration der Substanzen. Um dadurch bedingte Abweichungen in den Testergebnissen für hochlipophile Substanzen (d.h. mit $\log P_{ow} > 3$) auf ein Minimum zu beschränken, sollte die Biokonzentration nicht nur im Verhältnis zum gesamten Körpergewicht, sondern auch zum Lipidgehalt ausgedrückt werden.

Der Lipidgehalt sollte nach Möglichkeit anhand desselben biologischen Materials bestimmt werden, das auch für die Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz verwendet wird.

1.4 ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

Vor der Durchführung des Biokonzentrationstests sollten folgende Angaben über die Prüfsubstanz vorliegen:

- a) Wasserlöslichkeit
- b) Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient P_{ow} (auch als K_{ow} , bezeichnet, ermittelt durch ein HPLC-Verfahren in A.8)
- c) Hydrolyse
- d) Phototransformation in Wasser, bestimmt unter direkter oder simulierter Sonneneinstrahlung sowie unter den Bestrahlungsbedingungen des Biokonzentrationstests (3)
- e) Oberflächenspannung (d.n. für Substanzen, bei denen der $\log P_{ow}$ nicht ermittelt werden kann)
- f) Dampfdruck
- g) leichte biologische Abbaubarkeit (gegebenenfalls)

Ferner müssen Informationen hinsichtlich der toxischen Wirkung auf die Fischart, die im Test verwendet werden, vorliegen - vorzugsweise der asymptotische LC_{50} -Wert (d.h. zeitunabhängig). Eine entsprechende Analyseverfahren von bekannter Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit muß für die Quantifizierung der Prüfsubstanz in den Testlösungen und im biologischen Material verfügbar sein sowie auch Einzelheiten zur Probenvorbereitung und -aufbewahrung. Ebenso sollten die analytischen Nachweisgrenzen der Prüfsubstanz im Wasser sowie in den Fischgeweben bekannt sein. Wenn eine ^{14}C -markierte Prüfsubstanz verwendet wird, sollte der prozentuale Anteil der mit Verunreinigungen einhergehenden Radioaktivität bekannt sein.

1.5 VALIDITÄT DES TESTS

Ein Test wird als valide betrachtet, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- die Temperaturschwankung beträgt weniger als $\pm 2^{\circ}C$;
- die Konzentration an gelöstem Sauerstoff liegt nicht unter einer Sättigung von 60 %;
- die Konzentration der Prüfsubstanz in den Kammern liegt zwischen ± 20 % der während der Aufnahmeperiode gemessenen Durchschnittswerte;
- Mortalität oder andere schädigende Wirkungen/Krankheiten bei den Kontroll- und Versuchsfischen betragen am Ende des Tests weniger als 10 %; wenn sich der Test über mehrere Wochen oder Monate erstreckt, sollten Mortalität oder andere schädigende Wirkungen bei beiden Fischgruppen weniger als 5 % pro Monat betragen und 30 % insgesamt nicht überschreiten.

1.6 REFERENZVERBINDUNGEN

Die Verwendung von Referenzverbindungen mit bekanntem Biokonzentrationspotential ist für eine Überprüfung des Versuchsverlaufs gegebenenfalls sinnvoll. Bisher können jedoch noch keine bestimmten Substanzen empfohlen werden.

1.7 BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.7.1 Apparatur

Die Verwendung von Materialien, die sich auflösen können, die sorbieren oder auslaugen können bzw. schädigende Auswirkungen auf die Fische haben können, sollte für alle verwendeten Teile sorgfältigst vermieden werden. Es können rechteckige oder zylindrische Standardbehälter aus chemisch inertem Material, die ein dem Besatz entsprechendes Fassungsvermögen haben, verwendet werden. Die Verwendung von Röhren aus Weichkunststoff sollte auf ein Minimum beschränkt sein. Röhre aus Teflon (R), Edelstahl und/oder Glas sind zu bevorzugen. Die Erfahrung hat gezeigt, daß bei Substanzen mit hohen Adsorptionskoeffizienten, wie z.B. synthetischen Pyrethroide, die Verwendung von silanisierendem Glas nötig sein kann. In solchen Fällen muß die Anlage nach der Benutzung entsorgt werden.

1.7.2 Wasser

Allgemein wird für den Test natürliches Wasser verwendet, das aus einer unverschmutzten Quelle von gleichbleibend guter Qualität gewonnen wird. Das Verdünnungswasser muß von einer Qualität sein, die ein Überleben der gewählten Fischart für die Dauer der Akklimatisations- und Testperiode ermöglicht, ohne daß sie ein abnormes Erscheinungsbild oder Verhalten zeigen. Im Idealfall sollte nachgewiesen werden, daß die Testspezies im Verdünnungswasser (z.B. in einer Laborkultur oder in einem Lebenszyklus-Toxizitätstest) überleben, wachsen und sich vermehren können. Über das Wasser sollten zumindest Angaben bezüglich pH-Wert, Härte, Gesamtfeststoffgehalt, gesamten organischen Kohlenstoff vorliegen sowie nach Möglichkeit auch bezüglich Ammonium, Nitrit und Alkalität bzw. - für die Meerwasserspezies - bezüglich der Salinität. Die Parameter, die für einen optimalen Schutz der Fische wichtig sind, sind hinreichend bekannt, doch werden in Anhang 1 für eine Reihe von Parametern die empfohlenen Höchstkonzentrationen für Süß- und Meerestestwasser genannt.

Während der Testdauer sollte das Wasser von gleichbleibender Qualität sein. Der pH-Wert sollte zwischen 6,0 und 8,5 liegen, doch während eines bestimmten Tests sollte er um nicht mehr als $\pm 0,5$ pH-Einheiten schwanken. Um sicherzugehen, daß das Verdünnungswasser das Testergebnis nicht übermäßig stark beeinflusst (beispielsweise durch die Komplexierung der Prüfsubstanz) oder schädigende Wirkungen auf den Fischbestand hat, sollten in gewissen Abständen Proben zur Analyse entnommen werden. Wenn bekannt ist, daß das Verdünnungswasser qualitativ relativ konstant ist, sollte beispielsweise alle drei Monate der Gehalt an Schwermetallen (z.B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), an Hauptanionen und -kationen (z.B. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), Pestiziden (z.B. der Gesamtgehalt an phosphororganischen und chlororganischen Pestiziden), der TOC und die Schwebstoffe bestimmt werden. Wenn sich die Wasserqualität über mindestens ein Jahr als konstant erwiesen hat, können die Untersuchungen weniger häufig und in größeren Zeitabständen (z.B. alle sechs Monate) erfolgen.

Der natürliche Partikelgehalt sowie der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) des Verdünnungswasser sollte möglichst niedrig sein, um die Adsorption der Prüfsubstanz an organischen Substanzen zu vermeiden, wodurch deren Bioverfügbarkeit (4) reduziert werden könnte. Der maximal zulässige Wert beträgt 5 mg/l für Partikel (Trockensubstanz, die nicht durch einen Filter von $0,45 \mu\text{m}$ geht) und 2 mg/l für den gesamten organischen Kohlenstoff (siehe Anhang 1). Gegebenenfalls sollte das Wasser vor der Verwendung gefiltert werden. Der Beitrag zum organischen Kohlenstoffgehalt im Wasser durch die Versuchsfische (Ausscheidungen) und Nahrungsreste sollte so gering wie möglich sein. Während der gesamten Testdauer sollte die Konzentration des organischen Kohlenstoffs im Testbehälter die Konzentration des organischen Kohlenstoffs aus der Prüfsubstanz und dem Lösungsmittel, falls verwendet, um nicht mehr als 10 mg/l ($\pm 20\%$) überschreiten.

1.7.3 Testlösungen

Eine Stammlösung der Prüfsubstanz wird in entsprechender Konzentration vorbereitet. Die Stammlösung sollte vorzugsweise durch einfaches Mischen oder Einrühren der Prüfsubstanz in das Verdünnungswasser vorbereitet werden. Die Verwendung von Lösungs- oder Dispergiermitteln (Lösungsvermittlern) wird nicht empfohlen, auch wenn dies in einigen Fällen nötig sein sollte, um eine entsprechend konzentrierte Stammlösung herzustellen. Lösungsmittel, die verwendet werden können, sind Ethanol, Methanol, Ethylenglykol-Monomethylether, Ethylenglykol-Dimethylether, Dimethylformamid und Triethylenglykol. Dispergiermittel, die verwendet werden können, sind Cremophor RH40, Tween 80, Methylzellulose 0,01 % und HCO-40. Bei der Verwendung biologisch leicht abbaubarer Stoffe ist Vorsicht geboten, da diese im Durchflußtest Probleme im Hinblick auf das Bakterienwachstum verursachen können. Die Prüfsubstanz kann radioaktiv markiert und sollte von höchster Reinheit sein (vorzugsweise $> 98\%$).

Bei Durchflußtests ist ein System erforderlich, das kontinuierlich eine Stammlösung der Prüfsubstanz abzieht und verdünnt (z.B. Dosierpumpe, Proportionalverdünner, Sättigungsvorrichtung), um die Testkonzentrationen den Testkammern zuzuführen. Ein Austausch von mindestens fünf Rauminhalten durch jede der Testkammern pro Tag ist zulässig. Das Durchflußverfahren ist zu bevorzugen; wenn dieses nicht eingesetzt werden kann (wenn z.B. schädigende Wirkungen auf die Testorganismen zu erwarten sind), kann ein semistatisches Verfahren verwendet werden, unter der Voraussetzung, daß die Validitätskriterien erfüllt sind. Die Durchflußgeschwindigkeit der Stammlösungen und des Verdünnungswassers sollten 48 Std. vor dem Test und während des Testverlaufs mindestens einmal pro Tag geprüft werden. Im Rahmen dieser Prüfung wird die Durchflußgeschwindigkeit durch jede der Testkammern bestimmt und sichergestellt, daß sie innerhalb oder zwischen den Kammern um nicht mehr als 20 % abweicht.

1.7.4 Auswahl der Spezies

Wichtig für die Auswahl der Spezies ist, daß sie leicht und in entsprechender Größe verfügbar sind und problemlos im Labor gehalten werden können. Andere Kriterien zur Auswahl der Fischart sind u.a. ihr Freizeitwert, ihre kommerzielle und ökologische Bedeutung sowie eine vergleichbare Empfindlichkeit, ein erfolgreicher Einsatz in früheren Tests etc.

Die empfohlenen Testspezies werden in Anhang 2 aufgeführt. Es können auch andere Spezies verwendet werden, doch müssen die Testverfahren dann u.U. angepaßt werden, um die entsprechenden Testbedingungen zu schaffen. Die Gründe für die Auswahl der Spezies und der Versuchsmethode sollten in diesem Fall genau dokumentiert werden.

1.7.5 Haltung der Fische

Eine Stammpopulation von Fischen wird mindestens zwei Wochen lang im Wasser bei Testtemperatur akklimatisiert und mit entsprechender Nahrung, die später auch während des Tests verwendet wird, gefüttert.

Nach einer 48-stündigen Eingewöhnungsphase wird die Mortalität festgehalten, wobei folgende Kriterien gelten:

- Mortalität größer als 10 % der Population in sieben Tagen: Austausch des gesamten Besatzes;
- Mortalität zwischen 5 und 10 % der Population in sieben Tagen: weitere sieben Tage Akklimatisation;
- Mortalität weniger als 5 % der Population in sieben Tagen: Annahme des gesamten Besatzes - wenn die Mortalität innerhalb der folgenden sieben Tage bei mehr als 5 % liegt: Austausch des gesamten Besatzes.

Stellen Sie sicher, daß die für den Test verwendeten Fische keine sichtbaren Erkrankungen oder Abnormitäten aufweisen. Entfernen Sie alle kranken Fische. Die Fische sollten zwei Wochen vor dem Test oder während des Tests nicht wegen irgendwelcher Erkrankungen behandelt werden.

1.8 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

1.8.1 Vorversuch

Es kann sehr sinnvoll sein, einen Vorversuch durchzuführen, um die Bedingungen für den endgültigen Versuch zu optimieren, z.B. Wahl der Prüfsubstanzkonzentration(en), Dauer der Aufnahme- und Ausscheidungsphase.

1.8.2 Expositionsbedingungen

1.8.2.1 Dauer der Aufnahmephase

Eine Vorhersage der Dauer der Aufnahmephase kann aus praktischen Erfahrungen (z.B. aus einer früheren Untersuchung oder anhand einer Chemikalie vergleichbarer Akkumulation) oder aus bestimmten empirischen Beziehungen abgeleitet werden, wozu entweder die Kenntnis der Wasserlöslichkeit oder des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten der Prüfsubstanz (siehe Anhang 3) herangezogen wird.

Die Aufnahmephase sollte 28 Tage dauern, sofern nicht nachweislich bereits zu einem früheren Zeitpunkt ein Gleichgewicht erzielt wurde. Stellt sich innerhalb von 28 Tagen kein Fließgleichgewicht ein, so sollte die Aufnahmephase entsprechend verlängert und weitere Messungen vorgenommen werden, bis das Fließgleichgewicht erreicht ist, höchstens jedoch 60 Tage.

1.8.2.2 Dauer der Ausscheidungsphase

In der Regel reicht die Hälfte der Dauer der Aufnahmephase aus, um eine relevante Reduzierung (z.B. 95 %) der Körperbelastung durch die Substanz (zur Erläuterung dieser Schätzung s. Anhang 3) festzustellen. Sollte die Zeit, die für einen 95 % -ige Ausscheidung benötigt wird, jedoch unangemessen lang und damit nicht praktikabel sein (wenn sie beispielsweise die normale Dauer der Aufnahmephase um mehr als das Doppelte überschreitet, d.h. mehr als 56 Tage beträgt), kann die Phase entsprechend verkürzt werden (d.h. bis die Konzentration der Prüfsubstanz weniger als 10 % der Fließgleichgewichtskonzentration beträgt). Bei Substanzen mit komplexeren Aufnahme- und Ausscheidungsmustern, als sie durch ein Einkompartiment-Fischmodell dargestellt werden können (bei einer Kinetik erster Ordnung), sollten jedoch längere Ausscheidungsphasen zur Bestimmung der Ausscheidungskonstanten geplant werden. Die Dauer kann jedoch durch die Zeit vorgegeben sein, in der die Konzentration der Prüfsubstanz in den Fischen oberhalb der analytischen Nachweisgrenze liegt.

1.8.2.3 Anzahl der Versuchsfische

Die Zahl der Fische pro Testkonzentration sollte so gewählt werden, daß bei jeder Probenahme mindestens vier Fische pro Probe zur Verfügung stehen. Wird eine stärkere statistische Aussagekraft gefordert, ist eine größere Anzahl von Fischen pro Probe notwendig.

Wenn ausgewachsene Fische verwendet werden, muß dokumentiert sein, ob es sich um männliche oder weibliche Tiere handelt bzw. ob beide Geschlechter für den Versuch eingesetzt werden. Werden beide Geschlechter verwendet, sollten die unterschiedlichen Lipidgehalte der Geschlechter vor Beginn der Exposition als nicht signifikant dokumentiert werden; ein Pooling aller männlichen und aller weiblichen Fische kann u.U. erforderlich sein.

Für jeden Test werden Fische mit vergleichbarem Gewicht gewählt, so daß die kleinsten nicht weniger als zwei Drittel des Gewichts der größten Tiere haben. Alle sollten derselben Altersgruppe angehören und dieselbe Herkunft haben. Da Gewicht und Alter eines Fisches häufig einen bedeutenden Einfluß auf die BCF-Werte (1) zu haben scheinen, werden diese Angaben sorgfältig dokumentiert. Das Wiegen einer Teilprobe der Fischpopulation vor der Durchführung des Tests wird empfohlen, damit das Durchschnittsgewicht geschätzt werden kann.

1.8.2.4 *Besatz*

Es wird ein hohes Wasser/Fisch-Verhältnis gewählt, damit die C_w -Reduzierung, die durch den Einsatz der Fische zu Beginn des Tests verursacht wird, minimiert und eine Abnahme der Konzentration an gelöstem Sauerstoff vermieden werden kann. Wichtig ist, daß die Besatzrate der jeweils verwendeten Testspezies angepaßt ist. In der Regel wird auf jeden Fall eine Besatzrate von 0,1-1,0 g Fisch (Naßgewicht) pro Liter Wasser pro Tag empfohlen. Höhere Besatzraten können gewählt werden, wenn nachgewiesen werden kann, daß die geforderte Konzentration der Prüfsubstanz innerhalb der Grenze von $\pm 20\%$ gehalten werden kann und daß die Konzentration an gelöstem Sauerstoff eine Sättigung von 60 % nicht unterschreitet.

Durch die Wahl der geeigneten Besatzrate wird dem normalen Habitat der Fischart Rechnung getragen. Beispielsweise erfordern in der benthischen Zone lebende Fische bei gleicher Wassermenge u.U. eine größere Bodenfläche im Aquarium als pelagische Fischarten.

1.8.2.5 *Fütterung*

Während der Akklimatisations- und der Testphase werden die Fische mit einem geeigneten Futter von bekanntem Lipid- und Gesamtproteingehalt in dem Maße gefüttert, daß sie gesund bleiben und das Körpergewicht erhalten wird. Die Fische werden während der gesamten Dauer der Akklimatisations- und Testphase täglich mit einer Futtermenge von ca. 1 bis 2 % ihres Körpergewichts pro Tag gefüttert; auf diese Weise wird bei den meisten Fischarten die Lipidkonzentration während des Tests auf einem relativ konstanten Niveau gehalten. Die Futtermenge sollte in regelmäßigen Abständen, zum Beispiel einmal pro Woche, neu berechnet werden, damit Körpergewicht und Lipidgehalt konsistent gehalten werden. Für diese Berechnung sollte das Gewicht der Fische in den einzelnen Testkammern anhand des Gewichts der Fische geschätzt werden, die der Kammer zuletzt als Probe entnommen wurden. Wiegen Sie nicht das Gewicht der in der Kammer verbliebenen Fische.

Nicht gefressenes Futter und Exkremente werden täglich aus den Testkammern entfernt, und zwar kurz nach der Fütterung (30 Minuten bis 1 Stunde). Die Kammern werden während der gesamten Testdauer so sauber wie möglich gehalten, damit die Konzentration organischer Stoffen so gering wie möglich gehalten wird, da das Vorhandensein organischer Kohlenstoffe die Bioverfügbarkeit der Prüfsubstanz (1) u.U. beeinträchtigen kann.

Da viele Futtersorten aus Fischmehl gewonnen werden, sollte das Futter auf die Prüfsubstanz untersucht werden. Eine Untersuchung des Futters auf Pestizide und Schwermetalle ist ebenfalls wünschenswert.

1.8.2.6 *Licht und Temperatur*

Die Photoperiode beträgt in der Regel 12 bis 16 Stunden, und die Temperatur ($\pm 2^\circ\text{C}$) sollte den Testspezies (siehe Anhang 2) angepaßt sein. Art und Eigenschaften der Beleuchtung sollten bekannt sein. Eine mögliche Phototransformation der Prüfsubstanz unter den Bestrahlungsbedingungen der Untersuchung sollte berücksichtigt werden. Die Beleuchtung sollte so gewählt werden, daß eine Exposition der Fische gegenüber unnatürlichen Photoprodukten vermieden wird. In einigen Fällen mag die Verwendung eines Filters angebracht sein, um UV-Strahlungen unter 290 nm herauszufiltern.

1.8.2.7 *Testkonzentrationen*

Die Fische werden unter Durchflußbedingungen mindestens zwei Konzentrationen der Prüfsubstanz in Wasser ausgesetzt. Normalerweise werden höhere (oder höchste) Konzentrationen der Prüfsubstanz gewählt, die ca. 1 % ihres akuten asymptotischen LC_{50} -Wertes entsprechen und mindestens zehnmal höher sind als die durch das angewandte analytische Verfahren vorgegebene Nachweisgrenze in Wasser.

Die höchste Testkonzentration kann auch ermittelt werden, indem der akute 96h LC₅₀-Wert durch ein geeignetes Akut/Chronisch-Verhältnis dividiert wird (bei einigen Chemikalien kann der Quotient zwischen 3 und 100 liegen). Wenn möglich, wählen Sie die andere(n) Konzentration(en) so, daß sie sich von der vorherigen um den Faktor zehn unterscheidet. Sollte das aufgrund des Kriteriums eines LC₅₀-Wertes von 1 % und der analytischen Grenze nicht möglich sein, sollte ein niedrigerer Faktor als zehn gewählt bzw. die Verwendung einer ¹⁴C-markierten Prüfsubstanz erwogen werden. Keine Konzentration sollte oberhalb der Löslichkeit der Prüfsubstanz liegen.

Wird ein Lösungsvermittler verwendet, so sollte dessen Konzentration nicht mehr als 0,1 ml/l betragen und in allen Versuchsbehältnissen identisch sein. Sein Beitrag (zusammen mit dem der Prüfsubstanz) zum Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff im Testwasser sollte bekannt sein. Die Verwendung solcher Stoffe sollte allerdings unter allen Umständen vermieden werden.

1.8.2.8 *Kontrollen*

Zusätzlich zur Versuchsreihe sollte eine Verdünnungswasserkontrolle bzw. gegebenenfalls auch eine Kontrolle mit dem Lösungsvermittler vorgenommen werden, unter der Voraussetzung, daß keine Auswirkungen dieses Stoffes auf die Fische festgestellt wurden. Falls nicht, sollten beide Kontrollen durchgeführt werden.

1.8.3 **Häufigkeit der Wasserqualitätsmessungen**

Während des Tests sollten der gelöste Sauerstoff, der TOC, der pH-Wert und die Temperatur in allen Behältnissen gemessen werden. Die Gesamthärte und gegebenenfalls die Salinität sollten in den Kontrolllösungen und in einem Behältnis mit höherer (oder höchster) Konzentration gemessen werden. Der gelöste Sauerstoff und gegebenenfalls die Salinität sollten mindestens dreimal - zu Beginn, ungefähr in der Mitte und am Ende der Aufnahmeperiode - sowie regelmäßig einmal pro Woche in der Ausscheidungsperiode gemessen werden. Der TOC sollte zu Beginn des Tests (24 bzw. 48 Std. vor Beginn der Aufnahmeperiode) vor dem Einsatz der Fische und sowohl während der Aufnahme- als auch der Ausscheidungsphase mindestens einmal pro Woche gemessen werden. Die Temperatur sollte täglich gemessen werden; der pH-Wert wird zu Beginn und am Ende jeder Testperiode, die Härte einmal pro Test festgestellt. Die Temperatur sollte in mindestens einem Gefäß möglichst kontinuierlich überprüft werden.

1.8.4 **Probenahme und Analyse der Fisch- und Wasserproben**

1.8.4.1 *Fisch- und Wasserprobenahmeplan*

Vor dem Einsatz der Fische sowie während der Aufnahme- und der Ausscheidungsphase wird den Testkammern Wasser zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration entnommen. Wasserproben sollten mindestens so häufig entnommen werden wie die Fischproben, und zwar vor der Fütterung. Während der Aufnahmeperiode werden die Konzentrationen der Prüfsubstanz bestimmt, um die Übereinstimmung mit den Validitätskriterien zu überprüfen.

Während der Aufnahmeperiode werden mindestens fünf Fischproben entnommen sowie mindestens vier während der Ausscheidungsphase. Da es sich in manchen Fällen als schwierig erweisen wird, anhand dieser Probenzahl eine einigermaßen genaue Schätzung des BCF vorzunehmen - insbesondere wenn es sich um keine reine Ausscheidungskinetik erster Ordnung handelt -, kann es ratsam sein, in beiden Perioden größere Proben zu nehmen (siehe Anhang 4). Die zusätzlichen Proben werden aufbewahrt und nur dann analysiert, wenn sich die Ergebnisse des ersten Untersuchungszyklus für die Berechnung eines BCF-Wertes der gewünschten Genauigkeit als unzureichend erweisen.

Ein Beispiel für einen denkbaren Probenahmeplan wird in Anhang 4 gegeben. Andere Pläne können leicht anhand anderer angenommener P_{ow}-Werte errechnet werden, um die Expositionszeit für eine Aufnahme von 95 % zu berechnen.

Die Probenahme wird während der Aufnahmeperiode fortgesetzt, bis ein Fließgleichgewicht erreicht ist, höchstens aber 28 Tage. Stellt sich nach 28 Tagen immer noch kein Fließgleichgewicht ein, wird die Probenahme bis zur Erreichung des Fließgleichgewichts oder aber höchstens 60 Tage fortgesetzt. Vor Beginn der Ausscheidungsphase werden die Fische in saubere Behältnisse umgesetzt.

1.8.4.2 *Probenahme und Probenvorbereitung*

Wasserproben für die Analyse werden z.B. durch Absaugen mittels einer inerten Rohrleitung an einem zentralen Punkt der Testkammer gezogen. Da der nicht-bioverfügbare Teil der Prüfsubstanz offensichtlich weder durch Filtration noch durch Zentrifugation von dem bioverfügbaren getrennt werden kann (das gilt insbesondere für superlipophile Chemikalien, d.h. Chemikalien mit einem log P_{ow}>5) (1) (5), können die Proben diesen Verfahren nicht unterzogen werden.

Statt dessen müssen entsprechende Vorkehrungen getroffen werden, um die Behältnisse so sauber wie möglich zu halten, und der Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff sollte sowohl während der Aufnahme- als auch während der Ausscheidungsphase kontrolliert werden.

Bei jeder Probenahme wird eine angemessene Zahl von Fischen (in der Regel mindestens vier) den Testkammern entnommen. Die Fischproben sollten schnell mit Wasser gespült, "trockengetupft" und unverzüglich auf eine geeignete, möglichst humane Weise getötet und dann gewogen werden.

Die Analyse der Fisch- und Wasserproben sollte vorzugsweise direkt nach der Probenahme erfolgen, damit ein Abbau oder sonstige Verluste vermieden werden und die ungefähre Aufnahme- und Ausscheidungsgeschwindigkeit ermittelt werden können, während der Test fortgesetzt wird. Eine unverzügliche Analyse verhindert auch, daß ein Plateau zu spät erkannt wird.

Kann keine sofortige Analyse vorgenommen werden, werden die Proben auf geeignete Weise aufbewahrt. Angaben über die für die betreffende Prüfsubstanz geeigneten Aufbewahrungsmethode - beispielsweise Tiefkühlung, Lagerung bei 4 °C, Dauer der Aufbewahrung, Extraktion, etc. - werden vor Beginn der Untersuchung eingeholt.

1.8.4.3 *Qualität der Analysemethode*

Da das gesamte Verfahren im wesentlichen von der Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit der für die Prüfsubstanz verwendeten Analysemethode abhängt, muß in Versuchen überprüft werden, ob die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der chemischen Analyse sowie die Wiederfindung der Prüfsubstanz aus Wasser und Fischen für die betreffende Methode geeignet sind. Ferner muß darauf geachtet werden, daß die Prüfsubstanz im verwendeten Verdünnungswasser nicht nachweisbar ist.

Gegebenenfalls müssen die durch den Test ermittelten C_w - und C_f -Werte um die Wiederauffindung und Background-Werte der Kontrollen berichtigt werden. Die Fisch- und Wasserproben werden stets so behandelt, daß Verunreinigungen und Verluste (z.B. infolge von Adsorption durch das Probenahmegerät) minimiert werden.

1.8.4.4 *Analyse der Fischproben*

Werden für den Test radioaktiv markierte Stoffe verwendet, können die Proben entweder auf ihre gesamte radioaktive Markierung analysiert (d.h. Ausgangsverbindung und Metaboliten) oder aber gereinigt werden, so daß die Ausgangsverbindung separat untersucht werden kann. Ebenso können die Hauptmetaboliten im Fließgleichgewicht oder gegen Ende der Aufnahmeperiode bestimmt werden, je nachdem was eher eintritt. Wenn der BCF im Verhältnis zu den gesamten radioaktiv markierten Rückständen $\geq 1000\%$ beträgt, ist es u.U. ratsam - und bei gewissen Chemikalien wie Pestiziden unbedingt empfehlenswert - die Abbauprodukte zu identifizieren und quantifizieren, die $\geq 10\%$ des Gesamtrückstands in Fischgeweben im Fließgleichgewicht ausmachen. Wenn die Abbauprodukte, die $\geq 10\%$ des gesamten radioaktiv markierten Rückstands in den Fischgeweben ausmachen, identifiziert und quantifiziert werden, dann sollten auch die Abbauprodukte im Testwasser identifiziert und quantifiziert werden.

Die Konzentration der Prüfsubstanz sollte in der Regel für jeden gewogenen Fisch einzeln bestimmt werden. Ist dies nicht möglich, ist bei jeder Probenahme ein Pooling der Proben zulässig, doch wird durch das Pooling die Zahl der statistischen Verfahren eingeschränkt, die auf die Daten anwendbar sind. Sollte auf ein spezielles statistisches Verfahren bzw. eine bestimmte statistische Aussagekraft Wert gelegt werden, dann muß im Test (6) (7) eine Zahl von Fischen eingesetzt werden, die dem Pooling und der gewünschten Aussagekraft Genüge leistet.

Der BCF sollte sowohl im Verhältnis zum gesamten Naßgewichts als auch (bei hochlipophilen Substanzen) im Verhältnis zum Lipidgehalt ausgedrückt werden. Der Lipidgehalt der Fische wird möglichst bei jeder Probenahme bestimmt. Zur Bestimmung des Lipidgehalts sollten geeignete Methoden (s. Literaturhinweise 8 und 2 zu Anhang 3) verwendet werden, wobei ein Chloroform/Methanol-Extraktionsverfahren als Standardmethode empfohlen wird (9). Die verschiedenen Methoden führen zu unterschiedlichen Werten (10); daher ist es wichtig, Einzelheiten über die verwendete Methode anzugeben. Die Lipidanalyse sollte möglichst an dem Extrakt vorgenommen werden, das für die Untersuchung der Prüfsubstanz hergestellt wurde, da die Lipide häufig erst aus dem Extrakt entfernt werden müssen, bevor dieses chromatographisch analysiert werden kann. Der Lipidgehalt der Fische (in mg/kg Naßgewicht) sollte am Ende des Versuchs um nicht mehr als $\pm 25\%$ von dem zu Beginn ermittelten Wert abweichen. Der Anteil fester Bestandteile im Gewebe sollte ebenfalls dokumentiert werden, um eine Umrechnung der Lipidkonzentration vom Naß- zum Trockengewicht zu ermöglichen.

2. DATEN

2.1 BEHANDLUNG DER ERGEBNISSE

Die Aufnahme­kurve der Prüfsub­stanz ergibt sich, indem ihre Kon­zentration in/auf den Fischen (oder bestimmten Gewebeteilen) in der Aufnahme­phase gegen die Zeit auf einer arithmetischen Skala aufgetragen wird. Wenn die Kurve ein Plateau erreicht hat, d.h. nahezu asymptotisch zur Zeitachse ist, wird der steady-state BCF_{ss} errechnet anhand:

$$\frac{C_f \text{ als Fließgleichgewicht (Durchschnitt)}}{C_w \text{ als Fließgleichgewicht (Durchschnitt)}}$$

Wird kein Fließgleichgewicht erzielt, ist es für eine Bewertung der Gefährdung u.U. möglich, einen einigermaßen genauen BCF_{ss} anhand eines "Fließgleichgewichts" von 80 % ($1,6/k_2$) oder 95 % ($3,0/k_2$) zu berechnen.

Ebenso wird der Konzentration­sfaktor (BCF_K) als Quotient k_1/k_2 (der beiden kinetischen Konstanten erster Ordnung) ermittelt. Die Ausscheidung­skonstante (k_2) wird in der Regel aus der Ausscheidung­kurve abgeleitet (d.h. einer graphischen Darstellung der Abnahme der Prüfsub­stanz­konzentration in den Fischen mit der Zeit). Die Aufnahme­konstante (k_1) wird dann anhand des gegebenen Wertes k_2 und einem C_f -Wert berechnet, der sich aus der Aufnahme­kurve ableitet (siehe auch Anhang 5). Die bevorzugte Methode zur Berechnung des BCF_K und der Geschwindigkeits­konstanten k_1 und k_2 ist eine computergestützte nichtlineare Parameterschätzung (11). Ansonsten können graphische Methoden zur Berechnung von k_1 und k_2 verwendet werden. Wenn die Ausscheidung­kurve offensichtlich nicht erster Ordnung ist, sollten komplexere Modelle herangezogen werden (siehe Literaturhinweise zu Anhang 3) und der Rat eines Biostatistikers eingeholt werden.

2.2 ERGEBNISBEWERTUNG

Ergebnisse, bei denen die gemessenen Konzentrationen der Testlösungen nahe der Nachweis­grenze des Analyseverfahrens liegen, sollten mit Vorsicht interpretiert werden.

Klar abgegrenzte Aufnahme- und Ausscheidung­kurven weisen auf eine gute Qualität der Biokon­zentration­daten hin. Die Schwankungen der Aufnahme-/Ausscheidung­konstanten sollten bei den beiden Testkonzentrationen weniger als 20 % betragen. Werden erhebliche Unterschiede bei den Aufnahme-/Ausscheidung­geschwindigkeiten zwischen den beiden eingesetzten Testkonzentrationen beobachtet, sollten diese dokumentiert und mögliche Erklärungen gesucht werden. Bei einem guten Versuchsaufbau nähert sich die Konfidenz­grenze der BCF im allgemeinen $\pm 20\%$.

3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Testbericht muß folgende Angaben enthalten:

3.1 PRÜFSUBSTANZ:

- physikalischer Zustand und gegebenenfalls physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Identifizierungsdaten (einschließlich des organischen Kohlenstoffgehalts, falls angemessen);
- bei radioaktiv markierten Substanzen, die genaue Position des markierten Atoms (der Atome) und der prozentuale Anteil der auf Verunreinigungen zurückzuführenden Radioaktivität;

3.2 TESTSPEZIES

- wissenschaftlicher Name, Stamm, Herkunft, eventuelle Vorbehandlungen, Akklimatisation, Alter, Größenbereich, etc.

3.3 PRÜFBEDINGUNGEN :

- verwendetes Prüfverfahren (z.B. Durchflußverfahren, semistatisches Verfahren);
- Art und Eigenschaften der verwendeten Beleuchtung und Photoperiode(n);

- Versuchsaufbau (z.B. Zahl und Größe der Testkammern, Wasservolumen-Austauschrate, Zahl der Versuchswiederholungen, Zahl der Fische pro Versuchswiederholung, Zahl der Testkonzentrationen, Dauer der Aufnahme- und Ausscheidungphase, Häufigkeit der Entnahme von Fisch- und Wasserproben;
- Vorbereitung der Stammlösungen und Erneuerungshäufigkeit (falls verwendet, müssen Angaben zum Lösungsvermittler, seiner Konzentration und seinem Beitrag zum organischen Kohlenstoffgehalt des Testwassers gemacht werden);
- die nominellen Testkonzentrationen, der Durchschnitt der gemessenen Werte sowie deren Standardabweichungen in den Testbehältnissen sowie das Verfahren, durch das diese ermittelt wurden;
- Quelle des Verdünnungswassers, Beschreibung aller Vorbehandlungen, Ergebnisse aller Nachweise, daß die Versuchsfische in dem Wasser überleben können, sowie Wassereigenschaften: pH-Wert, Härte, Temperatur, Konzentration des gelösten Sauerstoffs, Restchlor (falls gemessen), TOC, suspendierte Feststoffe, Salinität des Testmediums (gegebenenfalls) sowie die Ergebnisse aller anderen durchgeführten Messungen;
- Wasserqualität innerhalb der Testbehältnisse, pH-Wert, Härte, TOC, Temperatur und Konzentration des gelösten Sauerstoffs;
- ausführliche Angaben zur Fütterung (z.B. Art des Futters, Herkunft, Zusammensetzung - zumindest der Lipid- und Proteingehalt - Fütterungsmenge und Häufigkeit);
- Angaben zur Behandlung der Fisch- und Wasserproben, einschließlich aller Einzelheiten über Vorbereitung, Lagerung, Extraktion und Analyseverfahren (und -genauigkeit) in bezug auf die Prüfsubstanz und den Lipidgehalt (falls gemessen).

3.4

ERGEBNISSE :

- Ergebnisse aller durchgeführten Voruntersuchungen;
- Mortalität der Kontrollfische und der Fische in den einzelnen Expositionskammern sowie jegliches beobachtetes anormales Verhalten;
- der Lipidgehalt der Fische (falls in der Prüfung ermittelt);
- Kurven (einschließlich aller gemessenen Daten) der Aufnahme und der Ausscheidung der Prüfchemikalie durch die Fische, die Zeit bis zur Einstellung des Fließgleichgewichts;
- C_f und C_w (gegebenenfalls mit Standardabweichung und Abweichungsbereich) für alle Probenahmen (wobei C_f in $\mu\text{g/g}$ Naßgewicht (ppm) des Ganzkörpers oder bestimmter Gewebeteile, z.B. Lipid und C_w in $\mu\text{g/ml}$ (ppm), ausgedrückt wird). Auch die C_w -Werte für die Kontrollreihe (Background) sollten dokumentiert werden;
- der steady-state Biokonzentrationsfaktor (BCF_{ss}) und/oder der kinetische Konzentrationsfaktor (BCF_k) sowie gegebenenfalls die 95 % Konfidenzgrenzen für die Aufnahme- und Ausscheidungskonstanten (alle ausgedrückt im Verhältnis zum Ganzkörper und zum Gesamtlipidgehalt (falls gemessen) des Tieres oder bestimmter Gewebeteile), die Konfidenzgrenzen und die Standardabweichung (sowie verfügbar) sowie Berechnungs-/Datenanalyseverfahren für jede Konzentration der verwendeten Prüfsubstanz;
- wenn radioaktiv markierte Substanzen verwendet werden bzw. wenn es erforderlich ist, muß die Akkumulation aller nachgewiesenen Metaboliten angegeben werden;
- alle Besonderheiten im Zusammenhang mit dem Test, alle Abweichungen von den genannten Verfahren sowie alle weiteren relevanten Informationen;

Ergebnisse der Art "bis zur Nachweisgrenze nicht nachweisbar" sollten durch die Entwicklung von Vortestverfahren und einen entsprechenden Versuchsaufbau vermieden werden, da diese nicht für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten herangezogen werden können.

4.**LITERATURHINWEISE**

- 1) **Connell D.W.** (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **102**, S. 117-156.
- 2) **Bintein S., Devillers J. and Karcher W.** (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR und QSAR in Environmental Research*, **1**, 29-390.
- 3) **OECD**, Paris (1996). Direct Phototransformation of Chemicals in Water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. 3.
- 4) **Kristensen P.** (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD und ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- 5) **US EPA** 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
- 6) **US FDA**, (Food und Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, **1**, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
- 7) **US EPA** (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in *Analysis of Pesticide Residues in Human und Environmental Samples*, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711..
- 8) **Compaan H.** (1980) in 'The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation' Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, The Netherlands..
- 9) **Gardner et al**, (1995) *Limn. & Oceanogr.* **30**, 1099-1105.
- 10) **Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. und Pruell R.J.** (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Toxicol. Chem.* **10**, S. 1431-1436.
- 11) **CEC**, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
- 12) **ASTM E-1022-84** (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes und Saltwater Bivalve Molluscs.

ANHANG 1

CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS

	SUBSTANZ	GRENZ- KONZENTRATION
1	Partikelstoffe	5 mg/l
2	Gesamter organischer Kohlenstoff	2 mg/l
3	Nichtionisiertes Ammoniak	1 µg/l
4	Restchlor	10 µg/l
5	Gesamte phosphororganische Pestizide	50 ng/l
6	Gesamte chlororganische Pestizide sowie polychlorierte Biphenyle	50 ng/l
7	Gesamter organischer Chlorgehalt	25 ng/l
8	Aluminium	1µg/l
9	Arsen	1µg/l
10	Chrom	1µg/l
11	Kobalt	1µg/l
12	Kupfer	1µg/l
13	Eisen	1µg/l
14	Blei	1µg/l
15	Nickel	1µg/l
16	Zink	1µg/l
17	Cadmium	100 ng/l
18	Quecksilber	100 ng/l
19	Silber	100 ng/l

ANHANG 2

FÜR DEN TEST EMPFOHLENE FISCHSPEZIES

	Empfohlene Spezies	Empfohlener Bereich der Testtemperatur (°C)	Empfohlene Gesamtlänge der Versuchstiere(cm)
1	Danio rerio ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebrabärbling	20 - 25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Dickkopf-Elritze	20 - 25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karpfen	20 - 25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck und Schlegel) Japanischer Reisfisch	20 - 25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20 - 25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Blauer Sonnenbarsch	20 - 25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Regenbogenforelle	13 - 17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Dreistachliger Stichling	18 - 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231

(2) In verschiedenen Ländern wurden unterschiedliche Ästuarine- und Meeresspezies verwendet, beispielsweise:

Umberfisch	<u><i>Leiostomus xanthurus</i></u>
Edelsteinkärpfling	<u><i>Cyprinodon variegatus</i></u>
Gezeiten-Ährenfisch	<u><i>Menidia beryllina</i></u>
Juwelfußbarsch	<u><i>Cymatogaster aggregata</i></u>
Englische Seezunge	<u><i>Parophrys vetulus</i></u>
Geweihsgröppe	<u><i>Leptocottus armatus</i></u>
Dreistachliger Stichling	<u><i>Gasterosteus aculeatus</i></u>
Sägebarsch	<u><i>Dicentracus labrax</i></u>
Ukelei	<u><i>Alburnus alburnus</i></u>

ZUSAMMENSTELLUNG

Die in obenstehender Tabelle aufgeführten Süßwasserfische sind leicht zu züchten oder stehen größtenteils ganzjährig zur Verfügung, wohingegen die Verfügbarkeit der Ästuarinen- und Meeresspezies teilweise auf bestimmte Länder beschränkt ist. Sie können entweder in Teichwirtschaften oder im Labor unter krankheits- und parasitenkontrollierten Bedingungen gezüchtet und aufgezogen werden, so daß man gesunde Versuchstiere hat, deren Abstammung bekannt ist. Diese Fische sind in vielen Teilen der Welt verfügbar.

ANHANG 3

VORHERSAGE DER DAUER DER AUFNAHME- UND DER ABBAUPHASE

1. Vorhersage der Dauer der Aufnahmephase

Vor der Durchführung des Tests kann ein geschätzter Wert k_2 und damit ein prozentualer Teil der für die Erreichung des Fließgleichgewichts benötigten Zeit aus den empirischen Beziehungen zwischen k_2 und dem n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (P_{ow}) bzw. zwischen k_2 und der Wasserlöslichkeit abgeleitet werden.

So läßt sich k_2 (Tag^{-1}) beispielsweise anhand folgender empirischer Beziehung (1) schätzen:

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10}(P_{ow}) + 1,47 (r^2=0,95) \quad [\text{Gleichung 1}]$$

Für weitere Beziehungen siehe Literaturhinweise. (2).

Ist der Verteilungskoeffizient (P_{ow}) nicht bekannt, kann dieser (3) anhand der bekannten Wasserlöslichkeit der Substanz geschätzt werden:

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 (r^2 = 0,994) [\text{Gleichung 2}]$$

wobei s = Löslichkeit (Mol/l) : (n=36)

Diese Beziehungen gelten nur für Chemikalien mit $\log P_{ow}$ -Werten zwischen 2 und 6,5 (4).

Die Zeit bis zur Einstellung eines gewissen Prozentsatzes des Fließgleichgewichts kann - durch Anwendung des Schätzwertes k_2 - aus der allgemeinen kinetischen Gleichung, die die Aufnahme und den Ausscheidung (Kinetik erster Ordnung) beschreibt, abgeleitet werden:

$$\frac{dc_f}{dt} = k_1 \cdot c_w - k_2 \cdot c_f$$

oder wenn C_w konstant ist:

$$c_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot c_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [\text{Gleichung 3}]$$

Bei Annäherung an das Fließgleichgewicht ($t \rightarrow \infty$) kann Gleichung 3 reduziert werden (5) (6) zu:

$$c_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot c_w \quad \text{oder} \quad c_f / c_w = k_1 / k_2 = \text{BCF}$$

Damit stellt $k_1 / k_2 \cdot c_w$ eine Annäherung an die Konzentration in den Fischen im "Fließgleichgewicht" ($C_{f,s}$) dar.

Gleichung 3 kann umgeformt werden in:

$$c_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{oder} \quad \frac{c_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad [\text{Gleichung 4}]$$

Bei Anwendung von Gleichung 4 kann die Zeit bis zur Herstellung eines gewissen Gleichgewichtsprozentsatzes vorhergesagt werden, wenn k_2 zuvor anhand der Gleichungen 1 oder 2 geschätzt wurde.

Als Richtschnur gilt, daß die statistisch optimale Dauer der Aufnahmephase für die Ableitung statistisch brauchbarer Daten (BCF_K) die Zeit ist, die benötigt wird, bis die gegen die lineare Zeit aufgetragene Logarithmuskurve der Prüfsubstanzkonzentration in den Fischen ihren Mittelpunkt bzw. $1,6/k_2$ oder ein 80%iges Fließgleichgewicht, jedoch nicht mehr als $3,0/k_2$ oder 95%iges Fließgleichgewicht (7) erreicht.

Die Zeit zur Herstellung eines 80 %igen Fließgleichgewichts entspricht (Gleichung 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{or} \quad t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad [\text{Gleichung 5}]$$

Dementsprechend gilt für ein 95%-iges Fließgleichgewicht:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad [\text{Gleichung 6}]$$

Demnach wäre beispielsweise die Dauer der Aufnahmephase (ap) für eine Prüfsubstanz mit $\log P_{ow} = 4$ (unter Anwendung der Gleichungen 1, 5, 6):

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0,414 \cdot (4) + 1,47 & k_2 &= 0,652 \text{ Tage}^{-1} \\ \text{ap (80 \%)} &= 1,6/0,652, \text{ d.h. } 2,45 \text{ Tage (59 Stunden)} \\ \text{oder ap (95 \%)} &= 3,0/0,652, \text{ d.h. } 4,60 \text{ Tage (110 Stunden)} \end{aligned}$$

Für eine Prüfsubstanz mit $s = 10^{-5}$ Mol/l ($\log(s) = -5,0$) wäre die Dauer der ap (unter Anwendung der Gleichungen 1, 2, 5, 6) entsprechend:

$$\begin{aligned} \log_{10} (P_{ow}) &= -0,862 (-5,0) + 0,710 = 5,02 \\ \log_{10} K_2 &= -0,414 (5,02) + 1,47 \\ k_2 &= 0,246 \text{ Tage}^{-1} \\ \text{ap (80 \%)} &= 1,6/0,246, \text{ d.h. } 6,5 \text{ Tage (156 Stunden)} \\ \text{oder ap (95 \%)} &= 3,0/0,246, \text{ d.h. } 12,2 \text{ Tage (293 Stunden)} \end{aligned}$$

Alternativ kann der Ausdruck :

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55,31 \text{ (Stunden)}$$

zur Berechnung der Zeit bis zur Herstellung des effektiven Fließgleichgewichts verwendet werden (4).

2. Vorhersage der Dauer der Ausscheidungphase

Die Vorhersage der Zeit, die für die Reduzierung der Körperbelastung auf einen gewissen Prozentsatz der ursprünglichen Konzentration benötigt wird, kann auch aus der allgemeinen kinetischen Gleichung erster Ordnung über die Aufnahme und die Ausscheidung (1) (8) abgeleitet werden.

Für die Ausscheidungphase wird C_w als Null angenommen. Die Gleichung kann reduziert werden zu:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{oder} \quad C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

wobei $C_{f,o}$ die Konzentration zu Beginn der Ausscheidungsperiode bezeichnet. Eine 50%ige Ausscheidung wird dann erreicht bei (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{oder} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Dementsprechend wird eine 95%iger Ausscheidung erreicht bei:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Bei einer 80%igen Aufnahme in der ersten Periode ($1,6/k_2$) und einem 95%igen Verlust in der Ausscheidungphase ($3,0/k_2$) wird die Ausscheidungphase ungefähr doppelt solange wie die Aufnahmephase dauern.

Es ist jedoch wichtig, festzuhalten, daß die Schätzungen auf der Annahme beruhen, daß die Aufnahme- und Ausscheidungsmuster einer Kinetik erster Ordnung folgen. Wenn es sich jedoch offensichtlich nicht um eine Kinetik erster Ordnung handelt, müssen komplexere Modelle verwendet werden (z.B. Literaturhinweis (1)).

LITERATURHINWEISE (zu Anhang 3)

- 1) **Spacie A.** and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* **1**, S. 309-320.
- 2) **Kristensen P.** (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
- 3) **Chiou C.T.** and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **16** (1), S. 4-10.
- 4) **Hawker D.W.** and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* **22** (6), S. 701-707.
- 5) **Branson D.R.,** Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) *Transactions of the American Fisheries Society*, **104** (4), S. 785-792.
- 6) **Ernst W.** (1985) Accumulation in Aquatic Organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 S. 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
- 7) **Reilly P.M.,** Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J. Chem. Eng.* **55**, S. 614-622.
- 8) **Könemann H.** and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in Fish: Accumulation und Elimination of six Chlorobenzene by Guppies. *Chemosphere*, **9**, S. 3-19.

ANHANG 4

THEORETISCHES BEISPIEL FÜR EINEN PROBENAHMEPLAN FÜR

BIOKONZENTRATIONSTESTS BEI SUBSTANZEN MIT $\log P_{ow} = 4$.

Probenahme Fische	Probenahmezeitplan		Anzahl der Wasserproben	Anzahl der Fische pro Probe
	Erforderliche Mindesthäufigkeit (Tage)	Zusätzliche Probenahmen (Tage)		
Aufnahmephase	-1		2*	Zugabe von 45-80 Fische
	0		2	
1.	0,3	0,4	2	4
			(2)	(4)
2.	0,6	0,9	2	4
			(2)	(4)
3.	1,2	1,7	2	4
			(2)	(4)
4.	2,4	3,3	2	4
			(2)	(4)
5.	4,7		2	6
Ausscheidungsp ase				Umsetzung der Fische in Wasser ohne die Prüfchemikalie
6.	5,0	5,3		4
			(4)	
7.	5,9	7,0		4
			(4)	
8.	9,3	11,2		4
			(4)	
9.	14,0	17,5		6
			(4)	

* Probewasser nachdem mindestens 3 'Kammer-Inhalte' geliefert wurden.

Die Werte in Klammern bezeichnen die Anzahl der Proben (Wasser, Fisch), die bei einer zusätzlichen Probenahme genommen werden müssen.

Anm: Der in Vortests ermittelte Schätzwert von k_2 für einen $\log P_{ow}$ gleich 4,0 beträgt $0,652 \text{ Tage}^{-1}$. Die Gesamtdauer des Versuchs wird auf

$3 \times ap = 3 \times 4,6 \text{ Tage}$, d.h. 14 Tage festgelegt. Zur Schätzung von 'ap' siehe Anhang 3.

ANHANG 5

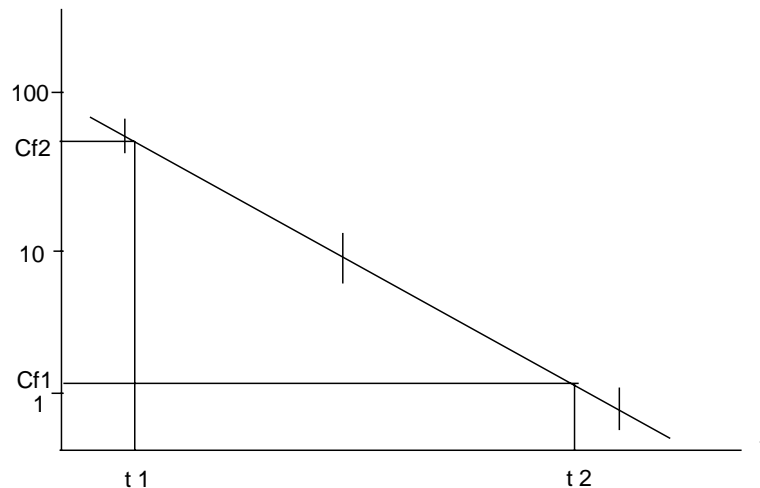
MODELLDISKRIMINIERUNG

Man geht davon aus, daß die meisten Biokonzentrationsdaten durch ein einfaches Zwei-Kompartiment-/Zwei-Parameter-Modell 'einigermaßen' gut dargestellt werden, wie aus der geradlinigen Kurve ersichtlich ist, die sich den Punkten für die Konzentrationen in den Fischen während der Ausscheidungsphase annähert, wenn diese auf semilogarithmischem Papier aufgetragen werden. (Wenn diese Punkte nicht durch eine geradlinige Kurve beschrieben werden können, sollten komplexere Modelle verwendet werden, siehe z.B. Spacie und Hamelink, Literaturhinweis 1 in Anhang 3).

GRAPHISCHE METHODE ZUR BESTIMMUNG DER AUSSCHIEDUNGSKONSTANTEN k_2

Tragen Sie die in den einzelnen Fischproben festgestellten Prüfsubstanzkonzentrationen gegen die Probenahmezeit auf semilogarithmischem Papier ab. Die Neigung dieser Linie bezeichnet k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Beachten Sie, daß Abweichungen von einer geraden Linie auf ein komplexeres Ausscheidungsmuster als eine Kinetik erster Ordnung hindeuten können. Für eine Auswertung von Ausscheidungsvorgängen, die nicht einer Kinetik erster Ordnung entspricht, kann eine graphische Methode gewählt werden.

GRAPHISCHE METHODE ZUR BESTIMMUNG DER AUFNAHMEKONSTANTEN k_1

Bei gegebenem k_2 wird k_1 wie folgt berechnet:

$$k_1 = \frac{c_f k_2}{c_w X(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{Gleichung 1}]$$

Der Wert C_f wird vom Mittelpunkt der glatten Aufnahmekurve abgelesen, die entsteht, wenn die log Konzentration gegen die Zeit (auf einer arithmetischen Skala) aufgetragen wird.

COMPUTERGESTÜTZTES VERFAHREN ZUR BERECHNUNG DER AUFNAHME- UND AUSSCHIEDUNGSKONSTANTEN

Für die Berechnung des Biokonzentrationsfaktors sowie der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 wird der Einsatz computergestützter, nichtlinearer Verfahren zur Parameterschätzung bevorzugt. Diese Programme bestimmen die Werte k_1 und k_2 basierend auf einem gegebenen Satz von über die Zeit ermittelten Konzentrationsdaten und dem Modell:

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[Gleichung 2]}$$

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad \text{[Gleichung 3]}$$

wobei t_c die Zeit am Ende der Aufnahmephase bezeichnet.

Durch diesen Ansatz wird die Standardabweichung von k_1 und k_2 geschätzt.

Da k_2 zumeist anhand der Ausscheidungskurve mit relativ hoher Genauigkeit geschätzt werden kann und weil es eine starke Korrelation zwischen den beiden Parametern k_1 und k_2 wenn sie gleichzeitig geschätzt werden - kann es u.U. ratsam sein, k_2 zunächst lediglich anhand der Ausscheidungsdaten abzuleiten und anschließend k_1 anhand der Aufnahmedaten mittels nichtlinearer Regression zu berechnen.

C.14. WACHSTUMSTEST AN JUNGFISCHEN

1. METHODE

Diese Methode für einen Wachstumstest zur Toxizitätsbestimmung entspricht der OECD TG 215 (2000).

1.1 EINLEITUNG

Anhand dieses Tests sollen die Auswirkungen einer lang anhaltenden Chemikalienexposition auf das Wachstum von Jungfischen bewertet werden. Er beruht auf einer Methode, bei der die Auswirkungen von Chemikalien auf das Wachstum junger Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) unter Durchflußbedingungen bewertet werden. Sie wurde in der Europäischen Union entwickelt und einem Ringtest unterzogen (1)(2). Auch andere gut dokumentierte Spezies sind dafür geeignet. So liegen beispielsweise Erfahrungen mit Wachstumstests an Zebraäbrblingen (*Danio rerio*)¹ (3)(4) und Reiskärpflingen (Medaka, *Oryzias latipes*) vor (5)(6)(7).

Siehe auch Allgemeine Einführung Teil C.

1.2 BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Lowest Observed Effect Concentration - LOEC (niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung): die geringste getestete Konzentration einer Prüfsubstanz, bei der verglichen mit den Kontrollen eine signifikante Wirkung der Substanz zu beobachten ist (bei $p < 0,05$). Jedoch müssen alle Testkonzentrationen, die die LOEC übersteigen, verglichen mit dieser eine ebenso große oder größere Schädigung haben.

No Observed Effect Concentration - NOEC (Konzentration ohne beobachtete Wirkung): die Testkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC.

EC_x: bei dieser Testmethode ist dies die Konzentration der Prüfsubstanz, die verglichen mit den Kontrollen eine Veränderung von x % in der Wachstumsrate der Fische hervorruft.

Besatzrate: Feuchtwicht der Fische pro Volumen Wasser.

Besatzdichte: Zahl der Fische je Volumenteil Wasser.

Individuelle spezifische Wachstumsrate des Fisches: Wachstumsrate eines Individuums auf der Grundlage seines Ausgangsgewichts.

Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate je Behältnis: mittlere Wachstumsrate des Besatzes eines Prüfgefäßes bei einer bestimmten Konzentration.

Pseudo-spezifische Wachstumsrate: Wachstumsrate eines einzelnen Fisches im Vergleich zum mittleren Ausgangsgewicht des Besatzes eines Prüfgefäßes.

¹ Meyer, A., Bierman, C.H. und Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

1.3 PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Jungfische in der Phase exponentiellen Wachstums werden nach dem Wiegen in Testkammern eingebracht und einer Reihe subletaler Konzentrationen der in Wasser gelösten Prüfsubstanz ausgesetzt; dies geschieht vorzugsweise unter Durchflußbedingungen oder, sollte dies nicht möglich sein, unter geeigneten semistatischen Bedingungen (statisch mit Erneuerung). Die Testdauer beträgt 28 Tage. Die Fische werden täglich gefüttert. Die Futterration richtet sich nach dem Ausgangsgewicht der Fische und wird gegebenenfalls nach 14 Tagen neu berechnet. Am Ende der Prüfung werden die Fische erneut gewogen. Die Auswirkungen auf die Wachstumsraten werden anhand eines Regressionsmodells analysiert, um diejenige Konzentration zu ermitteln, die eine Veränderung der Wachstumsrate von x % hervorruft, d. h. EC_x (z.B. EC_{10} , EC_{20} oder EC_{30}). Wahlweise können die Daten mit denen von Kontrollgruppen verglichen werden, um die LOEC (niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung) und damit die NOEC (Konzentration ohne beobachtete Wirkung) zu bestimmen.

1.4 ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

Es müssen die Ergebnisse einer Untersuchung der akuten Toxizität (siehe Prüfmethode C. 1.) vorliegen, die vorzugsweise mit der für diesen Test ausgewählten Spezies durchgeführt wurde. Damit sind Wasserlöslichkeit und Dampfdruck der Prüfsubstanz bekannt, und es steht eine zuverlässige Analysemethode zur Quantifizierung der Substanz in den Testlösungen mit bekannter und dokumentierter Genauigkeit und bekannter Nachweisgrenze zur Verfügung.

Weitere nützliche Informationen sind die Strukturformel, der Reinheitsgrad der Substanz, die Wasser- und Lichtbeständigkeit, pK_a , P_{ow} und die Ergebnisse einer Prüfung auf leichte biologische Abbaubarkeit (siehe Prüfmethode C. 4).

1.5 VALIDITÄT DES TESTS

Damit der Test gültig ist, müssen folgende Bedingungen gegeben sein:

- Am Ende der Prüfung darf die Mortalität bei der (den) Kontrollgruppe(n) 10 % nicht überschreiten.
- Das mittlere Gewicht der Fische in der (den) Kontrollgruppe(n) muß in einem solchen Maße zugenommen haben, daß die für signifikant erachtete Mindestveränderung der Wachstumsrate nachgewiesen werden kann. Ein Ringtest (2) hat ergeben, daß bei Regenbogenforellen das mittlere Gewicht der Fische in den Kontrollgruppen im Laufe von 28 Tagen um mindestens die Hälfte (d. h. 50 %) des mittleren Ausgangsgewichts zugenommen haben muß. Beispiel: 1 g/Fisch (= 100 %), Abschlußgewicht nach 28 Tagen: $\geq 1,5$ g/Fisch (≥ 150 %).
- Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff muß für die gesamte Dauer des Tests mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen.
- Für die Dauer des Tests dürfen sich die Wassertemperaturen im Vergleich zwischen den Testkammern zu keiner Zeit um mehr als ± 1 °C unterscheiden und innerhalb des für die Testspezies festgelegten Temperaturbereichs um höchstens 2 °C schwanken (Anhang 1).

1.6 BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.6.1 **Apparatur**

Normale Laborgeräte, darunter insbesondere folgende:

- a) Sauerstoff- und pH-Meßgerät;
- b) Geräte zur Bestimmung von Wasserhärte und -alkalität;
- c) geeignete Geräte zur Temperaturregelung und vorzugsweise zur fortlaufenden Überwachung;
- d) Behältnisse aus chemisch inertem Material und mit einem dem empfohlenen Besatz und der Besatzdichte entsprechenden Fassungsvermögen (siehe Abschnitt 1.8.5 und Anhang 1);
- e) Waage mit ausreichender Genauigkeit (d.h. auf ± 0.5 % genau).

1.6.2 **Wasser**

Als Testwasser eignet sich jedes Wasser, in dem ein ausreichend langes Überleben und ein ausreichendes Wachstum der Testspezies möglich sind. Es muß für die Dauer des Tests von gleichbleibend guter Qualität sein. Der pH-Wert des Wassers soll zwischen 6,0 und 8,5 liegen, jedoch während eines bestimmten Tests um nicht mehr als ± 0.5 pH-Einheiten schwanken. Es wird eine Härte von mehr als 140 mg/l (als CaCO_3) empfohlen. Um sicherzugehen, daß das Verdünnungswasser das Testergebnis nicht übermäßig stark beeinflußt (beispielsweise durch Komplexierung der Prüfsubstanz), sind in gewissen Abständen Proben zur Analyse zu entnehmen. Wenn bekannt ist, daß das Verdünnungswasser eine relativ konstante Qualität aufweist, sind beispielsweise alle drei Monate der Gehalt an Schwermetallen (z.B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd und Ni), an Hauptanionen und -kationen (z.B. Ca, Mg, Na, K, Cl und SO_4), Pestiziden (z. B. Gesamtgehalt an phosphororganischen und chlororganischen Pestiziden), der gesamte organische Kohlenstoff und die Schwebstoffe zu bestimmen. Wenn sich die Wasserqualität über mindestens ein Jahr als konstant erwiesen hat, können die Untersuchungen weniger häufig und in größeren Zeitabständen (z. B. alle sechs Monate) erfolgen. Einige chemische Eigenschaften eines geeigneten Verdünnungswassers sind in Anhang 2 genannt.

1.6.3 **Testlösungen**

Die Testlösungen mit den ausgewählten Konzentrationen werden durch Verdünnung einer Stammlösung hergestellt.

Die Stammlösung sollte vorzugsweise durch einfaches Mischen oder Einrühren der Prüfsubstanz in das Verdünnungswasser mit mechanischen Mitteln (Rührwerk oder Ultraschall) hergestellt werden. Zur Herstellung einer geeigneten konzentrierten Stammlösung können Sättigungssäulen (Löslichkeitssäulen) verwendet werden.

Zur Herstellung einer Stammlösung mit geeigneter Konzentration kann in einigen Fällen die Verwendung von Lösungs- oder Dispergiermitteln (Lösungsvermittlern) erforderlich sein. Geeignete Lösungsmittel sind beispielsweise Aceton, Ethanol, Methanol, Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid und Triethylenglycol. Geeignete Dispergiermittel sind beispielsweise Cremophor RH40, Tween 80, Methylcellulose 0,01 % und HCO-40. Bei der Verwendung von biologisch leicht abbaubaren Stoffen (z. B. Aceton) und/oder leichtflüchtigen Stoffen ist Vorsicht geboten, da diese im Durchflußtest Probleme im Hinblick auf das Bakterienwachstum verursachen können. Wird ein Lösungsvermittler verwendet, so darf er keine signifikanten Auswirkungen auf das Fischwachstum und keine erkennbaren nachteiligen Auswirkungen auf die Jungfische haben, was durch eine nur mit Lösungsmittel vorgenommene Kontrolle nachzuweisen ist.

Bei Durchflußtests ist ein System erforderlich, das kontinuierlich eine Stammlösung der Prüfsubstanz verdünnt (z. B. Dosierpumpe, Proportionalverdünner, Sättigungsvorrichtung), um die Testkonzentrationen den Testkammern zuzuführen. Die Durchflußgeschwindigkeiten der Stammlösungen und des Verdünnungswassers sind während des Testverlaufs in bestimmten Abständen, vorzugsweise täglich, zu prüfen und sollten während der gesamten Testdauer um nicht mehr als 10 % schwanken. Ein Ringtest (2) hat ergeben, daß es bei Regenbogenforellen vertretbar ist, wenn während des Testverlaufs 6 Liter Wasser/g Fisch/Tag ausgetauscht werden (siehe Abschnitt 1.8.2.2).

Bei semistatischen (Erneuerungs-) Tests hängt die Häufigkeit der Erneuerung des Mediums von der Stabilität der Prüfsubstanz ab, doch wird eine tägliche Erneuerung des Wassers empfohlen. Hat sich bei vorherigen Stabilitätstests (siehe Abschnitt 1.4) gezeigt, daß die Konzentration der Prüfsubstanz während des Erneuerungszeitraums nicht stabil ist (d.h. nicht in einem Bereich von 80-120 % des Nominalwerts liegt oder auf weniger als 80 % der gemessenen Ausgangskonzentration abfällt), so ist die Verwendung eines Durchflußtests in Erwägung zu ziehen.

1.6.4 **Auswahl der Spezies**

Empfohlen wird für diesen Test die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), da beim Ringtest mit dieser Spezies die meisten Erfahrungen gesammelt wurden (1)(2). Es kommen auch andere gut dokumentierte Spezies in Frage, wobei jedoch das Testverfahren möglicherweise abgewandelt werden muß, um geeignete Testbedingungen zu schaffen. Beispielsweise liegen auch Erfahrungen mit dem Zebraäbrbling (*Danio rerio*) (3)(4) und dem Reiskärpfling (Medaka, *Oryzias latipes*) (5)(6)(7) vor. Die Gründe für die Auswahl der Spezies und der Versuchsmethode sind in diesem Fall genau zu dokumentieren.

1.6.5 **Haltung der Fische**

Die Versuchsfische sind aus einer Population eines einzelnen Stammes - vorzugsweise vom selben Laich - auszuwählen, die im Hinblick auf Wasserqualität und Beleuchtung vor dem Test mindestens zwei Wochen lang unter ähnlichen Bedingungen gehalten wurde, wie sie beim Test verwendet werden. Sie werden während der gesamten Dauer der Haltung und während des Tests mit einer Futtermenge von mindestens 2 %, vorzugsweise aber 4 %, ihres Körpergewichts gefüttert.

Nach einer 48stündigen Eingewöhnungsphase wird die Mortalität festgehalten, wobei folgende Kriterien gelten:

- Mortalität größer als 10 % der Population in sieben Tagen: Austausch aller Fische;
- Mortalität zwischen 5 und 10 % der Population in sieben Tagen: weitere sieben Tage Akklimatisation; wenn die Mortalität innerhalb der folgenden sieben Tage bei mehr als 5 % liegt: Austausch des gesamten Besatzes;
- Mortalität weniger als 5 % der Population in sieben Tagen: Verwendung aller Fische für den Test.

Die Fische sollen zwei Wochen vor dem Test und während des Tests nicht wegen irgendwelcher Erkrankungen behandelt werden.

1.7 VERSUCHSAUFBAU

Unter "Versuchsaufbau" sind die gewählte Anzahl und der Abstand der Testkonzentrationen, die Anzahl der Prüfgefäße je Konzentration und die Anzahl der Fische je Gefäß zu verstehen. Nach Möglichkeit sollte die Auswahl der Versuchsanordnung anhand folgender Kriterien erfolgen:

- a) Ziel der Studie;
- b) vorgesehene Methode der statistischen Analyse;
- c) Verfügbarkeit und Kosten der experimentellen Ressourcen.

In der Erklärung zur Zielsetzung ist nach Möglichkeit die statistische Trennschärfe anzugeben, mit der ein Unterschied bestimmter Größenordnung (z. B. in der Wachstumsrate) nachgewiesen werden soll; wahlweise kann die Genauigkeit angegeben werden, mit der EC_x (z. B. $x = 10, 20$ oder 30 , vorzugsweise nicht unter 10) ermittelt werden soll. Ohne diese ist keine feste Angabe zum Umfang der Studie nicht möglich.

Es ist zu beachten, dass ein Versuchsaufbau, der für eine bestimmte Methode der statistischen Analyse optimal ist (d. h. die bestmögliche Nutzung der Ressourcen gestattet), dies nicht unbedingt auch für eine andere Methode sein muß. Daher wird für die Ermittlung der LOEC/NOEC nicht derselbe Aufbau empfohlen wie für die Regressionsanalyse.

Aus Gründen, die von Stephan und Rogers (8) erörtert werden, ist in den meisten Fällen die Regressionsanalyse der Varianzanalyse vorzuziehen. Falls jedoch kein geeignetes Regressionsmodell zur Verfügung steht ($r^2 < 0.9$), ist die NOEC/LOEC zu verwenden.

1.7.1 Versuchsaufbau für die Regressionsanalyse

Bei der Planung eines Tests, der mittels Regressionsanalyse ausgewertet werden soll, ist folgendes zu beachten:

- a) Die im Test verwendeten Konzentrationen müssen in jedem Falle die Wirkungskonzentration (z.B. $EC_{10,20,30}$) und den Konzentrationsbereich, in dem die Wirkung der Prüfsubstanz von Interesse ist, einschließen. Bei der Bestimmung von Wirkungskonzentrationen wird die größte Genauigkeit dann erzielt, wenn die Wirkungskonzentration in der Mitte des Bereichs der getesteten Konzentrationen liegt. Ein Vorversuch kann die Auswahl geeigneter Testkonzentrationen erleichtern.
- b) Im Interesse einer zufriedenstellenden statistischen Modellierung sind bei dem Test mindestens ein Kontrollansatz und fünf weitere Gefäße mit unterschiedlichen Konzentrationen zu verwenden. Gegebenenfalls ist bei Verwendung eines Lösungsvermittlers zusätzlich zur Testreihe ein Kontrollansatz mitzuführen, der den Lösungsvermittler in der höchsten eingesetzten Konzentration enthält (siehe Abschnitte 1.8.3 und 1.8.4).
- c) Es kann eine geeignete geometrische Reihe oder logarithmische Reihe (9) (siehe Anhang 3) verwendet werden. Ein logarithmischer Abstand zwischen den Testkonzentrationen ist zu bevorzugen.
- d) Stehen mehr als sechs Prüfgefäße zur Verfügung, so sind die überzähligen Gefäße entweder für Paralleltests zu verwenden oder so über den Konzentrationsbereich zu verteilen, daß sich der Abstand zwischen den Konzentrationen verringert. Beide Maßnahmen sind gleichermaßen zu empfehlen.

1.7.2 **Versuchsaufbau für die Bestimmung der NOEC/LOEC mittels Varianzanalyse**

Vorzugsweise sollten bei allen Konzentrationen Parallelansätze vorhanden sein, und die statistische Analyse sollte für die einzelnen Prüfgefäße vorgenommen werden (10). Ohne Parallelansätze ist es nicht möglich, die Variabilität zwischen den Prüfgefäßen über das auf die einzelnen Fische zurückzuführende Maß hinaus zu berücksichtigen. Bei einer Untersuchung (11) wurde jedoch die Erfahrung gemacht, daß die Variabilität zwischen den Gefäßen im Vergleich zur Variabilität innerhalb der Prüfgefäße (d. h. zwischen den Fischen) sehr gering war. Daher besteht eine durchaus vertretbare Alternative darin, eine statistische Analyse für die einzelnen Fische vorzunehmen.

In der Regel werden mindestens fünf Testkonzentrationen in einer geometrischen Reihe verwendet, wobei der Faktor vorzugsweise nicht größer als 3.2 ist.

Wird der Test mit Parallelansätzen durchgeführt, so gilt im allgemeinen, daß die Zahl der zur Kontrolle verwendeten Parallelgefäße und damit die Zahl der Fische jeweils doppelt so groß sein soll wie bei den einzelnen Testkonzentrationen, bei denen die Zahl wiederum jeweils gleich sein soll (12)(13)(14). Werden dagegen keine Parallelgefäße verwendet, so soll die Zahl der Fische in der jeweiligen Kontrollgruppe mit der Zahl der Fische in der jeweiligen Testkonzentration übereinstimmen.

Wenn die Varianzanalyse für die Prüfgefäße und nicht auf die einzelnen Fische bezogendurchgeführt werden soll (wobei letzteres entweder eine Markierung der einzelnen Fische oder die Verwendung "pseudo"-spezifischer Wachstumsraten voraussetzen würde (siehe Abschnitt 2.1.2)), müssen so viele Prüfgefäße für Paralleltests vorhanden sein, daß die Standardabweichung der "Gefäße innerhalb der einzelnen Konzentrationen" bestimmt werden kann. Dies bedeutet, daß die Freiheitsgrade für Fehler in der Varianzanalyse mindestens 5 (10) betragen sollten. Bei alleiniger Replikation der Kontrollen besteht die Gefahr einer Beeinflussung der Fehlervariabilität, da sie zusammen mit dem mittleren Wert der fraglichen Wachstumsrate ansteigen kann. Da die Wachstumsrate aller Wahrscheinlichkeit nach mit steigender Konzentration abnimmt, hat dies zur Folge, daß die Variabilität zu hoch eingeschätzt wird.

1.8 VERFAHREN

1.8.1 **Auswahl und Wiegen der Versuchsfische**

Zu Beginn des Tests kommt es darauf an, die Unterschiede im Gewicht der Fische möglichst gering zu halten. In Anhang 1 werden geeignete Größenbereiche für die einzelnen Spezies angegeben, deren Verwendung in diesem Test empfohlen wird. Beim gesamten im Test verwendeten Fischbesatz sollen die Unterschiede im Gewicht der einzelnen Fische am Anfang des Tests möglichst nicht mehr als $\pm 10\%$ des arithmetischen Mittels betragen und in keinem Falle 25 % übersteigen. Es wird empfohlen, vor dem Test zwecks Bestimmung des mittleren Gewichts eine Teilstichprobe von Fischen zu wiegen.

Die Fütterung der Stammpopulation ist in den 24 Stunden vor dem Test auszusetzen. Anschließend erfolgt eine Zufallsauswahl der Fische. Unter Verwendung eines allgemeinen Anästhetikums (z.B. einer wäßrigen Lösung von 100 mg/l Tricainmethansulphonat (MS 222), die durch Zugabe von zwei Teilen Natriumhydrogencarbonat pro Teil MS 222 neutralisiert wird), werden die (trockengetupften) Fische einzeln gewogen, um das Feuchtgewicht mit der in Anhang 1 angegebenen Genauigkeit zu ermitteln. Diejenigen Fische, deren Gewicht innerhalb des ausgewählten Bereichs liegt, sind verwendbar und werden willkürlich auf die Testbehältnisse aufgeteilt. Das Gesamtfeuchtgewicht der Fische in jedem Testbehältnis ist festzuhalten. Die Verwendung eines Anästhetikums und die Handhabung der Fische (darunter das Trockentupfen und Wiegen) können bei den Jungfischen Streß und Verletzungen hervorrufen, was insbesondere für kleinwüchsige Spezies gilt. Daher sind die Jungfische mit äußerster Vorsicht zu behandeln, um eine Belastung und Verletzung der Versuchstiere zu vermeiden.

Am 28. Tag des Tests werden die Fische erneut gewogen (siehe Abschnitt 1.8.6). Wird jedoch eine neuerliche Berechnung der Futtration für notwendig erachtet, können die Fische am 14. Tag des Tests erneut gewogen werden (siehe Abschnitt 1.8.2.3). Es können auch andere Methoden wie beispielsweise die fotografische Längenmessung verwendet werden, um Größenänderungen bei den Fischen zu ermitteln, auf deren Grundlage die Futtrationen angepaßt werden.

1.8.2 **Expositionsbedingungen**

1.8.2.1 *Dauer*

Die Testdauer beträgt ≥ 28 Tage.

1.8.2.2 *Besatzrate und Besatzdichte*

Wichtig ist, daß die Besatzrate und Besatzdichte der jeweils verwendeten Testspezies angepaßt sind (siehe Anhang 1). Die bei einer zu hohen Besatzdichte entstehende Enge ruft Streß hervor, der eine Verringerung der Wachstumsrate und unter Umständen Erkrankungen zur Folge haben kann. Eine zu niedrige Besatzdichte kann Auslöser für Revierverhalten sein, wodurch ebenfalls das Wachstum beeinträchtigt werden kann. In jedem Falle sollte die Besatzrate so niedrig sein, daß ohne Belüftung eine Konzentration an gelöstem Sauerstoff von mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts aufrechterhalten werden kann. Ein Ringtest (2) hat ergeben, daß bei Regenbogenforellen eine Besatzrate von 16 Forellen von 3-5 g auf jeweils 40 Liter vertretbar ist. Es wird empfohlen, für die Dauer des Tests 6 l Wasser/g Fisch/Tag auszutauschen.

1.8.2.3 *Fütterung*

Die Fische sind mit geeignetem Futter (Anhang 1) in einer Menge zu füttern, die eine annehmbare Wachstumsrate ermöglicht. Das Wachstum von Mikroorganismen sowie Wassertrübungen sind sorgfältig zu vermeiden. Bei Regenbogenforellen dürfte dies mit einer täglichen Futterration von 4 % des Körpergewichts zu erreichen sein (2)(15)(16)(17). Die Tagesration kann in zwei gleiche Teile aufgeteilt und den Fischen in zwei Fütterungen pro Tag im Abstand von mindestens fünf Stunden verabreicht werden. Die Ration richtet sich nach dem jeweiligen Gesamt-Ausgangsgewicht der Fische in den einzelnen Testbehältnissen. Werden die Fische am 14. Tag erneut gewogen, so erfolgt die Neuberechnung der Ration zu diesem Zeitpunkt. Die Fütterung ist 24 Stunden vor dem Wiegen auszusetzen.

Nicht gefressenes Futter und Exkremente werden täglich vom Boden der Prüfgefäße sorgfältig abgesaugt.

1.8.2.4 *Licht und Temperatur*

Photoperiode und Wassertemperatur sind der Testspezies anzupassen (Anhang 1).

1.8.3 **Testkonzentrationen**

Normalerweise werden unabhängig vom Testaufbau fünf Konzentrationen der Prüfsubstanz benötigt (siehe Abschnitt 1.7.2). Eine vorherige Bestimmung der Toxizität der Prüfsubstanz (z. B. durch Akuttests und/oder einen Vorversuch zur Ermittlung eines geeigneten Konzentrationsbereiches) erleichtert die Auswahl der Testkonzentrationen. Werden weniger als fünf Konzentrationen verwendet, so ist dies zu begründen. Die höchste getestete Konzentration darf die Löslichkeitsgrenze der Substanz in Wasser nicht überschreiten.

Wird ein Lösungsvermittler verwendet, so soll dessen Konzentration nicht mehr als 0,1 ml/l betragen und vorzugsweise in allen Testbehältnissen identisch sein (siehe Abschnitt 1.6.3). Die Verwendung solcher Stoffe sollte allerdings möglichst vermieden werden.

1.8.4 **Kontrollen**

Die Zahl der mit Verdünnungswasser vorgenommenen Kontrollen ist vom Testaufbau abhängig (siehe Abschnitte 1.7-1.7.2). Bei Verwendung eines Lösungsvermittlers sind mit diesem ebenso viele Kontrollen durchzuführen wie mit dem Verdünnungswasser.

1.8.5 **Häufigkeit der analytischen Bestimmungen und Messungen**

Für die Dauer des Tests werden die Konzentrationen der Prüfsubstanz in regelmäßigen Abständen bestimmt (siehe unten).

Beim Durchflußtest sind die Durchflußgeschwindigkeiten des Verdünnungswassers und der Stammlösungen des Giftstoffes in regelmäßigen Abständen - vorzugsweise täglich - zu überprüfen und dürfen während der gesamten Testdauer um höchstens 10 % schwanken. Ist damit zu rechnen, daß die Konzentrationen der Prüfsubstanz um höchstens $\pm 20\%$ des Nominalwertes schwanken (d.h. im Bereich von 80-120 % liegen; siehe Abschnitte 1.6.2 und 1.6.3), so wird empfohlen, mindestens die höchste und die niedrigste Testkonzentration zu Beginn des Tests und danach in wöchentlichen Abständen zu analysieren. Ist bei einem Test (aufgrund der Stabilitätsdaten der Prüfsubstanz) nicht damit zu rechnen, daß die Konzentration der Prüfsubstanz um höchstens $\pm 20\%$ des Nominalwertes schwankt, müssen sämtliche Testkonzentrationen analysiert werden, wobei dieselbe Vorgehensweise anzuwenden ist.

Ist bei einem semistatischen (Erneuerungs-) Test damit zu rechnen, daß die Konzentration der Prüfsubstanz um höchstens $\pm 20\%$ des Nominalwertes schwankt, so wird empfohlen, mindestens die höchste und die niedrigste Testkonzentration zu Beginn der Studie sofort nach der Zubereitung und unmittelbar vor der Erneuerung sowie anschließend wöchentlich zu analysieren. Ist bei einem Test nicht damit zu rechnen, daß die Konzentration der Prüfsubstanz um höchstens $\pm 20\%$ des Nominalwertes schwankt, müssen sämtliche Testkonzentrationen analysiert werden, wobei dieselbe Vorgehensweise anzuwenden ist wie bei den stabileren Substanzen.

Es wird empfohlen, bei der Berechnung der Ergebnisse von den gemessenen Konzentrationen auszugehen. Liegen jedoch Nachweise dafür vor, daß die Konzentration der gelösten Prüfsubstanz für die Dauer des gesamten Tests in zufriedenstellender Weise in einem Bereich von $\pm 20\%$ des Nominalwertes oder der gemessenen Ausgangskonzentration gehalten wurde, kann vom Nennwert oder vom gemessenen Wert ausgegangen werden.

Es kann erforderlich sein, die Proben zu filtrieren (z. B. unter Verwendung einer Porengröße von 0,45 μm) oder zu zentrifugieren. Das empfohlene Verfahren ist die Zentrifugation. Allerdings ist auch die Filtration zulässig, sofern es nicht zur Adsorption des Testmaterials am Filter kommt.

Während des Tests sind in allen Testbehältnissen der gelöste Sauerstoff, der pH-Wert und die Temperatur zu messen. In den Kontrollgefäßen und einem Prüfgefäß mit der höchsten Konzentration sind die Gesamthärte, -alkalität und -salinität (falls zutreffend) zu messen. Der gelöste Sauerstoff und die Salinität (falls zutreffend) sind mindestens dreimal zu messen (zu Beginn, in der Mitte und am Ende des Tests). Bei semistatischen Tests wird empfohlen, den gelösten Sauerstoff häufiger zu messen, vorzugsweise vor und nach jedem Wasseraustausch, mindestens aber einmal wöchentlich. Der pH-Wert ist beim semistatischen Test zu Beginn und Ende jedes Wasseraustauschs und beim Durchflußtest mindestens wöchentlich zu messen. Härte und Alkalität sind bei jedem Test je einmal zu messen. Die Temperatur sollte vorzugsweise in mindestens einem Testgefäß fortlaufend überwacht werden.

1.8.6 Anmerkungen

Gewicht: Am Ende des Tests sind alle überlebenden Fische zur Ermittlung des Feuchtgewichts (trockengetupft) entweder als Gruppe je Testgefäß oder einzeln zu wiegen. Das Wiegen der Tiere je Testgefäß ist zu bevorzugen, da das individuelle Wiegen eine vorherige individuelle Kennzeichnung der Fische erfordern würde. Werden die Fische einzeln gewogen, um ihre individuellen spezifischen Wachstumsraten zu ermitteln, so sollte die Kennzeichnungsmethode die Tiere möglichst wenig belasten (eventuell kommen Alternativen zum Gefrierbrand in Frage, z. B. die Verwendung von dünner farbiger Angelschnur).

Für die Dauer des Tests sind die Fische täglich zu untersuchen und jegliche äußerliche Abnormitäten (wie Blutungen, Verfärbungen) und abnorme Verhaltensweisen aufzuzeichnen. Die Mortalität ist festzuhalten, und tote Fische sind so schnell wie möglich zu entfernen. Tote Fische werden nicht ersetzt, da die Besatzrate und Besatzdichte so gewählt sind, daß Änderungen in der Zahl der Fische je Prüfgefäß keine Auswirkungen auf das Wachstum haben. Es ist jedoch eine Anpassung der Futtermenge erforderlich.

2. DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

2.1 BEHANDLUNG DER ERGEBNISSE

Es wird die Mitwirkung eines Statistikers bei der Festlegung des Testaufbaus wie auch bei der Analyse der Testergebnisse empfohlen, da die Versuchsanordnungen bei dieser Testmethode stark variieren können, so beispielsweise was die Zahl der Testkammern, der Testkonzentrationen, der Fische usw. anbelangt. In Anbetracht der verschiedenen Möglichkeiten des Testaufbaus wird hier auf eine konkrete Anleitung zum statistischen Verfahren verzichtet.

Für Testgefäße, in denen die Mortalität 10 % übersteigt, werden keine Wachstumsraten berechnet. Dennoch sind die Mortalitätsraten für sämtliche Testkonzentrationen anzugeben.

Das Grundkonzept bei sämtlichen Analysemethoden ist die Ermittlung der spezifischen Wachstumsrate r zwischen Zeitpunkt t_1 und Zeitpunkt t_2 . Diese kann in Abhängigkeit davon, ob die Fische einzeln gekennzeichnet sind oder ob ein Durchschnittswert je Prüfgefäß errechnet werden muß, unterschiedlich definiert werden.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

wobei

r_1 = individuelle spezifische Wachstumsrate des Fisches

r_2 = durchschnittliche spezifische Wachstumsrate je Gefäß

r_3 = "pseudo"-spezifische Wachstumsrate

w_1, w_2 = Gewicht eines bestimmten Fisches zum Zeitpunkt t_1 bzw. t_2

$\log_e w_1$ = Logarithmus des Gewichts eines einzelnen Fisches am Anfang des Untersuchungszeitraumes

$\log_e w_2$ = Logarithmus des Gewichts eines einzelnen Fisches am Ende des Untersuchungszeitraumes

$\overline{\log_e w_1}$ = Durchschnitt der Logarithmen der Werte w_1 für die Fische im Gefäß am Anfang des Untersuchungszeitraumes

$\overline{\log_e w_2}$ = Durchschnitt der Logarithmen der Werte w_2 für die Fische im Gefäß am Ende des Untersuchungszeitraumes

t_1, t_2 = Zeitpunkt (Tage) am Anfang und Ende des Untersuchungszeitraumes

r_1, r_2, r_3 kann für den Zeitraum von 0-28 Tagen und gegebenenfalls (d.h. wenn am 14. Tag eine Messung erfolgt) für die Zeiträume von 0-14 und 14-28 Tagen berechnet werden.

2.1.1 Analyse der Ergebnisse mittels Regression (Konzentrations-Wirkungs-Modell)

Diese Analysemethode stellt eine geeignete mathematische Beziehung zwischen der spezifischen Wachstumsrate und der Konzentration her und ermöglicht damit die Bestimmung von "EC_x", d. h. eines beliebigen gewünschten EC-Wertes. Bei Verwendung dieser Methode ist die Berechnung von r für den einzelnen Fisch (r_1) nicht notwendig, vielmehr kann bei der Analyse vom Durchschnitt je Gefäß (r_2) ausgegangen werden. Letztere Methode wird bevorzugt. Im Falle sehr kleiner Spezies ist sie auch besser geeignet.

Zur Untersuchung der Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung werden die durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten je Gefäß (r_2) graphisch als Funktion der Konzentration dargestellt.

Für die Darstellung der Beziehung zwischen r_2 und Konzentration ist ein geeignetes Modell zu wählen, und die Auswahl ist angemessen zu begründen.

Ist die Zahl der überlebenden Fische in den einzelnen Prüfgefäß unterschiedlich, ist das Verfahren der Modellanpassung, ob einfach oder nichtlinear, zwecks Berücksichtigung der ungleichen Gruppengrößen zu gewichten.

Die Methode der Modellanpassung muß beispielweise eine Schätzung der EC₂₀ und ihrer Streuung (entweder Standardfehler oder Vertrauensintervall) ermöglichen. Die Abbildung des angepaßten Modells ist im Verhältnis zu den Daten zu zeigen, um die Eignung der Anpassung zu verdeutlichen (8)(18)(19)(20).

2.1.2 Analyse der Ergebnisse zur Bestimmung der LOEC

Waren bei dem Test auf allen Konzentrationsstufen Parallelgefäße vorhanden, so kann die LOEC mittels Varianzanalyse der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate je Gefäß bestimmt werden (siehe Abschnitt 2.1), wonach der Durchschnitt \bar{r} bei jeder Konzentration anhand einer geeigneten Methode (z.B. Dunnett-Test oder Williams-Test (12)(13)(14)(21)) mit dem Durchschnitt \bar{r} der Kontrollgruppen verglichen wird, um die geringste Konzentration zu ermitteln, bei der der Unterschied mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,05 signifikant ist. Sind die Voraussetzungen für eine parametrische Methode nicht gegeben (durch Nichtnormalverteilung (z.B. Shapiro-Wilk-Test) oder heterogene Varianzen (Bartlett-Test)), so sollte vor der Varianzanalyse zwecks Homogenisierung der Varianzen eine Transformation der Daten erfolgen oder aber eine gewichtete Varianzanalyse durchgeführt werden.

Waren nicht bei jeder Konzentration Parallelgefäße vorhanden, ist eine von den einzelnen Gefäßen ausgehende Varianzanalyse unempfindlich oder nicht möglich. In diesem Falle besteht eine annehmbare Kompromißlösung darin, bei der Varianzanalyse die "pseudo"-spezifische Wachstumsrate r_3 für die einzelnen Fische zu verwenden.

Der Durchschnitt r_3 für die einzelnen Testkonzentrationen kann dann mit dem Durchschnitt r_3 für die Kontrollgruppen verglichen werden. Anschließend wird die LOEC wie oben ermittelt. Zu beachten ist, daß es bei dieser Methode nicht möglich ist, die Variabilität zwischen den Prüfgefäßen über das auf die einzelnen Fische zurückzuführende Maß hinaus zu berücksichtigen oder sich in dieser Hinsicht abzusichern. Es wurde jedoch die Erfahrung gemacht (8), daß die Variabilität zwischen den Gefäßen im Vergleich zur Variabilität innerhalb der Gefäße (d. h. zwischen den Fischen) sehr gering war. Werden keine einzelnen Fische in die Analyse einbezogen, so ist die verwendete Methode zur Ermittlung von Ausreißern anzugeben und zu begründen.

2.2 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren, wenn die gemessenen Substanzkonzentrationen in den Testlösungen nahe an der Nachweisgrenze des Analysenverfahrens liegen bzw. wenn bei semistatistischen Tests die Konzentration der Prüfsubstanz in der Zeit zwischen der Zubereitung und der Erneuerung abnimmt.

2.3 TESTBERICHT

Der Testbericht muß folgende Angaben enthalten:

2.3.1 Prüfsubstanz:

- physikalischer Zustand und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Kenndaten einschließlich Reinheitsgrad und gegebenenfalls Analyseverfahren zur Quantifizierung der Prüfsubstanz.

2.3.2 **Testspezies:**

- wissenschaftliche Bezeichnung (nach Möglichkeit)
- Stamm, Größe, Herkunft, eventuelle Vorbehandlungen usw.

2.3.3 **Prüfbedingungen:**

- verwendetes Prüfverfahren (z. B. semistatisch/ Erneuerung, Durchflußverfahren, Besatz, Besatzdichte usw.);
- Versuchsaufbau (z. B. Zahl der Testgefäße, der Testkonzentrationen und der Parallelansätze, Zahl der Fische pro Gefäß);
- Methode der Zubereitung der Stammlösungen und Erneuerungshäufigkeit (falls verwendet, müssen Angaben zum Lösungsvermittler und seiner Konzentration gemacht werden);
- die nominellen Testkonzentrationen, der Durchschnitt der gemessenen Werte und deren Standardabweichungen in den Testgefäßen sowie das Verfahren, durch das diese ermittelt wurden; Nachweise dafür, daß sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfsubstanz in echter Lösung beziehen;
- Eigenschaften des Verdünnungswassers: pH-Wert, Härte, Alkalität, Temperatur, Konzentration des gelösten Sauerstoffs, Restchlor (falls gemessen), gesamter organischer Kohlenstoff, suspendierte Feststoffe, Salinität des Testmediums (falls gemessen) sowie alle sonstigen durchgeführten Messungen;
- Wasserqualität innerhalb der Testgefäße: pH-Wert, Härte, Temperatur und Konzentration des gelösten Sauerstoffs;
- ausführliche Angaben zur Fütterung (z. B. Art des Futters, Herkunft, Fütterungsmenge und -häufigkeit).

2.3.4 **Ergebnisse:**

- Nachweis dafür, daß die Kontrollgruppen die Validitätskriterien für das Überleben erfüllen, sowie Daten zur Mortalität bei allen Testkonzentrationen;
- verwendete statistische Analysemethoden, statistische Angaben auf der Basis von Parallelgefäßen oder einzelnen Fischen, Aufbereitung der Daten und Begründung der verwendeten Methoden;
- tabellarische Angaben zum individuellen und durchschnittlichen Gewicht der Fische an den Tagen 0, 14 (falls gemessen) und 28, Werte für durchschnittliche spezifische Wachstumsraten je Gefäß oder (gegebenenfalls) pseudo-spezifische Wachstumsraten für den Zeitraum 0-28 Tage bzw. 0-14 und 14-28 Tage;
- Ergebnisse der statistischen Analyse (d.h. Regressionsanalyse oder Varianzanalyse), vorzugsweise in tabellarischer und graphischer Form, sowie LOEC ($p = 0,05$) und NOEC oder nach Möglichkeit EC_{x} , gegebenenfalls mit Standardfehlern;
- festgestellte ungewöhnliche Reaktionen der Fische und erkennbare Auswirkungen der Prüfsubstanz.

LITERATUR

- (1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
- (2) Ashley S., Mallett M.J. und Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- (3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, **14**, S. 1855-1870.
- (4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. und Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, **21**, S. 157-164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- (6) Holcombe , G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. und Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* **28**, S. 287-297.
- (7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. und Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.
- (8) Stephan C.E. und Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891*, R C Bahner und D J Hansen (Hrsg.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, S. 328-338.
- (9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 S.
- (10) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley (Hrsg.).
- (11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, Ad-Hoc-Treffen von OECD-Experten für aquatische Toxikologie, WRc Medmenham, Vereinigtes Königreich, 10.-12. Dezember 1991.
- (12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **50**, S. 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, **20**, S. 482-491.
- (14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* **27**, S. 103-117.
- (15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* **120**, 123-133.

- (16) Quinton, J. C. und Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, 33-41.
- (17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 S.
- (18) Bruce, R.D. und Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.
- (19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. und McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, Nr. 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, Kalifornien.
- (20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center. Sept. 1988. 12 S.
- (21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, S. 510-531.

ANHANG 1

FÜR DIE PRÜFUNG EMPFOHLENE FISCHSPEZIES UND GEEIGNETE PRÜFBEDINGUNGEN

Spezies	Empfohlener Testtemperaturbereich (°C)	Photoperiode (Stunden)	Empfohlener Bereich für das Ausgangsgewicht der Fische (g)	Erforderliche Meßgenauigkeit	Besatzrate (g/l)	Besatzdichte (pro Liter)	Futter	Testdauer (Tage)
Empfohlene Spezies:								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regenbogenforelle	12,5 – 16,0	12 – 16	1 – 5	auf 100 mg genau	1,2 – 2,0	4	Marken-Trockenfutter für Salmonidenbrut	≥ 28
Sonstige gut dokumentierte Spezies:								
<i>Danio rerio</i> Zebrabärbling	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	auf 1 mg genau	0,2 – 1,0	5 – 10	Lebendfutter (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> Reiskärppling (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	auf 1 mg genau	0,2 – 1,0	5 – 20	Lebendfutter (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28

ANHANG 2

EINIGE CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN VON GEEIGNETEM VERDÜNNUNGSWASSER

SUBSTANZ	KONZENTRATIONEN
Schwebstoffe	< 20 mg/l
Gesamter organischer Kohlenstoff	< 2 mg/l
Nichtionisiertes Ammoniak	< 1 µg/l
Restchlorgehalt	< 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

ANHANG 3

LOGARITHMISCHE REIHE GEEIGNETER KONZENTRATIONEN FÜR DEN TOXIZITÄTSTEST

(9)

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

* Es können fünf (oder mehr) aufeinanderfolgende Konzentrationen aus einer Spalte gewählt werden. Die Mittelpunkte zwischen den Konzentrationen in Spalte (x) sind Spalte (2x + 1) zu entnehmen. Die aufgeführten Konzentrationen können Volumen- oder Gewichtsprozent (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 Toxizitätsgrades besteht.

C.15. FISCHER, KURZFRISTIGE TOXIZITÄTSPRÜFUNG AN EMBRYONEN UND JUNGFISCHEN MIT DOTTERSACK

1. METHODE

Diese Methode zur kurzfristigen Toxizitätsprüfung entspricht der OECD TG 212 (1998).

1.1 EINLEITUNG

Diese kurzfristige Toxizitätsprüfung an Fischembryonen und Jungfischen mit Dottersack stellt eine kurzfristige Prüfung dar, bei der die Entwicklungsstadien vom frisch befruchteten Ei bis zum Ende des Dottersackstadiums exponiert werden. Bei der Prüfung an Fischembryonen und Jungfischen mit Dottersack erfolgt keine Fütterung, daher sollte die Prüfung abgeschlossen sein, solange sich die Larven noch aus dem Dottersack ernähren.

Die Prüfung soll zur Ermittlung der letalen und – in gewissem Umfang – auch der subletalen Auswirkungen von Chemikalien auf die spezifischen Entwicklungsstadien und geprüften Fischarten dienen. Sie soll insofern nützliche Informationen liefern, als sie (a) eine Brücke zwischen letalen und subletalen Prüfungen schlagen, (b) als Screening-Test für eine Durchführung des vollständigen Early Life-Stage Tests oder für einen chronischen Toxizitätstest verwendet und (c) für die Prüfung von Fischarten herangezogen werden könnte, bei denen die Zuchtverfahren noch nicht hinreichend weit entwickelt sind, um die Zeit der Umstellung von der endogenen auf die exogene Fütterung abzudecken.

Nicht vergessen werden sollte, daß nur Prüfungen, die alle Entwicklungsstadien von Fischen umfassen, im allgemeinen eine korrekte Schätzung der chronischen Toxizität von Chemikalien für Fische ermöglichen und daß eine verkürzte Exposition in bezug auf Entwicklungsstadien unter Umständen zu einer Herabsetzung der Empfindlichkeit und damit zu einer Unterschätzung der chronischen Toxizität führen kann. Es wird daher erwartet, daß die Empfindlichkeit bei der Prüfung an Fischembryonen und Jungfischen mit Dottersack geringer als in einer vollständigen Prüfung des frühen Entwicklungsstadiums ist, insbesondere bei Chemikalien mit einer hohen Lipophilizität ($\log P_{ow} > 4$) und Chemikalien mit einer spezifischen toxischen Wirkungsweise. Kleinere Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen zwei Tests dürften allerdings bei Chemikalien mit einer unspezifischen narkotischen Wirkungsweise (1) zu erwarten sein.

Vor der Veröffentlichung dieser Prüfung lagen die meisten Erfahrungen mit Fischembryonen und Dottersackjungfischen des Süßwasserfisches *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – allgemeinsprachlicher Name Zebrafisch) vor. Detailliertere Angaben zur Versuchsdurchführung bei dieser Fischart finden sich daher in Anhang 1. Dadurch wird die Verwendung von anderen Fischarten, mit denen ebenfalls Erfahrungen vorliegen (Tabelle 1), nicht ausgeschlossen.

1.2 DEFINITIONEN

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): Dies ist die niedrigste geprüfte Konzentration einer Prüfsubstanz, bei der sich im Vergleich zu der Kontrolle eine signifikante Wirkung beobachten läßt (bei $p < 0,05$). Alle Prüfkonzentrationen oberhalb der LOEC müssen jedoch eine schädigende Wirkung haben, die gleich den bei der LOEC beobachteten Wirkungen oder größer als diese ist.

No Observed Effect Concentration (NOEC): Dies ist die Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC.

1.3 PRINZIP DER METHOD

Die Fischembryonen und Jungfische mit Dottersack werden einem Bereich von Konzentrationen der in Wasser gelösten Prüfsubstanz ausgesetzt. Im Rahmen des Protokolls kann zwischen einem semistatischen und einem Durchflußverfahren gewählt werden. Die Entscheidung über das Verfahren hängt dabei von der Art der Prüfsubstanz ab. Die Prüfung beginnt damit, daß befruchtete Eier in die Prüfkammern gesetzt werden, und sie endet kurz bevor der Dottersack von Larven in einer der Prüfkammern vollständig aufgezehrt ist beziehungsweise bevor die Tiere in den Kontrollen zu verhungern anfangen. Letale und subletale Auswirkungen werden bewertet und mit Kontrollwerten zur Bestimmung der niedrigsten beobachteten Wirkkonzentration (LOEC) und damit auch der höchsten Konzentration ohne Wirkung (NOEC) verglichen. Alternativ können sie auch mit Hilfe eines Regressionsmodells analysiert werden, um die Konzentrationen zu schätzen, die zu einer Wirkung mit einem bestimmten prozentualen Anteil führen würden (d. h., LC/EC_x, wobei x für den prozentualen Anteil, der von der Wirkung betroffen ist, steht).

1.4 INFORMATIONEN ÜBER DIE PRÜFSUBSTANZ

Ergebnisse einer akuten Toxizitätsprüfung (siehe Methode C.1), die möglichst an der für diese Prüfung gewählten Fischart durchgeführt wurde, sollten zur Verfügung stehen. Die Ergebnisse können bei der Auswahl eines geeigneten Bereichs an Prüfkonzentrationen bei der Prüfung in den frühen Entwicklungsstadien hilfreich sein. Die Wasserlöslichkeit (einschließlich Löslichkeit im Prüfwasser) und der Dampfdruck der Prüfsubstanz sollten bekannt sein. Ein zuverlässiges analytisches Verfahren für die Quantifizierung der Substanz in den Prüflösungen mit bekannter und protokollierter Genauigkeit und Nachweisgrenze sollte verfügbar sein.

Zu den Informationen über die Prüfsubstanz, die bei der Festlegung der Prüfbedingungen von Nutzen sein können, gehören die Strukturformel, die Reinheit der Substanz, die Lichtstabilität, die Stabilität unter den Versuchsbedingungen, pK_a, P_{ow} und die Ergebnisse einer Prüfung zur leichten biologischen Abbaubarkeit (siehe Methode C.4).

1.5 VALIDITÄTSKRITERIEN

Damit die Validität einer Prüfung gegeben ist, gelten die folgenden Bedingungen:

- Die gesamte Überlebensrate von befruchteten Eiern in den Kontrollen und, soweit zutreffend, in den Gefäßen, in denen sich ausschließlich Lösemittel befindet, muß größer oder gleich den in Anhang 2 und 3 definierten Grenzwerten sein.
- Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff muß während der gesamten Prüfung zwischen 60 und 100 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes liegen.
- Die Wassertemperatur darf zwischen den Prüfkammern oder zwischen aufeinander folgenden Tagen zu keiner Zeit während der Prüfung um mehr als $\pm 1,5^{\circ}$ C schwanken und sollte innerhalb der für die geprüfte Fischart festgelegten Temperaturbereiche liegen (Anhang 2 und 3).

1.6 BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1 **Prüfkammern**

Verwendet werden können beliebige Gefäße aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Werkstoff. Die Abmessungen der Gefäße sollten der Besatzrate entsprechend groß genug sein (siehe Abschnitt 1.7.1.2). Es wird empfohlen, die Prüfkammern nach dem Zufallsprinzip in dem Prüfbereich anzuordnen. Einem randomisierten Blockkonzept, bei dem jede Behandlung in jedem Block vorhanden ist, ist der Vorzug vor einem vollständig randomisierten Konzept zu geben, wenn systemische Wirkungen in der Prüfeinrichtung vorhanden sind, die durch die Blockbildung kontrolliert werden können. Der Blockbildung sollte, sofern sie zum Tragen kommt, bei der anschließenden Datenauswertung Rechnung getragen werden. Die Prüfkammern sind vor ungewollten Störungen zu schützen.

1.6.2 **Auswahl der Fischarten**

Empfohlene Fischarten werden in Tabelle 1A genannt. Dies schließt die Verwendung anderer Fischarten (Beispiele hierzu finden sich in Tabelle 1B) zwar nicht aus, doch ist das Prüfverfahren unter Umständen anzupassen, um geeignete Prüfbedingungen zu schaffen. In diesem Fall sollten die Beweggründe für die Auswahl der Fischart und das Versuchsverfahren protokolliert werden.

1.6.3 **Hälterung der Zuchtfische**

Nähere Angaben, wie man die Zuchtfische unter zufriedenstellenden Bedingungen hält, lassen sich in der OECD TG 210¹ und in den Literaturhinweisen (2)(3)(4)(5)(6) finden.

1.6.4 **Handhabung von Embryonen und Larven**

Embryonen und Larven können innerhalb des Hauptgefäßes in kleineren Behältern exponiert werden, die mit Siebseiten oder -enden versehen sind, damit die Prüflösung durch das Gefäß hindurchfließen kann. Einen wirbelfreien Durchfluß durch diese kleinen Gefäße kann man dadurch herbeiführen, daß man diese an einen Arm aufhängt, der das Gefäß auf- und abbewegt, dabei jedoch die Organismen immer mit der Prüflösung bedeckt hält; ebenfalls verwendet werden kann ein Siphonspülsystem. Befruchtete Eier von Salmonidfischen können auf Einschüben oder Gittern gehältert werden, deren Öffnungen groß genug sind, so daß die Larven nach dem Schlüpfen hindurchfallen können. Pasteurpipetten eignen sich, um die Embryonen und Larven in den semistatischen Prüfungen mit vollständigem täglichem Wechsel des Prüfmediums zu entfernen (siehe Paragraph 1.6.6).

Werden Eierbehälter, Gitter oder Siebe verwendet, um die Eier innerhalb des Hauptprüfgefäßes zu halten, sollten diese Rückhaltevorrichtungen nach dem Schlüpfen der Larven entfernt werden¹; Siebe sollten nur bleiben, um die Fische an der Flucht zu hindern. Sofern die Larven umgesetzt werden müssen, sollten sie nicht der Luft ausgesetzt werden, und es sollten keine Netze verwendet werden, um Fische aus Eierbehältern herauszuholen (derartige Vorsicht ist bei weniger anfälligen Arten wie beispielsweise Karpfen gegebenenfalls nicht erforderlich). Der Zeitpunkt für diese Umsetzung ist von Art zu Art unterschiedlich, und ein Umsetzen ist auch nicht immer erforderlich. Für das semistatische Verfahren können Bechergläser oder flache Behälter verwendet werden, die bei Bedarf mit einem leicht über dem Boden des Becherglases erhöhten Sieb versehen sind. Ist das Fassungsvermögen dieser Behälter für die Besatzanforderungen (siehe 1.7.1.2) ausreichend, brauchen die Embryonen oder Larven gegebenenfalls nicht umgesetzt zu werden.

1.6.5 **Wasser**

Jedes Wasser, das die chemischen Eigenschaften eines annehmbaren Verdünnungswassers entsprechend der Auflistung in Anhang 4 erfüllt und bei dem die zu prüfende Fischart eine Kontrollüberlebensrate aufweist, die zumindest so gut wie in Anhang 2 und 3 beschrieben ist, kommt als Prüfwasser in Frage. Das Wasser sollte während des Prüfzeitraums von gleichbleibender Qualität sein. Der pH-Wert sollte in einem Bereich von $\pm 0,5$ pH-Einheiten bleiben. Um sicherzustellen, daß das Verdünnungswasser das Prüfergebnis nicht übermäßig beeinflusst (beispielsweise durch Komplexbildung mit der Prüfsubstanz) oder sich nachteilig auf die Leistung des Zuchtbestands auswirkt, sollten in Abständen Proben zur Analyse entnommen werden. Messungen von Schwermetallen (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd und Ni), größeren Anionen und Kationen (z. B. Ca, Mg, Na, K, Cl und SO₄), Pestiziden (z. B. gesamte phosphororganische und gesamte chlororganische Pestizide), des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) und der Schwebstoffe sollten beispielsweise alle drei Monate ermittelt werden, wenn bekanntermaßen ein Verdünnungswasser von relativ gleichbleibender Qualität vorliegt. Hat sich die Wasserqualität über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr als relativ konstant erwiesen, können Bestimmungen seltener durchgeführt und die Abstände verlängert werden (z. B. alle sechs Monate).

¹ OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test".

1.6.6 **Prüflösungen**

Prüflösungen der gewählten Konzentrationen werden durch Verdünnung eines Stammansatzes hergestellt.

Der Stammansatz sollte möglichst durch einfaches Mischen oder Hin- und Herbewegen der Prüfsubstanz in dem Verdünnungswasser auf mechanischem Wege hergestellt werden (z. B. Rühren und Ultraschalldispersion). Sättigungskolonnen (Löslichkeitskolonnen) können verwendet werden, um einen Stammansatz von geeigneter Konzentration zu erzielen. Soweit möglich, sollte der Einsatz von Löse- oder Dispersionsmitteln (Lösungsmittel) vermieden werden; allerdings können derartige Verbindungen in einigen Fällen erforderlich sein, um einen Stammansatz von geeigneter Konzentration herzustellen. Beispiele für geeignete Lösemittel sind Aceton, Ethanol, Methanol, Dimethylformamid und Triethylenglycol. Beispiele für geeignete Dispersionsmittel sind Cremophor RH40, Tween 80, Methylcellulose 0,01 % und HCO-40. Vorsicht ist bei leicht biologisch abbaubaren (z. B. Aceton) und/oder hochflüchtigen Stoffen geboten, da diese Probleme mit einer Anreicherung von Bakterien in Durchflußprüfungen bereiten können. Wird ein Löslichkeitshilfsmittel verwendet, darf dieses weder eine signifikante Auswirkung auf das Überleben noch erkennbare negative Auswirkungen auf frühe Entwicklungsphasen haben, was durch eine Kontrolle, bei der nur das Lösemittel verwendet wird, nachgewiesen wird. Es sollten jedoch alle Anstrengungen unternommen werden, um den Einsatz derartiger Stoffe zu vermeiden.

Bei dem semistatischen Verfahren können zwei verschiedene Verfahren zur Erneuerung des Prüfmediums eingesetzt werden; entweder (i) werden neue Prüflösungen in sauberen Gefäßen hergestellt und überlebende Eier und Larven vorsichtig zusammen mit einer kleinen Menge der alten Lösung in die neuen Behälter umgesetzt, wobei eine Exposition gegenüber Luft vermieden wird, oder (ii) die Prüforganismen bleiben in den Gefäßen, während ein Teil (mindestens drei Viertel) des Prüfwassers ausgetauscht wird. Die Häufigkeit der Erneuerung des Prüfmediums hängt zwar von der Stabilität der Prüfsubstanz ab, jedoch wird ein täglicher Austausch des Wassers empfohlen. Wenn aus vorausgehenden Stabilitätsprüfungen (siehe Abschnitt 1.4) bekannt ist, daß die Konzentration der Prüfsubstanz während des Zeitraums, in dem das Prüfmedium gewechselt wird, nicht stabil ist (d. h., außerhalb des Bereichs von 80 bis 120 % der nominalen Konzentration oder Unterschreitung von 80 % der gemessenen anfänglichen Konzentration), sollte der Einsatz einer Durchflußprüfung in Erwägung gezogen werden. In jedem Fall sollte darauf geachtet werden, daß während des Wasserwechsels Streß für die Larven vermieden wird.

Bei Durchflußprüfungen ist ein System erforderlich, das einen Stammansatz der Prüfsubstanz kontinuierlich abgibt und verdünnt (z. B. Dosierpumpe, Proportionalverdünnungsvorrichtung, Sättigersystem), um den Prüfkammern eine Reihe von Konzentrationen zuzuführen. Die Durchsatzraten der Stammansätze und des Verdünnungswassers sollten in Abständen, möglichst einmal pro Tag, überprüft werden und während der gesamten Prüfung um nicht mehr als 10 % schwanken. Eine Durchsatzrate, die zumindest dem fünffachen Kammervolumen in 24 Stunden entspricht, hat sich als geeignet erwiesen (2).

1.7 **VORGEHENSWEISE**

Nützliche Informationen über die Durchführung von Toxizitätsprüfungen an Fischembryonen und Jungtieren mit Dottersack finden sich in der Fachliteratur, einige Beispiele hierfür sind im Abschnitt Literaturhinweise dieses Texts enthalten (7)(8)(9).

1.7.1 **Expositionsbedingungen**

1.7.1.1 *Dauer*

Die Prüfung sollte möglichst innerhalb von 30 Minuten nach der Befruchtung der Eier beginnen. Die Embryonen werden vor oder so bald wie möglich nach Beginn des Stadiums der Blastulascheiben-Spaltung und auf jeden Fall vor Einsetzen des Gastrula-Stadiums in die Prüflösung eingetaucht. Bei Eiern von kommerziellen Lieferanten ist es unter Umständen nicht möglich, die Prüfung unmittelbar nach der Befruchtung zu beginnen. Da die Empfindlichkeit der Prüfung durch einen verzögerten Prüfbeginn gravierend beeinflusst werden kann, sollte die Prüfung innerhalb von 8 Stunden nach der Befruchtung eingeleitet werden. Da die Larven während des Expositionszeitraums nicht gefüttert werden, sollte die Prüfung kurz bevor der Dottersack von Larven in einer der Prüfkammern vollständig aufgezehrt ist beziehungsweise bevor in den Kontrollen Tiere zu verhungern anfangen, beendet sein. Die Dauer hängt dabei von der verwendeten Art ab. Einige Empfehlungen zur Dauer finden sich in Anhang 2 und 3.

1.7.1.2 *Besatz*

Die Anzahl an befruchteten Eiern bei Beginn der Prüfung sollte zur Erfüllung von statistischen Anforderungen hinreichend groß sein. Die Eier sollten nach dem Zufallsprinzip auf die Behandlungen verteilt werden, und mindestens 30 befruchtete Eier sollten, zu gleichen Teilen (oder so gleich wie möglich, da es bei Einsatz von einigen Arten schwierig sein kann, gleiche Chargen zu bekommen) auf mindestens drei parallele Prüfkammern aufgeteilt, je Konzentration verwendet werden. Die Besatzrate (Biomasse je Volumen an Prüflösung) sollte gering genug sein, so daß eine Konzentration an gelöstem Sauerstoff von mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts ohne Belüftung aufrechterhalten werden kann. Bei Durchflußprüfungen wurde eine Besatzrate von nicht mehr als 0,5 g/l je 24 Stunden und nicht mehr als 5 g/l Lösung zu jeder Zeit empfohlen (2).

1.7.1.3 *Licht und Temperatur*

Die Belichtungsdauer und die Prüfwassertemperatur sollten für die geprüfte Fischart angemessen sein (Anhang 2 und 3). Zur Überwachung der Temperatur kann die Verwendung eines weiteren Prüfgefäßes angebracht sein.

1.7.2 **Prüfkonzentrationen**

Im Normalfall sind fünf Konzentrationen der Prüfsubstanz, die sich durch einen konstanten Faktor von nicht mehr als 3,2 voneinander unterscheiden, erforderlich. Die Kurve, in der die LC_{50} gegen den Expositionszeitraum in der akuten Prüfung aufgetragen ist, sollte bei der Auswahl des Bereichs an Prüfkonzentrationen berücksichtigt werden. Die Verwendung von weniger als fünf Konzentrationen, beispielsweise in Limit-Tests, und ein engerer Konzentrationsbereich können unter gewissen Umständen angebracht sein. Werden weniger als fünf Konzentrationen verwendet, sollte dies begründet werden. Konzentrationen der Substanz, die höher als die LC_{50} über 96 Stunden beziehungsweise 100 mg/l sind, je nachdem, welcher Wert der niedrigere ist, brauchen nicht geprüft zu werden. Substanzen sollten nicht oberhalb ihrer Löslichkeitsgrenze im Prüfwasser geprüft werden.

Wird ein Lösungsmittel bei der Herstellung der Prüflösungen verwendet (siehe Abschnitt 1.6.6), sollte dessen Endkonzentration in den Prüfgefäßen nicht mehr als 0,1 ml/l betragen und in allen Prüfgefäßen gleich sein.

1.7.3 **Kontrollen**

Eine Kontrolle mit Verdünnungswasser (mit der entsprechenden Anzahl von Wiederholungen) und ebenfalls, soweit relevant, eine Kontrolle mit dem Lösungsmittel (mit der entsprechenden Anzahl von Wiederholungen) sollten zusätzlich zu der Testreihe durchgeführt werden.

1.7.4 **Häufigkeit von analytischen Bestimmungen und Messungen**

Während der Prüfung werden die Konzentrationen der Prüfsubstanz in regelmäßigen Abständen bestimmt.

Bei semistatischen Prüfungen, bei denen erwartet wird, daß die Konzentration der Prüfsubstanz innerhalb von $\pm 20\%$ der Nominalkonzentration konstant bleibt (d. h., innerhalb des Bereichs von 80 bis 120 %; siehe Abschnitt 1.4 und 1.6.6), wird empfohlen, daß zumindest die höchste und die niedrigste Prüfkonzentration analysiert werden, wenn diese frisch hergestellt ist und unmittelbar vor dem Austausch, und zwar zu mindestens drei gleichmäßig über die Prüfung verteilten Zeitpunkten sind (d. h., Analysen sollten anhand einer Probe derselben Lösung erfolgen – wenn diese frisch hergestellt ist und beim Austausch).

Bei Prüfungen, bei denen nicht damit zu rechnen ist, daß die Konzentration der Prüfsubstanz innerhalb von $\pm 20\%$ der Nominalkonzentration (d. h., der Grundlage von Stabilitätsdaten der Substanz) konstant bleibt, ist es notwendig, alle Prüfkonzentrationen, frisch hergestellt und beim Austausch, zu analysieren, jedoch unter gleichen Verhältnissen (d. h., bei mindestens drei Gelegenheiten, die gleichmäßig über die Prüfung verteilt sind). Die Bestimmung von Konzentrationen der Prüfsubstanz vor dem Austausch braucht nur an einem Wiederholungsgefäß bei jeder Prüfkonzentration durchgeführt zu werden. Konzentrationen sollten im Abstand von nicht mehr als sieben Tagen bestimmt werden. Es wird empfohlen, daß Ergebnisse dabei auf gemessenen Konzentrationen basieren. Kann jedoch nachgewiesen werden, daß die Konzentration der Prüfsubstanz während der gesamten Prüfung zufriedenstellend innerhalb von $\pm 20\%$ der nominalen Konzentration oder gemessenen Anfangskonzentration gehalten wurde, dann können Ergebnisse auf nominalen oder gemessenen Anfangswerten basieren.

Bei Durchflußprüfungen ist ein ähnliches Probenahmeverfahren, wie für semistatische Prüfungen beschrieben, angebracht (die Messung der 'alten' Lösungen gilt in diesem Falle jedoch nicht). Dauert die Prüfung allerdings länger als sieben Tage, ist es unter Umständen ratsam, die Anzahl an Probenahmen in der ersten Woche zu erhöhen (d. h. drei Meßreihen), um sicherzugehen, daß die Prüfkonzentrationen stabil bleiben.

Proben müssen gegebenenfalls zentrifugiert oder gefiltert werden (z. B. mit einer Porengröße von 0,45 µm). Da jedoch weder die Zentrifugation noch die Filtration stets den nichtbioverfügbaren Teil der Prüfsubstanz von dem bioverfügbaren Teil trennt, brauchen die Proben diesen Behandlungen nicht unterzogen zu werden.

Während der Prüfung sollten in allen Prüfgefäßen der gelöste Sauerstoff, der pH-Wert und die Temperatur gemessen werden. Die Gesamthärte und der Salzgehalt (soweit relevant) sollten in den Kontrollen und einem Gefäß mit der höchsten Konzentration gemessen werden. Der gelöste Sauerstoff und der Salzgehalt (soweit relevant) sollten mindestens drei Mal (zu Beginn, in der Mitte und am Ende der Prüfung) gemessen werden. Bei semistatischen Prüfungen wird empfohlen, den gelösten Sauerstoff häufiger zu messen, möglichst vor und nach jedem Wasseraustausch, oder zumindest einmal pro Woche. Der pH-Wert sollte zu Beginn und am Ende eines jeden Wasserwechsels bei semistatischen Prüfungen und mindestens einmal pro Woche bei Durchflußprüfungen gemessen werden. Die Härte sollte jeweils einmal pro Prüfung gemessen werden. Die Temperatur sollte einmal pro Tag gemessen und zumindest in einem Prüfgefäß kontinuierlich überwacht werden.

1.7.5 **Beobachtungen**

1.7.5.1 *Stadium der Embryonalentwicklung*

Das Embryonalstadium (d. h. Gastrula-Stadium) zu Beginn der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz sollte so genau wie möglich überprüft werden. Dies kann mit Hilfe einer repräsentativen Probe von Eiern, die in geeigneter Form aufbewahrt und gereinigt wurden, erfolgen. Zur Beschreibung und Darstellung von Embryonalstadien kann auch die Fachliteratur herangezogen werden (2)(5)(10)(11).

1.7.5.2 *Schlüpfen und Überleben*

Beobachtungen zum Schlüpfen und Überleben sollten zumindest einmal pro Tag erfolgen, und die jeweiligen Zahlen sollten protokolliert werden. Zu Beginn der Prüfung können häufigere Beobachtungen (z. B. alle 30 Minuten in den ersten drei Stunden) wünschenswert sein, da in einigen Fällen Überlebenszeiten aussagefähiger als nur die Anzahl von Todesfällen sein können (z. B. bei akuten toxischen Wirkungen). Sobald tote Embryonen und Larven festgestellt werden, sollten diese unmittelbar entfernt werden, da sie sich rasch zersetzen können. Äußerste Sorgfalt sollte bei der Entfernung von einzelnen toten Individuen aufgewendet werden, um benachbarte Eier/Larven nicht zu stoßen oder körperlich zu beschädigen, da diese äußerst zart und empfindlich sind. Je nach Entwicklungsstadium gelten unterschiedliche Kriterien zur Bestimmung des Todes:

- **bei Eiern:** insbesondere in den frühen Stadien ein deutlich erkennbarer Verlust an Lichtdurchlässigkeit und eine Veränderung der Färbung, hervorgerufen durch Gerinnung und/oder Ausfällung von Eiweiß, was zu einem weiß-opaken Aussehen führt;
- **bei Embryonen:** fehlende Körperbewegung und/oder fehlender Herzschlag und/oder opake Verfärbung bei Arten, bei denen die Embryonen im Normalfall durchsichtig sind;
- **bei Larven:** Bewegungslosigkeit und/oder fehlende Atmung und/oder fehlender Herzschlag und/oder weiß-opake Färbung des zentralen Nervensystems und/oder mangelnde Reaktion auf mechanische Reize.

1.7.5.3 *Abnormes Aussehen*

Die Anzahl der Larven, die eine abnorme Körperform und/oder Pigmentierung aufweisen, und das Stadium der Dottersackaufzehrung sollten in angemessenen Abständen in Abhängigkeit der Dauer der Prüfung und der Art der beschriebenen Abnormalität protokolliert werden. Zu beachten ist, daß abnorme Embryonen und Larven auch von Natur aus auftreten und bei einigen Arten in der Größenordnung von mehreren Prozent bei der/den Kontrolle(n) liegen können. Abnorme Tiere sollten aus den Prüfgefäßen nur dann entfernt werden, wenn sie tot sind.

1.7.5.4 *Abnormes Verhalten*

Abnormalitäten, z. B. Hyperventilation, unkoordiniertes Schwimmen und atypische Ruhe, sollten in angemessenen Abständen in Abhängigkeit der Dauer der Prüfung protokolliert werden. Auch wenn sich diese Auswirkungen nur schwer quantifizieren lassen, können sie, sofern sie beobachtet werden, bei der Interpretation von Mortalitätsdaten helfen, d. h., Informationen über die toxische Wirkungsweise der Substanz liefern.

1.7.5.5 *Länge*

Am Ende der Prüfung wird eine Messung der Einzellängen empfohlen; dabei kann die Standard-, die Gabelungs- oder die Gesamtlänge verwendet werden. Kommt es jedoch zu Schwanzflossenfäule oder Flossenerosion, sollten Standardlängen herangezogen werden. Im allgemeinen sollte in einer ordentlich durchgeführten Prüfung der Variationskoeffizient für die Länge unter den Wiederholungen in den Kontrollen $\leq 20\%$ sein.

1.7.5.6 *Gewicht*

Am Ende der Prüfung können die einzelnen Gewichte bestimmt werden; dabei sollten möglichst Trockengewichte (24 Stunden bei 60° C) vor Naßgewichten (trocken getupft) gemessen werden. Im allgemeinen sollte in einer ordentlich durchgeführten Prüfung der Variationskoeffizient für das Gewicht unter den Wiederholungen in den Kontrollen $\leq 20\%$ sein.

Diese Beobachtungen führen zu einigen oder allen der folgenden Daten, die zur statistischen Auswertung zur Verfügung stehen:

- kumulative Mortalität;
- Anzahl von gesunden Larven am Ende der Prüfung;
- Zeit des Schlüpfbeginns und des Schlüpfendes (d. h., 90 % Schlüpfen in jeder Wiederholung);
- Anzahl von Larven, die jeden Tag schlüpfen;
- Länge (und Gewicht) der am Ende der Prüfung überlebenden Tiere;
- Anzahl an Larven, die deformiert sind oder ein abnormes Aussehen aufweisen;
- Anzahl von Larven, die abnormes Verhalten zeigen.

2. DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

2.1 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Es wird empfohlen, einen Statistiker sowohl an der Auslegung als auch an der Auswertung der Prüfung zu beteiligen, da die Methode eine beträchtliche Bandbreite im Versuchskonzept zuläßt, beispielsweise bei der Anzahl an Prüfkammern, der Anzahl an Prüfkonzentrationen, der Ausgangszahl an befruchteten Eiern und der gemessenen Parameter. In Anbetracht der für die Auslegung der Prüfung zur Verfügung stehenden Möglichkeiten wird an dieser Stelle keine konkrete Orientierung zu den statistischen Verfahren gegeben.

Sind LOEC/NOEC-Werte zu bestimmen, wird die Notwendigkeit bestehen, Streuungen innerhalb jeder Wiederholungsreihe durch eine Varianzanalyse (ANOVA) oder Kontingenztabellenverfahren zu analysieren. Für einen Mehrfachvergleich zwischen den Ergebnissen bei den einzelnen Konzentrationen und den Ergebnissen der Kontrollen ist möglicherweise die Dunnett-Methode von Nutzen (12)(13). Weitere hilfreiche Beispiele sind ebenfalls verfügbar (14)(15). Der Umfang der Wirkung, der mit ANOVA oder anderen Verfahren nachweisbar ist (d. h., die Aussagefähigkeit der Prüfung) sollte berechnet und protokolliert werden. Zu beachten ist, daß sich nicht alle in Abschnitt 1.7.5.6 aufgeführten Beobachtungen für eine statistische Auswertung mittels einer ANOVA eignen. Die kumulative Mortalität und die Anzahl an gesunden Larven am Ende der Prüfung könnten beispielsweise mit Hilfe von Probit-Methoden analysiert werden.

Sind LC/EC_x-Werte zu bestimmen, sollte(n) (eine) geeignete Kurve(n) wie beispielsweise die logistische Kurve an die Daten von Interesse mittels eines statistischen Verfahrens wie der Methode der kleinsten Quadrate oder der nichtlinearen kleinsten Quadrate angepaßt werden. Die Kurve(n) sollte(n) so parametrisiert werden, daß die LC/EC_x von Interesse und deren Standardfehler direkt abgeschätzt werden können. Dies wird die Berechnung des Vertrauensbereichs rund um die LC/EC_x deutlich erleichtern. Soweit keine guten Gründe dafür vorliegen, anderen Vertrauensbereichen den Vorzug zu geben, sollte der zweiseitige 95 % Vertrauensbereich angegeben werden. Das Anpassungsverfahren sollte möglichst einen Weg bieten, um die Signifikanz der mangelnden Anpassung zu bewerten. Für die Anpassung von Kurven können graphische Methoden eingesetzt werden. Für alle in Abschnitt 1.7.5.6 aufgeführten Beobachtungen kommt eine Regressionsanalyse in Frage.

2.2 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse sollten mit Vorsicht interpretiert werden, wenn gemessene toxische Konzentrationen in Prüflösungen in der Nähe der Nachweisgrenze des analytischen Verfahrens liegen. Die Interpretation von Ergebnissen für Konzentrationen oberhalb der Wasserlöslichkeit der Substanz sollte ebenfalls mit Vorsicht erfolgen.

2.3 ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

2.3.1 **Prüfsubstanz:**

- Physikalische Beschaffenheit und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Daten zur chemischen Identifizierung, einschließlich Reinheitsgrad und analytisches Verfahren zur Quantifizierung der Prüfsubstanz, soweit zutreffend.

2.3.2 **Gepriüfte Fischart:**

- Wissenschaftlicher Name, Stamm, Anzahl an Elternfischen (d. h., wie viele Weibchen wurden für die erforderlichen Zahlen an Eiern in der Prüfung verwendet), Herkunft und Art der Sammlung der befruchteten Eier sowie anschließende Handhabung.

2.3.3

Prüfbedingungen:

- Zum Einsatz kommendes Prüfverfahren (z. B. semistatisches oder Durchflußverfahren, Zeitraum von der Befruchtung bis zum Beginn der Prüfung, Besatz, usw.);
- Belichtungszeit(en);
- Auslegung der Prüfung (z. B. Anzahl der Prüfkammern und Wiederholungen, Anzahl an Embryonen je Wiederholung);
- Methode zur Herstellung von Stammansätzen und Häufigkeit der Erneuerung (sollte ein Lösungsmittel verwendet werden, sind dieses Mittel und dessen Konzentration anzugeben);
- die nominalen Prüfkonzentrationen, die Meßwerte, deren Mittelwerte und deren Standardabweichungen in den Prüfbehältern sowie das Verfahren, nach dem diese erzielt wurden, und, sofern die Prüfsubstanz in Wasser bei Konzentrationen unterhalb der Prüfkonzentrationen löslich ist, sollte der Nachweis geführt werden, daß sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfsubstanz in der Lösung beziehen;
- Eigenschaften des Verdünnungswassers: pH-Wert, Härte, Temperatur, gelöste Sauerstoffkonzentration, Restchlorgehalt (soweit gemessen), gesamter organischer Kohlenstoff (TOC), Schwebstoffe, Salzgehalt des Prüfmediums (soweit gemessen) und eventuelle andere vorgenommene Messungen;
- Wasserqualität innerhalb der Prüfgefäße: pH-Wert, Härte, Temperatur und gelöste Sauerstoffkonzentration.

2.3.4

Ergebnisse:

- Ergebnisse von eventuellen vorhergehenden Untersuchungen zur Stabilität der Prüfsubstanz;
- Nachweis, daß die Kontrollen den allgemeinen Standard bezüglich der Annehmbarkeit der Überlebensraten für die geprüfte Fischart erfüllen (Anhang 2 und 3);
- Daten zu Mortalität/Überleben im Embryo- und Larvenstadium sowie Gesamtmortalität/-überleben;
- Tage bis zum Schlüpfen und Anzahl geschlüpfter Tiere;
- Angaben zur Länge (und zum Gewicht);
- Vorkommen und Beschreibung morphologischer Abnormitäten, soweit zutreffend;
- Vorkommen und Beschreibung von Auswirkungen auf das Verhalten, soweit zutreffend;
- statistische Auswertung und Datenaufbereitung;
- bei Tests, in denen zur Auswertung die ANOVA zum Einsatz kommt, die geringste Dosiskonzentration, bei der eine Wirkung beobachtet wird (LOEC), bei $p=0,05$ und die höchste Dosiskonzentration, bei der keine Wirkung beobachtet wird (NOEC), für jede bewertete Reaktion, einschließlich einer Beschreibung der herangezogenen statistischen Verfahren und eine Angabe zum Umfang der Wirkung, die ermittelt werden konnte;
- bei Tests, die unter Zuhilfenahme von Regressionsverfahren ausgewertet werden, die LC/EC_x und Vertrauensbereiche sowie ein Graph des angepaßten Modells, das für deren Berechnung benutzt wurde;
- Erklärung für eine eventuelle Abweichung von dieser Prüfmethode.

LITERATUR

- (1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, pp 60. June 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. **10**, 121-173.
- (6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, **4**, pp 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, **6**, pp 61-71.
- (8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry **4**, pp 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, **9**, 129-145.
- (10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, **20**, 482-491.
- (14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
- (15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, **16**, pp 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, pp 81.

- (17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology - an invitation to the comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231-236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, 19-28.
- (20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, 1189-1203.
- (23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- (25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, pp 1-58.

TABELLE 1A: FÜR DIE PRÜFUNG EMPFOHLENE FISCHARTEN

SÜSSWASSERFISCHE
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regenbogenforelle (9)(16)
<i>Danio rerio</i> Zebrabärbling (7)(17)(18)
<i>Cyprinus caprio</i> Gemeiner Karpfen (8)(19)
<i>Oryzias latipes</i> Japankarpfing/Medaka (20)(21)
<i>Pimephales promelas</i> Dickkopfelritze (8)(22)

TABELLE 1B: BEISPIELE FÜR ANDERE HINREICHEND DOKUMENTIERTE ARTEN, DIE EBENFALLS VERWENDET WURDEN

SÜSSWASSERFISCHE	SALZWASSERFISCHE
<i>Carassius auratus</i> Goldfisch (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Gezeiten-Ährenfisch (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Blauer Sonnenbarsch (8)	<i>Clupea harengus</i> Hering (24)(25)
	<i>Gadus morhua</i> Kabeljau (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Edelsteinkarpfing (23)(24)(25)

ANHANG 1

ANLEITUNG ZUR DURCHFÜHRUNG EINER TOXIZITÄTSPRÜFUNG AN EMBRYONEN UND JUNGTIEREN MIT DOTTERSACK DES ZEBRABÄRBLINGS (*Brachydanio rerio*)

EINFÜHRUNG

Der Zebraäbrbling stammt von der Koromandelküste in Indien, wo er in schnellfließenden Strömen lebt. Er ist ein verbreiteter Aquarienfisch und gehört zur Familie der Karpfen; Informationen über seine Pflege und Kultur sind in Standardnachschlagewerken über tropische Fische zu finden. Die Biologie und die Verwendung des Zebraäbrblings in der Fischforschung wurden von Laale (1) besprochen.

Nur in seltenen Fällen erreicht der Fisch eine Länge von mehr als 45 mm. Sein Körper ist zylindrisch geformt mit 7 bis 9 dunkelblauen, waagrecht verlaufenden silbernen Streifen. Diese Streifen reichen bis in die Schwanz- und Afterflossen. Der Rücken ist olivgrün gefärbt. Männchen sind schlanker als Weibchen. Bei Weibchen ist die silberne Färbung stärker ausgeprägt, und ihr Bauch ist gebläht, vor allem vor dem Laichen.

Erwachsene Fische können große Schwankungen von Temperatur, pH-Wert und Härte vertragen. Um jedoch gesunde Fische zu erhalten, die Eier von guter Qualität produzieren, sollte für optimale Bedingungen gesorgt werden.

Beim Laichen verfolgt und begattet das Männchen das Weibchen, und im Ausstoßen werden die Eier befruchtet. Die Eier, die transparent sind und keinen klebrigen Stoff enthalten, fallen auf den Grund, wo sie von den Eltern aufgefressen werden können. Das Laichen wird durch Licht beeinflusst. Bei entsprechendem Morgenlicht laichen die Fische im allgemeinen in den ersten Stunden nach Tagesanbruch.

Ein Weibchen kann im Abstand von einer Woche Chargen von mehreren Hundert Eiern produzieren.

BEDINGUNGEN FÜR ELTERNFISCHE, FORTPFLANZUNG UND FRÜHE ENTWICKLUNGSSTADIEN

Eine geeignete Anzahl von gesunden Fischen auswählen und mindestens 2 Wochen vor dem beabsichtigten Laichen in geeignetem Wasser (z. B. Anhang 4) halten. Man sollte die Fischgruppe zumindest einmal brüten lassen, bevor sie die für die Prüfung zu verwendende Charge an Eiern produzieren. Die Fischdichte sollte in diesem Zeitraum 1 Gramm Fische je Liter nicht übersteigen. Durch einen regelmäßigen Wechsel des Wassers oder den Einsatz von Reinigungssystemen läßt sich eine höhere Dichte erreichen. Die Temperatur in den Hälterungsbehältern sollte bei $25 \pm 2^\circ \text{C}$ gehalten werden. Den Fischen sollte abwechslungsreiche Nahrung geboten werden, die beispielsweise aus entsprechendem handelsüblichem Trockenfutter, lebenden frischgeschlüpften Arthemien, Chironomiden, Daphnien oder weißen Würmern (Enchytraiden) bestehen kann.

Im folgenden werden zwei Verfahren in groben Zügen beschrieben, die in der Praxis eine ausreichende Charge von gesunden befruchteten Eiern für eine durchzuführende Prüfung ergeben haben:

- i. Acht Weibchen und 16 Männchen werden in einen Behälter mit 50 Litern Verdünnungswasser gesetzt, der vor direktem Licht geschützt und nach Möglichkeit mindestens 48 Stunden lang ungestört gelassen wird. Auf den Boden des Aquariums wird am Nachmittag des Tages, bevor die Prüfung beginnt, eine Laichschale gesetzt. Die Laichschale besteht aus einem Rahmen (aus Plexiglas oder einem anderen geeigneten Material) und ist 5 bis 7 cm hoch; am oberen Ende ist ein grobes Netz mit einer Maschenweite von 2 bis 5 mm befestigt, unten auf dem Boden ein feines Netz mit einer Maschenweite von 10 bis 30 μm . An dem groben Netz des Rahmens wird eine Reihe von 'Laichbäumen', die aus ungedrehtem Nylonfaden bestehen, befestigt. Nachdem die Fische 12 Stunden lang im Dunkeln gelassen wurden, wird ein schwaches Licht eingeschaltet, welches das Laichen in Gang setzen wird. Zwei bis vier Stunden nach dem Laichen wird die Laichschale entfernt und werden die Eier eingesammelt. Die Laichschale hindert die Fische daran, die Eier aufzufressen, und ermöglicht gleichzeitig ein einfaches Einsammeln der Eier. Die Fischgruppe sollte zumindest einmal vor dem Laich, von dem Eier für die Prüfung verwendet werden, gelaicht haben.

- ii. Fünf bis zehn Männchen und Weibchen werden mindestens 2 Wochen vor dem beabsichtigten Laichen einzeln gehalten. Nach 5 bis 10 Tagen sind die Bäuche der Weibchen gebläht und ihre Genitalpapillen sichtbar. Männliche Fische besitzen keine Papillen. Das Laichen erfolgt in Laichbehältern, die mit einem eingeschobenen Gitterboden ausgerüstet sind (wie oben). Der Behälter wird mit Verdünnungswasser gefüllt, so daß das Wasser 5 bis 10 cm über dem Gitter steht. Am Tag vor dem beabsichtigten Laichen werden ein Weibchen und zwei Männchen in den Behälter gesetzt. Die Wassertemperatur wird schrittweise ein Grad über die Eingewöhnungstemperatur erhöht. Das Licht wird ausgeschaltet, und der Behälter wird so ungestört wie möglich gelassen. Am Morgen wird ein schwaches Licht eingeschaltet, welches das Laichen in Gang setzen wird. Nach 2 bis 4 Stunden werden die Fische entfernt und die Eier eingesammelt. Werden größere Chargen von Eiern benötigt als von einem Weibchen gewonnen werden können, kann eine hinreichende Anzahl von Laichbehältern parallel aufgestellt werden. Dadurch, daß man den Reproduktionserfolg der einzelnen Weibchen vor der Prüfung festhält (Größe der Charge und Qualität), können die Weibchen mit dem höchsten Reproduktionserfolg für die Zucht ausgewählt werden.

Die Eier sollten mit Hilfe von Glasröhrchen (mit einem Innendurchmesser von nicht weniger als 4 mm), die mit einem flexiblen Saugkolben ausgestattet sind, in die Prüfgefäße umgesetzt werden. Dabei sollte die Menge Wasser, die zusammen mit den Eiern umgelagert wird, so gering wie möglich sein. Die Eier sind schwerer als Wasser und sinken aus dem Röhrchen. Vorsicht ist geboten, damit die Eier (und Larven) nicht mit Luft in Berührung kommen. Es sollte eine mikroskopische Untersuchung von einer oder mehreren Proben von der/den Charge(n) durchgeführt werden, um sicherzugehen, daß in den ersten Entwicklungsstadien keine Unregelmäßigkeiten vorliegen. Eine Desinfektion der Eier ist nicht zulässig.

Die Mortalitätsrate der Eier ist in den ersten 24 Stunden nach der Befruchtung am höchsten. In dieser Zeit ist häufig eine Mortalität von 5 bis 40 Prozent zu beobachten. Infolge einer erfolglosen Befruchtung oder aufgrund von Entwicklungsfehlern kommt es zur Degeneration von Eiern. Die Qualität der Eiercharge scheint dabei vom Fischweibchen abzuhängen; einige Weibchen produzieren gleichbleibend Eier von guter Qualität, andere tun das niemals. Auch die Entwicklungs- und Schlüpfzeit ist von Charge zu Charge unterschiedlich. Erfolgreich befruchtete Eier und Dottersacklarven überleben gut, normalerweise in einer Größenordnung von mehr als 90 Prozent. Bei einer Temperatur von 25° C schlüpfen die Eier 3 bis 5 Tage nach der Befruchtung, und der Dottersack ist etwa 13 Tage nach der Befruchtung aufgezehrt.

Die Embryonalentwicklung wurde von Hisaoka und Battle (2) gut bestimmt. Aufgrund der Transparenz der Eier und der Larven nach dem Schlüpfen kann die Entwicklung der Fische verfolgt werden und lassen sich vorhandene Mißbildungen beobachten. Etwa 4 Stunden nach dem Laichen können unbefruchtete Eier von befruchteten unterschieden werden (3). Zu dieser Untersuchung werden Eier und Larven in Prüfgefäße mit geringem Fassungsvermögen gesetzt und unter dem Mikroskop untersucht.

Die für die frühen Entwicklungsstufen geltenden Prüfbedingungen sind in Anhang 2 aufgeführt. Optimal als pH-Wert und Härte für das Verdünnungswasser sind 7,8 beziehungsweise 250 mg CaCO₃/l.

BERECHNUNGEN UND STATISTIK

Vorgeschlagen wird eine zweistufige Vorgehensweise. In einem ersten Schritt werden Daten zu Mortalität, abnormer Entwicklung und Schlüpfzeit statistisch ausgewertet. Dann wird bei denjenigen Konzentrationen, bei denen keine negativen Auswirkungen auf einen dieser Parameter festgestellt wurden, die Körperlänge statistisch bewertet. Diese Vorgehensweise ist ratsam, da der toxische Stoff kleinere Fische selektiv töten, die Schlüpfzeit verlängern und grobe Mißbildungen hervorrufen und somit zu einseitigen Längenmessungen führen kann. Außerdem soll in etwa die gleiche Anzahl von Fischen für jede Behandlung vermessen werden, um die Validität der Prüfstatistik sicherzustellen.

BESTIMMUNG DER LC₅₀ UND EC₅₀

Der prozentuale Anteil an überlebenden Eiern und Larven wird berechnet und um die Mortalität in den Kontrollen nach der Abbottschen Formel korrigiert (4):

$$P=100-\left(\frac{C-P'}{C}\cdot x100\right)$$

Dabei gilt:

P =	korrigierter prozentualer Anteil an überlebenden Eiern und Larven
P' =	beobachteter prozentualer Anteil an überlebenden Eiern und Larven in der Prüfkonzentration
C =	prozentualer Anteil an überlebenden Eiern und Larven in der Kontrolle.

Soweit möglich, wird die LC₅₀ am Ende der Prüfung mittels einer geeigneten Methode bestimmt.

Wird die Berücksichtigung von morphologischen Abnormitäten in der EC₅₀-Statistik gewünscht, finden sich dazu bei Stephan (5) entsprechende Hinweise.

SCHÄTZUNG DER LOEC UND NOEC

Eine Zielsetzung, die mit der Prüfung an Eiern und Jungfischen im Dottersack verfolgt wird, besteht darin, die Konzentrationen, die nicht wirkungslos sind, mit der Kontrolle zu vergleichen, das heißt, die LOEC zu bestimmen. Aus diesem Grunde sollten Mehrfachvergleichsverfahren zum Einsatz kommen (6)(7)(8)(9)(10).

LITERATURHINWEISE

- (1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. **10**, 121-173.
- (2) Hisaoka K.K. and Battle H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., **102**, pp 311.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, **2**, pp 173-181.
- (4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp 1-333.
- (5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp 69-81.
- (6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, **20**, 482-491.
- (8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, **27**, pp 103-117.
- (9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics **28**, pp 519-531.
- (10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

ANHANG 2

PRÜFBEDINGUNGEN, DAUER UND ÜBERLEBENSKRITERIEN FÜR EMPFOHLENE FISCHARTEN

FISCHART	TEMP (° C)	SALZ- GEHALT (0/00)	BELICH- TUNGS- DAUER (Std.)	DAUER DER STADIEN (Tage)		TYPISCHE DAUER DER PRÜFUNG	ÜBERLEBENSRATE IN DER KONTROLLE, (MIN.- %)	
				Embryonen	Jungfische mit Dottersack		Schlüpf- erfolg	Nach dem Schlüpfen
SÜSSWASSERFISCHE								
<i>Brachydanio rerio</i> Zebraärbli	25 ± 1	–	12 – 16	3 – 5	8 – 10	So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 5 Tage nach dem Schlüpfen (8 – 10 Tage).	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Regenbogenforelle	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	–	0 ^(a)	30 – 35	25 – 30	So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 20 Tage nach dem Schlüpfen (50 – 55 Tage).	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Gemeiner Karpfen	21 – 25	–	12 – 16	5	> 4	So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 4 Tage nach dem Schlüpfen (8 - 9 Tage).	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Japankarpfling/Medaka	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	–	12 – 16	8 – 11	4 – 8	So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 5 Tage nach dem Schlüpfen (13 – 16 Tage).	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Fettköpfige Elritze	25 ± 2	–	16	4 – 5	5	So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 4 Tage nach dem Schlüpfen (8 - 9 Tage).	60	70

⁽¹⁾ Für Embryonen ⁽²⁾ Für Larven

^(a) Dunkelheit für Embryonen und Larven bis eine Woche nach dem Schlüpfen, ausgenommen diese werden kontrolliert. Dann gedämpfte Beleuchtung während der gesamten Prüfung.

ANHANG 3

PRÜFBEDINGUNGEN, DAUER UND ÜBERLEBENSKRITERIEN FÜR ANDERE HINREICHEND DOKUMENTIERTE FISCHARTEN

FISCHART	TEMP (°C)	SALZ- GEHALT (0/00)	BELICHTUNGS- DAUER (Std.)	DAUER DER STADIEN (Tage)		TYPISCHE DAUER DER PRÜFUNG AN EMBRYONEN UND JUNGFISCHEN MIT DOTTERSACK	ÜBERLEBENSRATE IN DER KONTROLLE (MIN.- %)	
				EMBRY- ONEN	JUNG- FISCHE MIT DOTTER- SACK		Schlüpf- erfolg	Nach dem Schlüpfen
SÜSSWASSER- FISCHE								
<i>Carassius auratus</i> Goldfisch	24 ± 1	–	–	3 – 4	> 4	So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 4 Tage nach dem Schlüpfen (7 Tage).	–	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Blauer Sonnenbarsch	21 ± 1	–	16	3	> 4	So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 4 Tage nach dem Schlüpfen (7 Tage).	–	75
SALZWASSER- FISCHE								
<i>Menidia peninsulae</i> Gezeiten-Ährenfisch	22 – 25	15 – 22	12	1.5	10	So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 5 Tage nach dem Schlüpfen (6 – 7 Tage).	80	60
<i>Clupea harengus</i> Hering	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 - 5	So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 3 Tage nach dem Schlüpfen (23 - 27 Tage).	60	80
<i>Gadus morhua</i> Kabeljau	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 3 Tage nach dem Schlüpfen (18 Tage).	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Edelsteinkärpfling	25 ± 1	15 – 30	12	–	–	So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) 4/7 Tage nach dem Schlüpfen (28 Tage).	> 75	80

ANHANG 4

**VERSCHIEDENE CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES
ANNEHMBAREN VERDÜNNUNGSWASSERS**

SUBSTANZ	KONZENTRATIONEN
Partikelgehalt	< 20 mg/l
Gesamter organischer Kohlenstoff (TOC)	< 2 mg/l
Nichtionisierter Ammoniak	< 1 µg/l
Restchlor	< 10 µg/l
Gesamte phosphororganische Pestizide	< 50 ng/l
Gesamte chlororganische Pestizide plus polychlorierte Biphenyle	< 50 ng/l
Gesamtes organisches Chlor	< 25 ng/l

C.16. HONIGBIENEN – AKUTE ORALE TOXIZITÄTSPRÜFUNG

1. METHODE

Diese Methode zur Prüfung der akuten Toxizität entspricht der OECD TG 213 (1998).

1.1 EINLEITUNG

Diese Toxizitätsprüfung ist ein Laborverfahren, mit dem die akute orale Toxizität von Pflanzenschutzmitteln und anderen Chemikalien für erwachsene Arbeitshonigbienen bewertet werden soll.

Bei der Bewertung und Beurteilung der toxischen Merkmale von Substanzen ist unter Umständen die Bestimmung der akuten oralen Toxizität bei Bienen erforderlich, beispielsweise wenn die Wahrscheinlichkeit einer Exposition von Bienen gegenüber einer bestimmten Chemikalie besteht. Die akute orale Toxizitätsprüfung wird durchgeführt, um die spezifische Toxizität von Pestiziden und anderen Chemikalien für Bienen zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Prüfung sollten herangezogen werden, um festzulegen, ob weiterer Beurteilungsbedarf besteht. Diese Methode kann insbesondere in schrittweise aufgebauten Programmen zur Bewertung der Gefahren von Pflanzenschutzmitteln für Bienen verwendet werden, die auf einem sequentiellen Übergang von Labortoxizitätsprüfungen auf Halbfreiland- und Freilandversuche beruhen (1). Pestizide können dabei als Wirkstoffe oder als formulierte Produkte geprüft werden.

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit der Bienen und der Genauigkeit des Prüfverfahrens sollte ein toxischer Standard verwendet werden.

1.2 BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Akute orale Toxizität: Dies sind die negativen Wirkungen, die innerhalb eines Zeitraums von maximal 96 Stunden bei einer oralen Verabreichung einer einfachen Dosis der Prüfsubstanz auftreten.

Dosis: Dies ist die aufgenommene Menge an Prüfsubstanz. Die Dosis wird als Masse (μg) Prüfsubstanz je Prüftier ausgedrückt ($\mu\text{g}/\text{Biene}$). Die tatsächliche Dosis für jede einzelne Biene kann zwar nicht berechnet werden, da die Bienen gemeinsam gefüttert werden, es läßt sich jedoch eine durchschnittliche Dosis abschätzen (insgesamt aufgenommene Prüfsubstanz/Anzahl der Testbienen in einem Käfig).

Orale LD₅₀ (mittlere letale Dosis): Dies ist die statistisch abgeleitete einfache Dosis einer Substanz, die bei oraler Verabreichung bei 50 % der Tiere zum Tod führen kann. Der LD₅₀-Wert wird in μg Prüfsubstanz je Biene angegeben. Bei Pflanzenschutzmitteln kann die Prüfsubstanz entweder als Wirkstoff oder als formuliertes Produkt mit einem oder mehreren Wirkstoffen vorliegen.

Mortalität: Ein Tier wird als tot protokolliert, wenn es absolut unbeweglich ist.

1.3 PRINZIP DER METHODE

Erwachsene Arbeitshonigbienen (*Apis mellifera*) werden einem Bereich von Dosen der in einer Zuckerlösung dispergierten Prüfsubstanz ausgesetzt. Die Bienen werden dann mit derselben Lösung, jedoch ohne die Prüfsubstanz, gefüttert. Die Mortalität wird täglich im Verlauf von zumindest 48 Stunden protokolliert und mit Kontrollwerten verglichen. Wenn die Mortalitätsrate in der Zeit zwischen 24 Stunden und 48 Stunden zunimmt, während die Kontrollmortalität auf einem akzeptierten Stand bleibt, d. h., $\leq 10\%$, ist es angebracht, die Dauer der Prüfung auf maximal 96 Stunden zu verlängern. Die Ergebnisse werden ausgewertet, um die LD₅₀ für 24 Stunden und 48 Stunden und, sofern die Untersuchung verlängert wurde, für 72 Stunden und 96 Stunden zu berechnen.

1.4 VALIDITÄTSKRITERIEN

Damit die Validität einer Prüfung gegeben ist, gelten die folgenden Bedingungen:

— Die durchschnittliche Mortalität darf bei der gesamten Anzahl an Kontrollen 10 % am Ende der Prüfung nicht übersteigen;

— die LD₅₀ der toxischen Bezugsnormale entspricht dem festgelegten Bereich.

1.5 BESCHREIBUNG DER METHODE

1.5.1 **Sammlung der Bienen**

Es sollten junge erwachsene Arbeiterinnen derselben Rasse verwendet werden, d. h., Bienen gleichen Alters, gleichen Ernährungszustands, usw. Die Bienen sollten aus angemessen gefütterten, gesunden, möglichst krankheitsfreien Völkern mit Königin stammen, deren Vorgeschichte und physiologischer Zustand bekannt ist. Sie könnten am Morgen der Verwendung oder am Abend vor der Prüfung gesammelt und bis zum nächsten Tag unter Prüfbedingungen gehalten werden. Bienen, die von Rähmchen ohne Brut gesammelt werden, sind geeignet. Eine Sammlung im frühen Frühjahr oder Spätherbst sollte vermieden werden, da die Bienen in dieser Zeit eine veränderte Physiologie aufweisen. Müssen Prüfungen im frühen Frühjahr oder Spätherbst durchgeführt werden, können Bienen in einem Brutschrank zum Schlüpfen gebracht und eine Woche lang mit „Bienenbrot“ (aus der Wabe gesammelte Pollen) und Zuckerlösung aufgezogen werden. Bienen, die mit chemischen Substanzen behandelt wurden wie z. B. Antibiotika, Anti-Varroa-Produkten, usw., sollten nach dem Ende der letzten Behandlung vier Wochen nicht für Toxizitätsprüfungen eingesetzt werden.

1.5.2 **Unterbringungs- und Fütterungsbedingungen**

Verwendet werden einfach zu säubernde und gut belüftete Käfige. Dabei kann jedes geeignete Material verwendet werden, beispielsweise Edelstahl-, Drahtgitter-, Kunststoff- oder Einwegholzkäfige, usw. Es sollten möglichst Gruppen von jeweils zehn Bienen pro Käfig zum Einsatz kommen. Die Größe der Prüfkäfige sollte der Anzahl der Bienen entsprechen, d. h., angemessenen Platz bieten.

Die Bienen sollten im Dunkeln in einem Versuchsraum mit einer Temperatur von $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ gehalten werden. Die relative Feuchte, die im Normalfall zwischen 50 und 70 % liegt, sollte während der gesamten Prüfung gemessen und protokolliert werden. Alle Tätigkeiten, einschließlich Behandlung und Beobachtungen, können bei (Tages-) Licht durchgeführt werden. Als Futter wird eine Zuckerlösung in Wasser mit einer endgültigen Konzentration von 500 g/l (50 % Gew./Vol.) verwendet. Nach Verabreichung der Prüfdosen sollte das Futter nach Belieben dargeboten werden. Das Fütterungssystem sollte die Möglichkeit bieten, die Futteraufnahme für jeden Käfig zu protokollieren (siehe Abschnitt 1.6.3.1). Es kann ein Glasröhrchen (circa 50 mm lang und 10 mm breit und am offenen Ende auf einen Durchmesser von etwa 2 mm verjüngt) verwendet werden.

1.5.3 **Vorbereitung der Bienen**

Die gesammelten Bienen werden nach dem Zufallsprinzip auf die Prüfkäfige verteilt, die ebenfalls zufällig in dem Versuchsraum angeordnet sind.

Vor Beginn der Prüfung kann man die Bienen bis zu 2 Stunden hungern lassen. Es wird empfohlen, den Bienen vor der Behandlung die Nahrung zu entziehen, damit der Darminhalt zu Beginn der Prüfung bei allen Bienen gleich ist. Im Sterben liegende Bienen sollten ausgesondert und vor Beginn der Prüfung durch gesunde Bienen ersetzt werden.

1.5.4 **Herstellung der Dosen**

Sofern es sich bei der Prüfsubstanz um eine mit Wasser mischbare Verbindung handelt, kann diese direkt in einer 50%igen Zuckerlösung dispergiert werden. Bei technischen Produkten und Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit können Trägersubstanzen wie organische Lösemittel, Emulgatoren oder Dispersionsmittel mit geringer Bienentoxizität verwendet werden (z. B. Aceton, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid). Die Konzentration des Trägers hängt dabei von der Löslichkeit der Prüfsubstanz ab und sollte für alle geprüften Konzentrationen gleich sein. Im allgemeinen ist eine Konzentration der Trägersubstanz von 1 % angemessen und sollte nicht überschritten werden.

Es sollten entsprechende Kontrollösungen hergestellt werden, d. h., wird ein Löse- oder Dispersionsmittel zur Lösung der Prüfsubstanz benutzt, sollten zwei getrennte Kontrollgruppen verwendet werden, und zwar eine Lösung in Wasser und eine Zuckerlösung mit dem Lösemittel/Träger in der Konzentration, die auch in den Dosierlösungen vorliegt.

1.6 VORGEHENSWEISE

1.6.1 **Prüf- und Kontrollgruppen**

Die Anzahl an geprüften Dosen und Wiederholungen sollte die statistischen Anforderungen für eine Bestimmung der LD₅₀ mit einem 95 %igen Vertrauensbereich erfüllen. Im Normalfall sind für die Prüfung fünf Dosen in einer geometrischen Reihe, die sich um einen Faktor von nicht mehr als 2,2 unterscheiden und den Bereich für die LD₅₀, abdecken, erforderlich. Der Verdünnungsfaktor und die Anzahl an Konzentrationen für die Dosierung müssen jedoch im Verhältnis zur Steigung der Toxizitätskurve (Dosis im Verhältnis zu Mortalität) unter Berücksichtigung der für die Auswertung der Ergebnisse herangezogenen statistischen Methode bestimmt werden. Mit Hilfe einer Vorprüfung zur Bestimmung des Konzentrationsbereichs lassen sich die angemessenen Konzentrationen für die Dosierung auswählen.

Mindestens drei Wiederholungsprüfgruppen von jeweils zehn Bienen sollten jeder Prüfkonzentrationsdosis ausgesetzt werden. Zusätzlich zu den Prüfreiheiten sollten mindestens drei Kontrollgruppen von jeweils zehn Bienen zum Einsatz kommen. Kontrollgruppen sollten auch für die verwendeten Lösemittel/Trägersubstanzen einbezogen werden (siehe Abschnitt 1.5.4).

1.6.2 **Toxischer Standard**

In die Prüfreiheiten ist ein toxischer Standard aufzunehmen. Zumindest drei Dosen sollten ausgewählt werden, die den erwarteten LD₅₀-Wert abdecken. Für jede Prüfdosis sollten mindestens drei Wiederholungskäfige mit jeweils zehn Bienen verwendet werden. Der bevorzugte toxische Standard ist Dimethoat; für diesen Stoff liegt die nachgewiesene orale LD₅₀ für 24 Stunden im Bereich von 0,10 bis 0,35 µg Wirkstoff/Biene (2). Andere toxische Standards wären jedoch annehmbar, soweit hinreichende Daten zur Überprüfung der erwarteten Dosisreaktion vorgelegt werden können (z. B. Parathion).

1.6.3 **Exposition**

1.6.3.1 *Verabreichung der Dosen*

Jeder Prüfgruppe von Bienen müssen 100 bis 200 µl einer 50 %igen Zuckerlösung in Wasser mit der Prüfsubstanz in der entsprechenden Konzentration verabreicht werden. Bei Produkten mit geringer Löslichkeit, niedriger Toxizität oder geringer Konzentration in der Rezeptur ist ein größeres Volumen erforderlich, da dann größere Anteile an Zuckerlösung verwendet werden müssen. Die Menge an aufgenommener Nahrung je Gruppe ist festzuhalten. Nach dem Verzehr (im allgemeinen innerhalb von 3 bis 4 Stunden) muß die Fütterungsvorrichtung aus dem Käfig entfernt und durch eine Vorrichtung, die ausschließlich Zuckerlösung enthält, ersetzt werden. Die Zuckerlösung wird dann nach Belieben dargeboten. Bei einigen Verbindungen kann bei höheren Konzentrationen die Ablehnung der Prüfdosis dazu führen, daß nur wenig oder gar kein Futter aufgenommen wird. Nach maximal 6 Stunden sollte das bis dahin unverbrauchte behandelte Futter durch eine reine Zuckerlösung ersetzt werden. Die Menge an aufgenommenem behandeltem Futter muß gemessen werden (z. B. Messung von Volumen/Gewicht des noch verbleibenden behandelten Futters).

1.6.3.2 *Dauer*

Die Dauer der Prüfung sollte vorzugsweise 48 Stunden ab dem Zeitpunkt, zu dem die Prüflösung durch die Zuckerlösung allein ersetzt wurde, betragen. Steigt die Mortalität nach den ersten 24 Stunden weiterhin um mehr als 10 % an, sollte die Prüfdauer auf maximal 96 Stunden verlängert werden, sofern die Kontrollmortalität nicht über 10 % hinausgeht.

1.6.4 **Beobachtungen**

Die Mortalität wird 4 Stunden nach Beginn der Prüfung und dann nach 24 Stunden und 48 Stunden protokolliert (d. h., nach Verabreichung der Dosis). Ist ein verlängerter Beobachtungszeitraum erforderlich, sollten weitere Bewertungen im Abstand von 24 Stunden bis maximal 96 Stunden vorgenommen werden, sofern die Kontrollmortalität 10 % nicht übersteigt.

Die Menge an aufgenommenem Futter pro Gruppe muß gemessen werden. Ein Vergleich zwischen den Anteilen an verzehrtem behandeltem und unbehandeltem Futter innerhalb der vorgegebenen 6 Stunden kann Aufschluß über die Genießbarkeit des behandelten Futters geben. Alle anomalen Verhaltensweisen während des Prüfzeitraums müssen protokolliert werden.

1.6.5 **Limit-Test**

In einigen Fällen (z. B. wenn man erwartet, daß die Prüfsubstanz eine geringe Toxizität besitzt) kann ein Limit-Test mit 100 µg Wirkstoff/Biene durchgeführt werden, um nachzuweisen, daß die LD₅₀ höher als dieser Wert ist. Dabei sollte das gleiche Verfahren zum Einsatz kommen, einschließlich drei Wiederholungsprüfgruppen für die Prüfdosis, die betreffenden Kontrollen, die Messung der Menge an verzehrtem behandeltem Futter und die Verwendung des toxischen Standards. Sofern Mortalitäten auftreten, sollte eine vollständige Untersuchung durchgeführt werden. Eventuell beobachtete subletale Wirkungen (siehe Abschnitt 1.6.4) müssen dokumentiert werden.

2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

2.1 **DATEN**

Daten sollten in tabellarischer Form zusammengefaßt werden, wobei für jede Behandlungsgruppe sowie für die Kontrollgruppe und die Gruppe mit dem toxischen Standard die Anzahl an eingesetzten Bienen, die Mortalität für jede Beobachtungszeit und die Anzahl an Bienen mit beeinträchtigtem Verhalten auszuweisen sind. Die Mortalitätsdaten sind mit angemessenen statistischen Verfahren zu analysieren (z. B. Probit-Analyse, gleitender Durchschnitt, binomiale Wahrscheinlichkeit) (3)(4). Die Dosisreaktionskurven sind für jede empfohlene Beobachtungszeit darzustellen, und die Steigungen der Kurven und die mittleren letalen Dosen (LD₅₀) sind mit einem 95 % Vertrauensbereich zu berechnen. Korrekturen an der Kontrollmortalität könnten mit Hilfe der Abbottschen Korrektur vorgenommen werden (4)(5). Sofern das behandelte Futter nicht vollständig verzehrt wurde, sollte die Prüfsubstanzdosis, die von jeder Gruppe aufgenommen wurde, ermittelt werden. Die LD₅₀ sollte in µg Prüfsubstanz je Biene angegeben werden.

2.2 **PRÜFBERICHT**

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

2.2.1 **Prüfsubstanz:**

- Physikalische Beschaffenheit und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. Stabilität in Wasser, Dampfdruck);
- Daten zur chemischen Identifikation, einschließlich Strukturformel, Reinheit (d. h., für Pflanzenschutzmittel die Identität und Konzentration des/der Wirkstoffs(e)).

2.2.2 **Gepriüfte Bienenart:**

- Wissenschaftlicher Name, Rasse, ungefähres Alter (in Wochen), Sammlungsverfahren, Datum der Sammlung;
- Angaben über die Völker, die für die Sammlung der Prüfbienen eingesetzt wurden, einschließlich Gesundheitszustand, eventuelle Krankheiten von erwachsenen Bienen, eventuelle Vorbehandlungen, usw.

2.2.3 **Prüfbedingungen:**

- Temperatur und relative Feuchte des Versuchsraums;
- Unterbringungsbedingungen einschließlich Art, Größe und Material der Käfige;
- Verfahren für die Herstellung der Stamm- und Prüflösungen (sofern ein Lösemittel verwendet wird, müssen dieses Mittel und seine Konzentration angegeben werden);
- Versuchsanlage, z. B. Anzahl und eingesetzte Prüfkonzentrationen, Anzahl an Kontrollen; für jede Prüfkonzentration und Kontrolle Anzahl an Wiederholungskäfigen und Anzahl an Bienen pro Käfig;
- Datum der Prüfung.

2.2.4

Ergebnisse:

- Ergebnisse von eventuellen Vorversuchen zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs;
- Rohdaten: Mortalität bei jeder geprüften Dosis zu jeder Beobachtungszeit;
- Darstellung der Dosisreaktionskurven am Ende der Prüfung;
- LD₅₀-Werte mit 95 %igem Vertrauensbereich für jede empfohlene Beobachtungszeit, jede Prüfsubstanz und den toxischen Standard;
- zur Bestimmung der LD₅₀ herangezogene statistische Verfahren;
- Mortalität in Kontrollen;
- sonstige beobachtete oder gemessene biologische Wirkungen, z. B. abnormes Verhalten der Bienen (einschließlich Ablehnung der Prüfdosis), Anteil an verzehrtem Futter in behandelten und unbehandelten Gruppen;
- eventuelle Abweichungen von den hier beschriebenen Prüfverfahren und sonstige relevante Informationen.

3.

LITERATURHINWEISE

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

C.17. HONIGBIENEN - AKUTE KONTAKTTOXIZITÄTSPRÜFUNG

1. METHODE

Diese Methode zur Prüfung der akuten Toxizität entspricht der OECD TG 214 (1998).

1.1 EINLEITUNG

Diese Toxizitätsprüfung ist ein Laborverfahren, mit dem die akute Kontakttoxizität von Pflanzenschutzmitteln und anderen Chemikalien für erwachsene Arbeitshonigbienen bewertet werden soll.

Bei der Bewertung und Beurteilung der toxischen Merkmale von Substanzen ist unter Umständen die Bestimmung der akuten Kontakttoxizität bei Bienen erforderlich, beispielsweise wenn die Wahrscheinlichkeit einer Exposition von Bienen gegenüber einer bestimmten Chemikalie besteht. Die akute Kontakttoxizitätsprüfung wird durchgeführt, um die spezifische Toxizität von Pestiziden und anderen Chemikalien für Bienen zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Prüfung sollten herangezogen werden, um festzulegen, ob weiterer Beurteilungsbedarf besteht. Diese Methode kann insbesondere in schrittweise aufgebauten Programmen zur Bewertung der Gefahren von Pflanzenschutzmitteln für Bienen verwendet werden, die auf einem sequentiellen Übergang von Labortoxizitätsprüfungen auf Halbfreiland- und Freilandversuche beruhen (1). Pestizide können dabei als Wirkstoffe oder als formulierte Produkte geprüft werden.

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit der Bienen und der Genauigkeit des Prüfverfahrens sollte ein toxischer Standard verwendet werden.

1.2 BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Akute Kontakttoxizität: Dies sind die negativen Wirkungen, die innerhalb eines Zeitraums von maximal 96 Stunden bei einer topikalen Verabreichung einer einzelnen Dosis der Prüfsubstanz auftreten.

Dosis: Dies ist die aufgebrachte Menge an Prüfsubstanz. Die Dosis wird als Menge (μg) Prüfsubstanz je Prüftier angegeben ($\mu\text{g}/\text{Biene}$).

Kontakt-LD₅₀ (mittlere letale Dosis): Dies ist die statistisch abgeleitete einzelne Dosis einer Substanz, die bei Verabreichung durch Kontakt bei 50 % der Tiere zum Tod führen kann. Der LD₅₀-Wert wird in μg Prüfsubstanz je Biene angegeben. Bei Pestiziden kann die Pflanzenschutzmittel entweder als Wirkstoff oder als formuliertes Produkt mit einem oder mehreren Wirkstoffen vorliegen.

Mortalität: Ein Tier wird als tot protokolliert, wenn es absolut unbeweglich ist.

1.3 PRINZIP DER METHODE

Erwachsene Arbeitshonigbienen (*Apis mellifera*) werden einem Bereich von Dosen der in einem entsprechenden Träger gelösten Prüfsubstanz durch direktes Aufbringen auf den Thorax (Tröpfchen) ausgesetzt. Die Dauer der Prüfung beträgt 48 Stunden. Wenn die Mortalitätsrate in der Zeit zwischen 24 Stunden und 48 Stunden zunimmt, während die Kontrollmortalität auf einem akzeptierten Stand bleibt, d. h., $\leq 10\%$, ist es angebracht, die Dauer der Prüfung auf maximal 96 Stunden zu verlängern. Die Mortalität wird täglich protokolliert und mit Kontrollwerten verglichen. Die Ergebnisse werden ausgewertet, um die LD₅₀ für 24 Stunden und 48 Stunden und, sofern die Untersuchung verlängert wurde, für 72 Stunden und 96 Stunden zu berechnen.

1.4 VALIDITÄTSKRITERIEN

Damit die Validität einer Prüfung gegeben ist, gelten die folgenden Bedingungen:

- Die durchschnittliche Mortalität darf bei der gesamten Anzahl an Kontrollen 10 % am Ende der Prüfung nicht übersteigen;
- die LD₅₀ des toxischen Standards entspricht dem festgelegten Bereich.

1.5 BESCHREIBUNG DER METHODE

1.5.1 **Sammlung der Bienen**

Es sollten junge erwachsene Arbeiterinnen verwendet werden, d. h., Bienen gleichen Alters, gleichen Ernährungszustands, gleicher Rasse, usw. Die Bienen sollten aus angemessen gefütterten, gesunden, möglichst krankheitsfreien Völkern mit Königin stammen, deren Vorgeschichte und physiologischer Zustand bekannt ist. Sie könnten am Morgen der Verwendung oder am Abend vor der Prüfung gesammelt und bis zum nächsten Tag unter Prüfbedingungen gehalten werden. Bienen, die von Rähmchen ohne Brut gesammelt werden, sind geeignet. Eine Sammlung im frühen Frühjahr oder Spätherbst sollte vermieden werden, da die Bienen in dieser Zeit eine veränderte Physiologie aufweisen. Müssen Prüfungen im frühen Frühjahr oder Spätherbst durchgeführt werden, können Bienen in einem Brutschrank zum Schlüpfen gebracht und eine Woche lang mit „Bienenbrot“ (aus der Wabe gesammelte Pollen) und Zuckerlösung aufgezogen werden. Bienen, die mit chemischen Substanzen behandelt wurden wie z. B. Antibiotika, Anti-Varroa-Produkten, usw., sollten nach dem Ende der letzten Behandlung vier Wochen nicht für Toxizitätsprüfungen eingesetzt werden.

1.5.2 **Unterbringungs- und Fütterungsbedingungen**

Verwendet werden einfach zu säubernde und gut belüftete Käfige. Dabei kann jedes geeignete Material benutzt werden, beispielsweise Edelstahl-, Drahtgitter-, Kunststoff- oder Einwegholzkäfige, usw. Die Größe der Prüfkäfige sollte der Anzahl der Bienen entsprechen, d. h., angemessenen Platz bieten. Es sollten möglichst Gruppen von jeweils zehn Bienen pro Käfig zum Einsatz kommen.

Die Bienen sollten im Dunkeln in einem Versuchsraum mit einer Temperatur von $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ gehalten werden. Die relative Feuchte, die im Normalfall zwischen 50 und 70 % liegt, sollte während der gesamten Prüfung gemessen und protokolliert werden. Alle Tätigkeiten, einschließlich Behandlung und Beobachtungen, können bei (Tages-) Licht durchgeführt werden. Als Futter sollte eine Zuckerlösung in Wasser mit einer endgültigen Konzentration von 500 g/l (50 % Gew./Vol.) verwendet und nach Belieben während der Prüfdauer mit Hilfe einer Bienenfütterungsvorrichtung dargeboten werden. Dies kann ein Glasröhrchen (circa 50 mm lang und 10 mm breit und am offenen Ende auf einen Durchmesser von etwa 2 mm verjüngt) sein.

1.5.3 **Vorbereitung der Bienen**

Die gesammelten Bienen können mit Kohlendioxid oder Stickstoff zum Aufbringen der Prüfsubstanz betäubt werden. Dabei sollten die Menge an Betäubungsmittel und dessen Einwirkungszeit so gering wie möglich gehalten werden. Im Sterben liegende Bienen sollten ausgesondert und vor Beginn der Prüfung durch gesunde Bienen ersetzt werden.

1.5.4 **Herstellung der Dosen**

Die Prüfsubstanz ist als Lösung in einer Trägersubstanz aufzubringen, d. h., einem organischen Lösemittel oder einer Wasserlösung mit einem Benetzungsmittel. Als organisches Lösemittel wird Aceton bevorzugt, aber auch andere organische Lösemittel mit geringer Bienentoxizität können verwendet werden (z. B. Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid). Bei in Wasser dispergierten formulierten Produkten und hochpolaren organischen Substanzen, die in organischen Trägerlösemitteln nicht löslich sind, lassen sich die Lösungen unter Umständen einfacher auftragen, wenn sie in einer schwachen Lösung eines handelsüblichen Benetzungsmittels hergestellt werden (z. B. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

Es sollten entsprechende Kontrollösungen hergestellt werden, d. h., wird ein Löse- oder Dispersionsmittel zur Lösung der Prüfsubstanz benutzt, sollten zwei getrennte Kontrollgruppen verwendet werden, und zwar eine, die mit Wasser, und eine, die mit dem Löse-/Dispersionsmittel behandelt ist.

1.6 VORGEHENSWEISE

1.6.1 **Prüf- und Kontrollgruppen**

Die Anzahl an geprüften Dosen und Wiederholungen sollte die statistischen Anforderungen für eine Bestimmung der LD₅₀ mit einem 95 %igen Vertrauensbereich erfüllen. Im Normalfall sind für die Prüfung fünf Dosen in einer geometrischen Reihe, die sich um einen Faktor von nicht mehr als 2,2 unterscheiden und den Bereich für die LD₅₀, abdecken, erforderlich. Die Anzahl an Dosen muß jedoch im Verhältnis zur Steigung der Toxizitätskurve (Dosis im Verhältnis zu Mortalität) unter Berücksichtigung der für die Auswertung der Ergebnisse herangezogenen statistischen Methode bestimmt werden. Mit Hilfe einer Vorprüfung zur Bestimmung des Konzentrationsbereichs lassen sich die angemessenen Dosen auswählen.

Mindestens drei Wiederholungsprüfgruppen von jeweils zehn Bienen sollten jeder Prüfkonzentrationsdosis ausgesetzt werden.

Zusätzlich zu den Prüfreiheiten sollten mindestens drei Kontrollgruppen von jeweils zehn Bienen zum Einsatz kommen. Wird ein organisches Lösemittel oder ein Benetzungsmittel verwendet, müssen drei zusätzliche Kontrollgruppen mit jeweils zehn Bienen für das Löse- oder Benetzungsmittel mit einbezogen werden.

1.6.2 **Toxischer Standard**

In die Prüfreiheiten ist ein toxischer Standard aufzunehmen. Zumindest drei Dosen sollten ausgewählt werden, die den erwarteten LD₅₀-Wert abdecken. Für jede Prüfdosis sollten mindestens drei Wiederholungskäfige mit jeweils zehn Bienen verwendet werden. Der bevorzugte toxische Standard ist Dimethoat; für diesen Stoff liegt die nachgewiesene Kontakt-LD₅₀ für 24 Stunden im Bereich von 0,10 bis 0,30 µg Wirkstoff/Biene (2). Andere toxische Standards wären jedoch annehmbar, soweit hinreichende Daten zur Überprüfung der erwarteten Dosisreaktion vorgelegt werden können (z. B. Parathion).

1.6.3 **Exposition**

1.6.3.1 *Verabreichung der Dosen*

Bei den betäubten Bienen erfolgt jeweils einzeln eine topikale Aufbringung. Die Bienen werden nach dem Zufallsprinzip den verschiedenen Prüfdosen und Kontrollen zugeordnet. Ein Volumen von 1 µl Lösung mit der Prüfsubstanz in der geeigneten Konzentration wird mit einem Mikroapplikator auf die Dorsalseite des Thorax einer jeden Biene aufgetragen. Sofern begründet, können andere Volumina verwendet werden. Nach dem Auftragen werden die Bienen auf die Prüfkäfige verteilt und mit den Zuckerlösungen versorgt.

1.6.3.2 *Dauer*

Die Dauer der Prüfung sollte vorzugsweise 48 Stunden betragen. Steigt die Mortalität zwischen 24 und 48 Stunden um mehr als 10 % an, sollte die Prüfdauer auf maximal 96 Stunden verlängert werden, sofern die Kontrollmortalität nicht über 10 % hinausgeht.

1.6.4 **Beobachtungen**

Die Mortalität wird 4 Stunden nach der Dosierung und dann nach 24 Stunden und 48 Stunden protokolliert. Ist ein verlängerter Beobachtungszeitraum erforderlich, sollten weitere Bewertungen im Abstand von 24 Stunden bis maximal 96 Stunden vorgenommen werden, sofern die Kontrollmortalität 10 % nicht übersteigt.

Alle anomalen Verhaltensweisen während des Prüfzeitraums müssen protokolliert werden.

1.6.5 **Limit-Test**

In einigen Fällen (z. B. wenn man erwartet, daß die Prüfsubstanz eine geringe Toxizität besitzt) kann ein Limit-Test mit 100 µg Wirkstoff/Biene durchgeführt werden, um nachzuweisen, daß die LD₅₀ höher als dieser Wert ist. Dabei sollte das gleiche Verfahren zum Einsatz kommen, einschließlich drei Wiederholungsprüfgruppen für die Prüfdosis, die betreffenden Kontrollen und die Verwendung des toxischen Standards. Sofern Mortalitäten auftreten, sollte eine vollständige Untersuchung durchgeführt werden. Eventuell beobachtete subletale Wirkungen (siehe Abschnitt 1.6.4) sind zu dokumentieren.

2. DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

2.1 DATEN

Daten sollten in tabellarischer Form zusammengefaßt werden, wobei für jede Behandlungsgruppe sowie für die Kontrollgruppe und die Gruppe mit dem toxischen Standard die Anzahl an eingesetzten Bienen, die Mortalität für jede Beobachtungszeit und die Anzahl an Bienen mit beeinträchtigtem Verhalten auszuweisen sind. Die Mortalitätsdaten sind mit angemessenen statistischen Verfahren zu analysieren (z. B. Probit-Analyse, gleitender Durchschnitt, binomiale Wahrscheinlichkeit) (3)(4). Die Dosisreaktionskurven sind für jede empfohlene Beobachtungszeit (d. h., 24 und 48 Stunden sowie, soweit zutreffend, 72 und 96 Stunden) darzustellen, und die Steigungen der Kurven und die mittleren letalen Dosen (LD_{50}) sind mit einem 95 % Vertrauensbereich zu berechnen. Korrekturen um die Kontrollmortalität könnten mit Hilfe der Abbottschen Korrektur vorgenommen werden (4)(5). Die LD_{50} sollte in μg Prüfsubstanz je Biene angegeben werden.

2.2 PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

2.2.1 **Prüfsubstanz:**

- Physikalische Beschaffenheit und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. Stabilität in Wasser, Dampfdruck);
- Daten zur chemischen Identifikation, einschließlich Strukturformel, Reinheit (d. h., für Pflanzenschutzmittel die Identität und Konzentration des bzw. der Wirkstoffe).

2.2.2 **Geprüfte Bienenart:**

- Wissenschaftlicher Name, Rasse, ungefähres Alter (in Wochen), Sammlungsverfahren, Datum der Sammlung;
- Angaben über die Völker, die für die Sammlung der Prüfbienen eingesetzt wurden, einschließlich Gesundheitszustand, eventuelle Krankheiten von erwachsenen Bienen, eventuelle Vorbehandlungen, usw.

2.2.3 **Prüfbedingungen:**

- Temperatur und relative Feuchte des Versuchsraums;
- Unterbringungsbedingungen einschließlich Art, Größe und Material der Käfige;
- Verfahren für die Verabreichung der Prüfsubstanz, z. B. verwendete Trägerlösung, aufgebrachtetes Prüflösungsvolumen, verwendetes Betäubungsmittel;
- Versuchsanlage, z. B. Anzahl und eingesetzte Prüfdosen, Anzahl an Kontrollen; für jede Prüfdosis und Kontrolle Anzahl an Wiederholungskäfigen und Anzahl an Bienen pro Käfig;
- Datum der Prüfung.

2.2.4 **Ergebnisse:**

- Ergebnisse von eventuellen Vorversuchen zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs;
- Rohdaten: Mortalität bei jeder geprüften Konzentration zu jeder Beobachtungszeit;
- Darstellung der Dosisreaktionskurven am Ende der Prüfung;
- LD_{50} -Werte mit 95 %igem Vertrauensbereich für jede empfohlene Beobachtungszeit, jede Prüfsubstanz und den toxischen Standard;
- zur Bestimmung der LD_{50} herangezogene statistische Verfahren;
- Mortalität in Kontrollen;
- sonstige beobachtete oder gemessene biologische Wirkungen und eventuelle abnorme Reaktionen der Bienen;
- eventuelle Abweichungen von den hier beschriebenen Prüfverfahren und sonstige relevante Informationen.

3.

LITERATURHINWEISE

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products - Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March ,1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) ,1981-1992. Journal of Apicultural Research 22 119-125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.
- (4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, 265-267.

C.18 ADSORPTION/DESORPTION NACH EINER SCHÜTTELMETHODE

1. METHODE

Diese Methode ist ein Verfahren im Format der Prüfrichtlinie OECD TG 106 zur Bestimmung von Bodenadsorption bzw. -desorption nach einer Schüttelmethode (Batch Equilibrium Method) (2000).

1.1 EINLEITUNG

Die Methode stützt sich auf einen Ringtest und einen Workshop zur Bodenauswahl für die Entwicklung eines Adsorptionstests (1)(2)(3)(4) sowie auf einzelstaatliche Leitlinien (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

Anhand von Adsorptions-/Desorptionsuntersuchungen lassen sich wesentliche Informationen über die Mobilität von Chemikalien und deren Verteilung in den Boden-, Wasser- und Luftkompartimenten der Biosphäre gewinnen (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). Diese Informationen können bei der Vorhersage bzw. Abschätzung beispielsweise der Verfügbarkeit einer Chemikalie für den Abbau (22)(23), die Umwandlung und die Aufnahme durch Organismen (24); Auswaschung durch das Bodenprofil (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28); Volatilität aus dem Boden (21)(29)(30); oberflächliches Abfließen in natürliche Gewässer (18)(31)(32) herangezogen werden. Adsorptionsdaten eignen sich für Vergleichs- und Modellierungszwecke (19)(33)(34)(35).

Die Verteilung einer Chemikalie zwischen der Boden- und Wasserphase ist ein komplexer Prozeß und von einer Reihe unterschiedlicher Faktoren abhängig: der chemischen Beschaffenheit der Substanz (12)(36)(37)(38)(39)(40), den Merkmalen des Bodens (4)(12)(13)(14)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49) sowie klimatischen Faktoren wie Niederschlag, Temperatur, Sonnenlicht und Wind. Folglich ist es nicht möglich, die zahlreichen Phänomene und Mechanismen, die am Prozeß der Adsorption einer Chemikalie durch den Boden beteiligt sind, vollständig durch ein vereinfachtes Labormodell wie die vorliegende Methode zu definieren. Doch auch wenn dieser Versuch nicht alle in der Umwelt möglichen Fälle berücksichtigen kann, liefert er doch ausreichende Informationen zur Umweltrelevanz der Adsorption einer Chemikalie.

Siehe auch Allgemeine Einleitung.

1.2 ANWENDUNGSBEREICH

Das Verfahren dient der Abschätzung des Adsorptions-/Desorptionsverhaltens einer Substanz an Böden. Das Ziel besteht darin, einen Sorptionswert zu erhalten, der zur Prognose der Verteilung unter den verschiedensten Umweltbedingungen benutzt werden kann; zu diesem Zweck werden für eine Chemikalie an verschiedenen Böden Gleichgewichtsadsorptionskoeffizienten als Funktion von Bodenmerkmalen (z. B. organischer Kohlenstoffgehalt, Tongehalt sowie Bodentextur und pH-Wert) bestimmt. Um die Interaktionen einer bestimmten Substanz mit natürlich vorkommenden Böden weitestmöglich zu erfassen, sind unterschiedliche Bodentypen zu verwenden.

Bei dieser Methode steht Adsorption für den Prozeß des Anlagerns einer Chemikalie an Bodenoberflächen; es erfolgt keine Unterscheidung zwischen unterschiedlichen Adsorptionsprozessen (physikalische und chemische Adsorption) und solchen Prozessen wie oberflächenkatalysierter Abbau, Volumenadsorption oder chemische Reaktion. Nicht berücksichtigt ist die Adsorption an von den Böden erzeugte kolloide Partikel (Durchmesser < 0,2 µm).

Folgenden Bodenparametern wird in bezug auf die Adsorption der größte Stellenwert beigemessen: dem organischen Kohlenstoffgehalt (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48), dem Tongehalt und der Bodentextur (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48) sowie für ionisierbare Verbindungen dem pH-Wert (3)(4)(42); Weitere Bodenparameter, die einen Einfluß auf die Adsorption-Desorption einer Substanz haben, sind die effektiven Kationenaustauschkapazität (KAK_{eff}), der Gehalt an amorphen Eisen- und Aluminiumoxiden, insbesondere für vulkanische und tropische Böden (4), wie auch die spezifische Oberfläche (49).

Der Test ist dafür ausgelegt, die Adsorption einer Chemikalie an unterschiedliche Bodentypen mit einer Reihe unterschiedlicher organischer Kohlenstoffgehalte, Tongehalte und Bodentexturen sowie pH-Werte zu bewerten. Er besteht aus drei Stufen:

Stufe 1: Voruntersuchung zur Bestimmung:

- des Boden-Lösungs-Verhältnisses;
- der Gleichgewichtszeit für die Adsorption und der bei Gleichgewicht adsorbierten Menge an Testsubstanz;
- der Adsorption der Testsubstanz an der Oberfläche der Testgefäße und der Stabilität der Testsubstanz während des Testzeitraums.

Stufe 2: Screening-Test: Bei fünf verschiedenen Bodentypen wird die Adsorption anhand der Adsorptionskinetik bei einer einzigen Konzentration und mittels Bestimmung des Verteilungskoeffizienten K_d und K_{oc} untersucht.

Stufe 3: Bestimmung von Freundlich-Adsorptionsisothermen zur Ermittlung des Einflusses der Konzentration auf die Adsorption an Böden.

Untersuchung der Desorption mit Hilfe von Desorptionskinetik/Freundlich-Desorptionsisothermen (Anhang 1).

1.3 BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND EINHEITEN

Symbol	Begriffsbestimmung	Einheit
A_{t_i}	Adsorptionsanteil zur Zeit t_i	%
A_{eq}	Adsorptionsanteil bei Adsorptionsgleichgewicht	%
$m_s^{ads}(t_i)$	Masse der zur Zeit t_i am Boden adsorbierten Testsubstanz	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	Masse der während des Zeitintervalls Δt_i am Boden adsorbierten Testsubstanz	μg
$m_s^{ads}(eq)$	Masse der bei Adsorptionsgleichgewicht am Boden adsorbierten Testsubstanz	μg
m_0	Masse der Testsubstanz im Reagenzglas am Beginn des Adsorptionstests	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	Masse der Testsubstanz, gemessen in einer Aliquote (v_a^A) zum Zeitpunkt t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	Masse der Substanz in der Lösung bei Adsorptionsgleichgewicht	μg
m_{Boden}	Menge der Bodenphase, ausgedrückt als Boden-Trockenmasse	g
C_{st}	Massenkonzentration der Vorratslösung der Substanz	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	Ausgangsmassenkonzentration der Testlösung in Kontakt mit dem Boden	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	Massenkonzentration der Substanz in der wäßrigen Phase zur Zeit t_i , wenn die Analyse durchgeführt ist	$\mu\text{g cm}^{-3}$

$C_s^{ads} (eq)$	Gehalt der bei Adsorptionsgleichgewicht am Boden adsorbierten Substanz	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads} (eq)$	Massenkonzentration der Substanz in der wäßrigen Phase bei Adsorptionsgleichgewicht	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_0	Anfangsvolumen der wäßrigen Phase in Kontakt mit dem Boden während des Adsorptionstests	cm^3
V_a^A	Volumen der Aliquote, in der die Testsubstanz gemessen wird	cm^3
K_d	Verteilungskoeffizient für die Adsorption	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{oc}	auf organischen Kohlenstoff normierter Adsorptionskoeffizient	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{om}	auf organisches Material normierter Verteilungskoeffizient	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlich-Adsorptionskoeffizient	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	Freundlich-Exponent	
D_{t_i}	Desorptionsanteil zum Zeitpunkt t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	Desorptionsanteil im Zeitintervall Δt_i	%
K_{des}	Scheidesorptionskoeffizient	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{des}	Freundlich-Desorptionskoeffizient	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des} (t_i)$	Masse der aus Boden während der Zeit t_i desorbierten Testsubstanz	μg
$m_{aq}^{des} (\Delta t_i)$	Masse der aus Boden während des Zeitintervalls Δt_i desorbierten Testsubstanz	μg
$m_m^{des} (eq)$	analytisch bestimmte Masse Substanz in der wäßrigen Phase bei Desorptionsgleichgewicht	μg
$m_{aq}^{des} (eq)$	Gesamtmasse der bei Desorptionsgleichgewicht desorbierten Testsubstanz	μg
$m_s^{des} (\Delta t_i)$	Masse der nach dem Zeitintervall Δt_i am Boden adsorbiert bleibenden Substanz	μg
m_{aq}^A	Masse der nach Adsorptionsgleichgewichtseinstellung infolge unvollständigen Volumenaustauschs verbliebenen Substanz	μg
$C_s^{des} (eq)$	Gehalt der bei Desorptionsgleichgewicht am Boden adsorbiert bleibenden Testsubstanz	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{des} (eq)$	Massenkonzentration der Testsubstanz in der wäßrigen Phase bei Desorptionsgleichgewicht	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_T	Gesamtvolumen der wäßrigen Phase in Kontakt mit dem Boden während des nach der Aliquotenbeprobungsmethode durchgeführten Desorptionskinetikversuchs	cm^3
V_R	Volumen des nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts aus dem Glas abgenommenen und durch das gleiche Volumen einer 0,01 M CaCl_2 -Lösung ersetzten Überstandes	cm^3
V_a^D	Volumen der während des nach der Aliquotenbeprobungsmethode durchgeführten Desorptionskinetikversuchs ab der Zeit (i) als Probe zu Analysezwecken abgenommenen Aliquote	cm^3
V_T^i	Volumen der im Desorptionskinetikversuch (Gesamtbeobachtungsmethode) aus dem Glas (i) zur Messung der Testsubstanz abgenommenen Lösung	cm^3

V_r^F	Volumen der bei Desorptionsgleichgewicht aus dem Glas zur Messung der Testsubstanz abgenommenen Lösung	cm^3
MB	Massenbilanz	%
m_E	Gesamtmasse der aus Boden und von Wänden des Testgefäßes in zwei Schritten extrahierten Testsubstanz	μg
V_{rec}	Volumen des nach Adsorptionsgleichgewicht erhaltenen Überstandes	cm^3
K_{ow}	Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient	
pKa	Dissoziationskonstante	
S_w	Wasserlöslichkeit	g l^{-1}

1.4 PRINZIP DER TESTMETHODE

Bodenproben mit bekanntem Trockengewicht, die vorab in 0,01 M CaCl_2 in ein Gleichgewicht gebracht worden sind, werden bei bekannten Konzentrationen von 0,01 M CaCl_2 mit bekannten Volumina von Lösungen der Testsubstanz, die nichtmarkiert oder radioaktiv markiert ist, versetzt. Das Gemisch wird für eine angemessene Zeit geschüttelt. Anschließend werden die Bodensuspensionen mittels Zentrifugieren und, falls gewünscht, Filtrieren getrennt, und die wäßrige Phase wird analysiert. Die Menge der an der Bodenprobe adsorbierten Testsubstanz wird berechnet als die Differenz zwischen der Anfangsmenge der Testsubstanz in Lösung und der bei Beendigung des Versuchs verbleibenden Menge (indirekte Methode).

Wahlweise kann die Menge der adsorbierten Testsubstanz auch unmittelbar durch eine Bodenanalyse bestimmt werden (direkte Methode). Diese Vorgehensweise, die eine schrittweise Bodenextraktion mit einem geeigneten Lösungsmittel umfaßt, empfiehlt sich in Fällen, bei denen eine präzise Bestimmung der Differenz in der Lösungskonzentration der Substanz nicht möglich ist. Als Beispiele seien folgende Sachverhalte genannt: Adsorption der Testsubstanz an der Oberfläche der Testgefäße, Instabilität der Testsubstanz im Zeitrahmen des Versuchs, nur geringe Konzentrationsveränderung in der Lösung infolge einer schwachen Adsorption sowie starke Adsorption mit dem Ergebnis einer niedrigen Konzentration, die nicht genau bestimmt werden kann. Kommt eine radioaktiv markierte Substanz zum Einsatz, könnte die Bodenextraktion durch Analyse der Bodenphase mittels Verbrennung und Flüssigszintillationszählung umgangen werden. Die Flüssigszintillationszählung ist jedoch eine unspezifische Technik, die keine Unterscheidung zwischen Ausgangs- und Umwandlungsprodukten erlaubt. Daher sollte sie nur dann Anwendung finden, wenn die Testchemikalie für die Dauer der Untersuchung stabil ist.

1.5 ANGABEN ZUR TESTSUBSTANZ

Die chemischen Reagenzien sollten Analysenreinheit aufweisen. Empfohlen wird die Verwendung nichtmarkierter Testsubstanzen mit bekannter Zusammensetzung und von vorzugsweise mindestens 95% iger Reinheit bzw. radioaktiv markierter Testsubstanzen mit bekannter Zusammensetzung und von radioaktiver Reinheit. Bei Markierungssubstanzen mit kurzer Halbwertszeit sollten Zerfallskorrekturen angewendet werden.

Vor der Durchführung einer Adsorptions-/Desorptionsprüfung sollten in bezug auf die Testsubstanz folgende Angaben vorliegen:

- a) Wasserlöslichkeit (A.6.);
- b) Dampfdruck (A.4.) und/oder Henry-Konstante;
- c) Abiotischer Abbau: Hydrolyse als Funktion des pH (C.7.);
- d) Verteilungskoeffizient (A.8.);
- e) Leichte biologische Abbaubarkeit (C.4.) bzw. aerobe und anaerobe Umwandlung in Boden;
- f) pKa von ionisierbaren Substanzen;
- g) Direktphotolyse in Wasser (d. h. UV-Vis-Absorptionsspektrum in Wasser, Quantenausbeute) und photochemischer Abbau an Boden.

1.6 ANWENDBARKEIT DES TESTS

Der Test ist anwendbar auf chemische Substanzen, für die eine analytische Methode mit hinreichender Genauigkeit zur Verfügung steht. Ein wichtiger Kennwert, der die Verlässlichkeit der Ergebnisse beeinflussen kann, und zwar besonders bei der indirekten Methode, ist die Stabilität der Testsubstanz innerhalb des Zeitrahmens des Tests. Daher ist die Stabilität in jedem Falle in einer Voruntersuchung zu überprüfen. Wird im Zeitrahmen des Tests eine Umwandlung beobachtet, so empfiehlt es sich, daß die Hauptuntersuchung durch Analysen sowohl der Bodenphase als auch der wäßrigen Phase durchgeführt wird.

Schwierigkeiten könnten sich bei der Ausführung dieses Tests bei Testsubstanzen mit geringer Wasserlöslichkeit ergeben ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), desgleichen bei hoch dosierten Substanzen, da die Konzentration in der wäßrigen Phase analytisch nicht mit ausreichender Genauigkeit meßbar ist. In diesen Fällen sind zusätzliche Schritte notwendig. In den entsprechenden Abschnitten der vorliegenden Dokumentation sind Hinweise dafür zu finden, wie sich diese Probleme lösen lassen.

Bei der Prüfung flüchtiger Substanzen ist dafür Sorge zu tragen, daß Verluste während der Behandlung vermieden werden.

1.7 BESCHREIBUNG DER METHODE

1.7.1 Geräte und chemische Reagenzien

Standardlaborausstattung, insbesondere folgendes:

- a) Reagenzgläser oder Gefäße zur Versuchsdurchführung. Vor allem müssen diese Reagenzgläser oder Gefäße
— genau in die Zentrifuge passen, um Handhabungs- und Umsetzfehler weitestgehend auszuschließen;
— aus inertem Material bestehen, damit es möglichst nicht zur Adsorption der Testsubstanz an der Oberfläche kommt.
- b) Schüttelwerk: Überkopfschüttler oder gleichwertige Vorrichtung; der Schüttler sollte den Boden während des Schüttelns in Suspension halten.
- c) Zentrifuge: vorzugsweise Hochleistungsgerät, z.B. mit Zentrifugalkräften $> 3000g$, temperaturgeregelt, fähig zur Abtrennung von Partikeln mit einem Durchmesser über $0,2 \mu\text{m}$ aus wäßriger Lösung. Die Behälter sollten während des Rührens und Zentrifugierens abgedeckt sein, um Volatilitäts- und Wasserverluste zu vermeiden; um einer Adsorption daran möglichst vorzubeugen, sollte auf inaktivierte Abdeckungen, beispielsweise teflonbeschichtete Schraubkappen, zurückgegriffen werden.
- d) Fakultativ: Filtriervorrichtung; sterile Einweg-Filter mit einer Porosität von $0,2 \mu\text{m}$. Mit besonderer Umsicht ist bei der Auswahl des Filtermaterials vorzugehen, um jegliche Verluste der Testsubstanz daran zu vermeiden; bei schwerlöslichen Testsubstanzen wird empfohlen, kein organisches Filtermaterial zu verwenden.
- e) Analytische Instrumente, mit denen die Konzentration der Testchemikalie gemessen werden kann.
- f) Laborofen, mit dem sich eine Temperatur von $103 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $110 \text{ }^\circ\text{C}$ halten läßt.

1.7.2 Charakterisierung und Auswahl von Böden

Die Charakterisierung der Böden sollte anhand von drei Parametern erfolgen, die als weitgehend verantwortlich für das Adsorptionsvermögen betrachtet werden: der organische Kohlenstoffgehalt, der Tongehalt und die Bodentextur sowie der pH-Wert. Wie bereits erwähnt (siehe unter Anwendungsbereich) können sich auch andere physikalisch-chemische Eigenschaften des Bodens auf die Adsorption/Desorption einer bestimmten Substanz auswirken und sollten daher in solchen Fällen berücksichtigt werden.

Die für eine Bodencharakterisierung verwendeten Methoden sind von großer Bedeutung und können einen erheblichen Einfluß auf die Ergebnisse ausüben. Aus diesem Grunde empfiehlt es sich, den Boden-pH-Wert in einer Lösung von 0,01 M CaCl₂ (der im Adsorptions-/Desorptionstest verwendeten Lösung) gemäß der entsprechenden ISO-Methode (ISO-10390-1) zu messen. Weiterhin wird empfohlen, die übrigen relevanten Bodenmerkmale nach Standardverfahren zu bestimmen (z.B. ISO Handbook of soil analysis). Diese Vorgehensweise gestattet es, die Analyse von Sorptionsdaten anhand international einheitlicher Bodenparameter vorzunehmen. Einige Anleitungen zu vorhandenen Standardverfahren der Bodenanalyse und -charakterisierung sind den bibliographischen Angaben zu entnehmen (50-52). Zur Kalibrierung von Bodentestmethoden wird die Verwendung von Referenzböden empfohlen.

Eine Anleitung zur Auswahl von Böden für Adsorptions-/Desorptionsversuche ist in Tabelle 1 zu finden. Mit den sieben ausgewählten Böden werden Bodentypen erfaßt, die in gemäßigten geographischen Zonen anzutreffen sind. Bei ionisierbaren Testsubstanzen sollten die gewählten Böden einen großen pH-Bereich abdecken, damit die Adsorption der Substanz in deren ionisierter und nichtionisierter Form bewertet werden kann. Im Abschnitt "Durchführung des Tests" 1.9 ist angegeben, wieviele unterschiedliche Böden in den einzelnen Phasen des Tests zu verwenden sind.

Werden andere Bodentypen bevorzugt, so sollten diese nach denselben Parametern charakterisiert werden und eine ähnliche Spannbreite an Merkmalen wie die in Tabelle 1 beschriebenen aufweisen, auch wenn sie den Kriterien nicht exakt entsprechen.

Tabelle 1: Anleitung zur Auswahl von Bodenproben zur Adsorption/Desorption

Bodentyp	pH-Bereich (in 0,01 M CaCl ₂)	Organischer Kohlenstoffgehalt (%)	Tongehalt (%)	Bodentextur*
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 - 80	Ton
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	toniger Lehm
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	schluffiger Lehm
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	Lehm
5	< 4,0 - 6,0 [§]	< 0,5 - 1,5 ^{§‡}	< 10 - 15 [§]	lehmiger Sand
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 ^{§‡}	40 - 65	toniger Lehm / Ton
7	< 4,5	> 10	< 10	Sand / lehmiger Sand

* Gemäß FAO und dem US-amerikanischen System (85).

§ Die Werte der jeweiligen Variablen sollten vorzugsweise in dem angegebenen Bereich liegen. Sollten jedoch Schwierigkeiten bei der Suche nach geeignetem Bodenmaterial auftreten, sind auch Werte unterhalb des angezeigten Minimums zulässig.

‡ Böden mit einem organischen Kohlenstoffgehalt unter 0,3 % können die Korrelation zwischen organischem Gehalt und Adsorption stören. Daher ist es ratsam, Böden mit einem organischen Kohlenstoffgehalt von mindestens 0,3 % einzusetzen.

1.7.3 Sammlung und Lagerung von Bodenproben

1.7.3.1 Sammlung

Es werden keine speziellen Probenahmetechniken oder -hilfsmittel empfohlen. Das Probenahmeverfahren richtet sich nach dem Zweck der Untersuchung (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Folgendes ist zu beachten:

- a) Es sind ausführliche Informationen über die Geschichte des Feldstandorts erforderlich, so zum Ort, zum Bewuchs, zu Behandlungen mit Pestiziden und/oder Düngemitteln, zu biologischen Anlagerungen oder zu unfallbedingten Verschmutzungen. Im Hinblick auf die Beschreibung des Probenahmestandorts sind die Empfehlungen der ISO-Norm zur Entnahme von Bodenproben (ISO 10381-6) einzuhalten.

- b) Der Probenahmestandort ist mittels UTM (Universale Transversale Mercator-Projektion/European Horizontal Datum) oder geographischen Koordinaten zu definieren. Daraus könnte für die Zukunft die Möglichkeit erwachsen, einen bestimmten Boden erneut zu sammeln oder Boden nach verschiedenen Klassifizierungssystemen zu definieren, die in unterschiedlichen Ländern benutzt werden. Außerdem sollte A-Horizont nur bis zu einer Maximaltiefe von 20 cm gesammelt werden. Vor allem der Boden Nr. 7 sollte in die Probenahme einbezogen werden, wenn ein Teil des Bodens O_h-Horizont ist.

Die Bodenproben sollten mit Hilfe von Behältern und unter Temperaturbedingungen transportiert werden, die gewährleisten, daß die ursprünglichen Bodeneigenschaften nicht wesentlich verändert werden.

1.7.3.2 Lagerung

Bevorzugt wird die Verwendung feldfrischer Böden. Nur wenn dies nicht möglich ist, sollte Boden bei Umgebungstemperatur gelagert und lufttrocken aufbewahrt werden. Eine Begrenzung der Lagerzeit wird nicht empfohlen, doch sollten Böden, die länger als drei Jahre gelagert wurden, vor ihrer Verwendung erneut auf ihren organischen Kohlenstoffgehalt, pH-Wert und KAK analysiert werden.

1.7.3.3 Handhabung und Vorbereitung von Bodenproben auf den Test

Die Böden werden bei Umgebungstemperatur (vorzugsweise zwischen 20 und 25 °C) luftgetrocknet. Die Auflockerung sollte mit minimalem Kraftaufwand erfolgen, so daß die ursprüngliche Textur des Bodens möglichst wenig verändert wird. Die Böden werden auf eine Partikelgröße ≤ 2 mm gesiebt. Im Hinblick auf den Siebvorgang sollten die Empfehlungen der ISO-Norm zur Probenahme eingehalten werden (ISO 10381-6). Empfohlen wird eine sorgfältige Homogenisierung, da dies die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhöht. Der Feuchtegehalt jedes Bodens wird an drei Aliquoten mit Erwärmung auf 105 °C bestimmt, bis keine signifikante Gewichtsveränderung mehr zu verzeichnen ist (ca. 12 h). Bei allen Berechnungen bezieht sich die Bodenmasse auf die Ofentrockenmasse, d.h. das um den Feuchtegehalt korrigierte Bodengewicht.

1.7.4 Vorbereitung der Testsubstanz zur Anwendung auf Boden

Die Testsubstanz wird in einer Lösung von 0,01 M CaCl₂ in destilliertem oder entionisiertem Wasser gelöst. Die CaCl₂-Lösung dient als wäßrige Lösungsmittelphase zur Verbesserung der Zentrifugation und Minimierung des Kationenaustauschs. Die Konzentration der Vorratslösung sollte die Nachweisgrenze der verwendeten analytischen Methode vorzugsweise um den Faktor 3 übersteigen. Diese Schwelle gewährleistet genaue Messungen in bezug auf die diesem Verfahren zugrundeliegende Methodik. Darüber hinaus sollte die Konzentration der Vorratslösung die Wasserlöslichkeit der Testsubstanz unterschreiten.

Die Vorratslösung sollte am besten unmittelbar vor Anwendung auf die Bodenproben zubereitet sowie verschlossen und vor Licht geschützt bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Lagerzeit richtet sich nach der Stabilität der Testsubstanz und ihrer Konzentration in der Lösung.

Lediglich bei schwerlöslichen Substanzen ($S_w < 10^{-4}$ g l⁻¹) könnte unter Umständen ein geeignetes Solubilisierungsmittel notwendig sein, wenn sich die Testsubstanz nur schwer auflösen läßt. Ein solches Solubilisierungsmittel sollte (a) mit Wasser mischbar sein, beispielsweise Methanol oder Acetonitril; (b) in einer Konzentration von höchstens 1 % des Gesamtvolumens der Vorratslösung und darunter in der Lösung der Testsubstanz, die in Kontakt mit dem Boden kommt (vorzugsweise unter 0,1 %) enthalten sein; und (c) kein oberflächenaktiver Stoff sein oder solvolytische Reaktionen mit der Testchemikalie durchlaufen. Die Verwendung eines Solubilisierungsmittels sollte im Datenbericht festgehalten und begründet werden.

Eine andere Alternative bei schwerlöslichen Substanzen besteht darin, die Testsubstanz durch Untermischen in ein Testsystem zu geben: Die Testsubstanz wird in einem organischen Lösungsmittel gelöst, von dem eine Aliquote zu dem System von Boden und 0,01 M CaCl₂-Lösung in destilliertem oder entionisiertem Wasser gegeben wird. Der Gehalt an organischem Lösungsmittel in der wäßrigen Phase sollte so niedrig wie möglich gehalten werden und im Regelfall 0,1 % nicht übersteigen. Beim Untermischen aus einer organischen Lösung kann das Problem der Volumen-Nichtreproduzierbarkeit auftreten. Dadurch kann sich ein zusätzlicher Fehler ergeben, da die Konzentrationen von Testsubstanz und Hilfslösungsmittel nicht in allen Tests gleich hoch ausfallen dürften.

1.8 VORAUSSETZUNGEN FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DES ADSORPTIONS-/DESORPTIONSTESTS

1.8.1 Analysenmethode

Zu den wichtigsten Parametern, die die Genauigkeit von Sorptionsmessungen beeinflussen können, zählen die Genauigkeit der Analysenmethode bei der Untersuchung der Lösungs- und adsorbierten Phasen, die Stabilität und Reinheit der Testsubstanz, das Einstellen des Sorptionsgleichgewichts, das Ausmaß der Lösungskonzentrationsveränderung, das Boden-Lösungs-Verhältnis sowie Veränderungen in der Bodenstruktur während des Gleichgewichtseinstellungsprozesses (35)(59-62). Einige Beispiele betreffend die Genauigkeitsproblematik sind in Anhang 2 dargestellt.

Die Zuverlässigkeit der verwendeten Analysenmethode muß bei dem Konzentrationsbereich überprüft werden, der vermutlich während des Tests auftreten wird. Es sollte im Ermessen des Experimentators liegen, eine geeignete Methode mit angemessener Genauigkeit, Präzision, Reproduzierbarkeit, Gewinnungsraten und hinreichenden Nachweisgrenzen zu entwickeln. Eine Anleitung für die Durchführung eines solchen Tests vermittelt der nachstehende Versuch.

Ein angemessenes Volumen 0,01 M CaCl₂, z.B. 100 cm³, wird mit einer Masse Boden, z.B. 20 g, hoher Adsorptionsfähigkeit, d. h. mit hohem organischen Kohlenstoff- und Tongehalt 4 h geschüttelt. Diese Massen und Volumen können je nach Analysenanforderung variieren, doch ist ein Boden-Lösungs-Verhältnis von 1:5 ein geeigneter Ausgangswert. Das Gemisch wird zentrifugiert, und die wäßrige Phase kann filtriert werden. Diese wird dann mit einem bestimmten Volumen der Testsubstanz-Vorratslösung versetzt, so daß eine Nennkonzentration innerhalb des für den Testverlauf wahrscheinlichen Konzentrationsbereichs erreicht wird. Dieses Volumen sollte 10 % des Endvolumens der wäßrigen Phase nicht überschreiten, um den Charakter der Lösung vor Einstellung des Gleichgewichts so wenig wie möglich zu verändern. Die Lösung wird analysiert.

Es ist ein Leerdurchlauf bestehend aus dem System Boden + CaCl₂-Lösung (ohne Testsubstanz) anzusetzen, um unerwünschte Pseudoergebnisse in der Analysenmethode und durch den Boden hervorgerufene Matrixeffekte zu entdecken.

Zu den für Sorptionsmessungen geeigneten analytischen Methoden gehören die Gas-Flüssigkeits-Chromatographie (GLC), Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), Spektrometrie (z.B. GC/Massenspektrometrie, HPLC/Massenspektrometrie) und Flüssigszintillationszählung (für radioaktiv markierte Substanzen). Unabhängig von der verwendeten Analysenmethode gelten Gewinnungsraten zwischen 90 und 110 % des Nennwertes als angemessen. Um eine Detektion und Evaluierung nach erfolgter Verteilung zu ermöglichen, sollten die Nachweisgrenzen der Analysenmethode die Nennkonzentration mindestens um den Faktor 2 unterschreiten.

Die Merkmale und Nachweisgrenzen der zur Ausführung von Adsorptionsuntersuchungen verfügbaren Analysenmethode spielen eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Testbedingungen und der Durchführung des Tests insgesamt. Die vorliegende Methode stützt sich auf eine allgemeinere experimentelle Vorgehensweise und gibt Empfehlungen und Anleitung für alternative Lösungswege, die gewählt werden können, wenn sich Einschränkungen aufgrund der analytischen Methode und der Laborausstattung ergeben.

1.8.2 Auswahl optimaler Boden-Lösungs-Verhältnisse

Die Auswahl geeigneter Boden-Lösungs-Verhältnisse für Sorptionsuntersuchungen richtet sich nach dem Verteilungskoeffizienten K_d und dem gewünschten relativen Adsorptionsgrad. Die Veränderung der Konzentration der Substanz in der Lösung bestimmt die statistische Genauigkeit der Messung auf der Grundlage der Form der Adsorptionsgleichung und der Grenze der analytischen Methodik bei der Bestimmung der Konzentration der Chemikalie in Lösung. Daher ist es in der Praxis generell von Nutzen, einige wenige feste Verhältnisse anzusetzen, bei denen der adsorbierte Anteil oberhalb 20 % und vorzugsweise >50 % liegt (62). Gleichzeitig ist darauf zu achten, daß die Konzentration der Testsubstanz in der wäßrigen Phase so hoch ist, daß sie eine genaue Messung erlaubt. Dies ist insbesondere im Falle hoher Adsorptionsanteile von Bedeutung.

Ein passender Ansatz für die Wahl geeigneter Boden-Wasser-Verhältnisse basiert auf einer Schätzung des K_d -Wertes entweder mittels Voruntersuchungen oder durch etablierte Abschätzungsverfahren (Anhang 3). Die Wahl eines geeigneten Verhältnisses kann auf der Basis einer graphischen Darstellung des Boden-Lösungs-Verhältnisses in Abhängigkeit von K_d für festgelegte Adsorptionsanteile erfolgen (Abb.1). Bei dieser Darstellung wird angenommen, daß die Adsorptionsgleichung linear ist¹. Die anwendbare Beziehung wird durch Umstellung der Gleichung (4) des K_d in Form der Gleichung (1) erhalten:

$$\frac{V_0}{m_{\text{Boden}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

oder in ihrer logarithmischen Form unter der Annahme, daß $R = m_{\text{Boden}}/V_0$ und $A_{\text{eq}}\%/100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$:

$$\log R = - \log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}}\%/100)}{(1-A_{\text{eq}}\%/100)} \right] \quad (2)$$

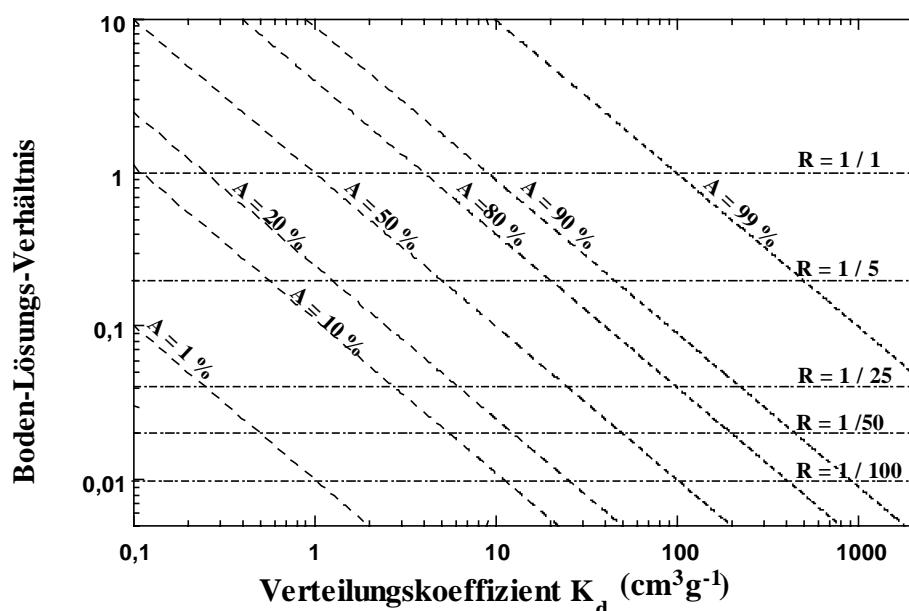


Abb. 1 Beziehung zwischen Boden-Lösungs-Verhältnissen und K_d bei verschiedenen Anteilen adsorbierter Testsubstanz

¹ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

Abb. 1 zeigt für unterschiedliche Adsorptionsebenen erforderliche Boden-Lösungs-Verhältnisse als Funktion von K_d . Beispielsweise würde es bei einem Verhältnis Boden:Lösung von 1:5 und einem K_d von 20 zu einer annähernd 80% igen Adsorption kommen. Um bei identischem K_d eine 50% ige Adsorption zu erzielen, ist ein Verhältnis von 1:25 anzusetzen. Mit diesem flexiblen Ansatz kann der Untersucher das für die Versuchsanforderungen jeweils geeignete Boden-Lösungs-Verhältnis wählen.

Größere Schwierigkeiten bestehen in Bereichen, in denen die Chemikalie stark oder sehr geringfügig adsorbiert wird. Bei geringer Adsorption empfiehlt sich ein Boden-Lösungs-Verhältnis von 1:1, wenngleich bei einigen ausgeprägt organischen Bodentypen unter Umständen niedrigere Verhältnisse erforderlich sind, um einen Schlamm zu erhalten. Mit Sorgfalt ist bei der analytischen Methodik zur Messung geringfügiger Veränderungen der Lösungskonzentration vorzugehen, da andernfalls die Adsorptionsmessung ungenau ausfällt. Demgegenüber ist bei sehr hohen Verteilungskoeffizienten K_d ein Boden-Lösungs-Verhältnis von bis zu 1:100 möglich, damit eine signifikante Menge der Chemikalie in Lösung bleibt. In jedem Fall ist auf ein gründliches Durchmischen zu achten. Ferner ist für die Gleichgewichtseinstellung im System eine ausreichende Zeitspanne einzuplanen. Ein alternativer Ansatz besteht darin, den K_d -Wert anhand von Abschätzungstechniken vorherzubestimmen, die zum Beispiel auf P_{ow} -Werten fußen (Anhang 3). Diese Vorgehensweise könnte sich insbesondere bei geringfügig adsorbierten/polaren Chemikalien mit $P_{ow} < 20$ und für lipophile/stark sorbierende Chemikalien mit $P_{ow} > 10^4$ als sinnvoll erweisen.

1.9 DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1.9.1 Testbedingungen

Sämtliche Versuche werden bei Umgebungstemperatur und, falls möglich, bei einer konstanten Temperatur zwischen 20 und 25 °C durchgeführt.

Beim Zentrifugieren sollten Partikel aus der Lösung abgetrennt werden, die größer als 0,2 μm sind. Dieser Wert steht für die kleinsten Partikel, die als Feststoffpartikel eingestuft werden, und stellt den Grenzwert zwischen Feststoff- und Kolloidpartikeln dar. In Anhang 4 ist eine Anleitung zur Bestimmung der Zentrifugierbedingungen zu finden.

Ist mit den Zentrifugiervorrichtungen die Entfernung von Partikeln $> 0,2 \mu\text{m}$ nicht zu gewährleisten, könnte auf eine Kombination von Zentrifugation und Filtration mit 0,2 μm -Filtern zurückgegriffen werden. Diese Filter sollten aus einem entsprechenden inerten Material bestehen, um jegliche Verluste der Testsubstanz daran zu vermeiden. In jedem Fall sollte nachgewiesen sein, daß es während des Abfiltrierens nicht zu Verlusten der Testsubstanz kommt.

1.9.2 Stufe 1 - Voruntersuchung

Der Zweck der Durchführung einer Voruntersuchung ist bereits im Abschnitt Anwendungsbereich erläutert worden. Eine Anleitung zur Ansetzung eines solchen Tests wird anhand des nachfolgend vorgeschlagenen Versuchs gegeben.

1.9.2.1 Auswahl optimaler Boden-Lösungs-Verhältnisse

Zum Einsatz kommen zwei Bodentypen und drei Boden-Lösungs-Verhältnisse (sechs Versuche). Ein Bodentyp besitzt einen hohen organischen Kohlenstoffgehalt und einen niedrigen Tongehalt, der andere einen niedrigen organischen Kohlenstoffgehalt und einen hohen Tongehalt. Folgende Verhältnisse werden vorgeschlagen:

-50 g Boden und 50 cm^3 wäßrige Lösung der Testsubstanz (Verhältnis 1/1);

-10 g Boden und 50 cm^3 wäßrige Lösung der Testsubstanz (Verhältnis 1/5);

-2 g Boden und 50 cm^3 wäßrige Lösung der Testsubstanz (Verhältnis 1/25).

Die Mindestmenge Boden zur Ausführung des Versuchs richtet sich nach den Laboreinrichtungen und der Leistungsfähigkeit der verwendeten analytischen Methoden. Es empfiehlt sich jedoch, mindestens 1 g, vorzugsweise 2 g, einzusetzen, um verlässliche Testergebnisse zu erzielen.

Eine Kontrollprobe mit lediglich der Testsubstanz in 0,01 M CaCl_2 -Lösung (kein Boden) wird exakt den gleichen Schritten wie die Testsysteme unterzogen, um die Stabilität der Testsubstanz in CaCl_2 -Lösung und ihre mögliche Adsorption an den Oberflächen der Testgefäße zu prüfen.

Ein Leerdurchlauf je Boden mit der gleichen Menge Boden und einem Gesamtvolumen von 50 cm^3 $0,01 \text{ M CaCl}_2$ -Lösung (ohne Testsubstanz) wird dem gleichen Testverfahren unterzogen. Dies dient während der Analyse als Leerkontrolle zum Nachweis störender Substanzen oder kontaminierter Böden.

Sämtliche Versuche, eingeschlossen Kontroll- und Leerversuche, sollten mindestens doppelt durchgeführt werden. Die Gesamtzahl der Proben, die für den Test vorbereitet werden sollten, kann mit Bezug auf die zugrundeliegende Methodik berechnet werden.

Für Vor- und Hauptuntersuchung werden in der Regel die gleichen Methoden angewendet. Ausnahmen werden, falls relevant, angegeben.

Die lufttrockenen Proben werden durch Schütteln mit einem Mindestvolumen von 45 cm^3 $0,01 \text{ M CaCl}_2$ über Nacht (12 h) vor dem Versuchstag ins Gleichgewicht gebracht. Anschließend wird mit einem bestimmten Volumen der Vorratslösung der Testsubstanz auf das Endvolumen von 50 cm^3 aufgefüllt. Das zugesetzte Volumen der Vorratslösung sollte (a) 10 % des Endvolumens von 50 cm^3 der wäßrigen Phase nicht überschreiten, um den Charakter der Lösung vor Einstellung des Gleichgewichts möglichst wenig zu verändern; und (b) vorzugsweise in einer Anfangskonzentration der in Kontakt mit dem Boden befindlichen Testsubstanz (C_0) resultieren, die die Nachweisgrenze der analytischen Methode mindestens um den Faktor 2 überschreitet - diese Schwelle gewährleistet auch bei einer starken Adsorption genaue Messungen ($> 90 \%$) sowie später die Bestimmung der Adsorptionsisothermen. Die Anfangskonzentration der Substanz (C_0) sollte möglichst nicht höher sein als die Hälfte ihrer Löslichkeitsgrenze.

Nachstehend wird ein Beispiel für die Art und Weise der Berechnung der Konzentration der Vorratslösung (C_{st}) beschrieben. Angenommen wird eine Nachweisgrenze von $0,01 \mu\text{g cm}^{-3}$ und 90% ige Adsorption. Daher sollte die Anfangskonzentration der Testsubstanz in Kontakt mit dem Boden vorzugsweise $1 \mu\text{g cm}^{-3}$ betragen (zwei Größenordnungen über der Nachweisgrenze). Unter der Voraussetzung, daß das empfohlene Höchstvolumen der Vorratslösung zugesetzt wird, d. h. 5 bis 45 cm^3 $0,01 \text{ M CaCl}_2$ -Gleichgewichtseinstellungslösung (= 10 % der Vorratslösung zum Gesamtvolumen der wäßrigen Phase von 50 cm^3), sollte die Konzentration der Vorratslösung $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ betragen, d. h. die Nachweisgrenze der analytischen Methode um den Faktor drei überschreiten.

Der pH-Wert der wäßrigen Phase sollte vor und nach Kontakt mit dem Boden gemessen werden, da er im gesamten Adsorptionsprozeß eine wichtige Rolle spielt, insbesondere für ionisierbare Substanzen.

Das Gemisch wird bis zum Erreichen des Adsorptionsgleichgewichts geschüttelt. Die Gleichgewichtszeit in Böden ist, da abhängig von der Chemikalie und vom Boden, stark schwankend. In der Regel ist ein Zeitraum von 24 h ausreichend (77). In der Voruntersuchung mit sequentieller Beprobung ist ein Vermischen über einen Zeitraum von 48 h empfehlenswert (zum Beispiel 4, 8, 24, 48 h). Die Analysenzeiten sollten jedoch unter Berücksichtigung des Arbeitsplans im Labor flexibel angesetzt werden.

Für die Analyse der Testsubstanz in der wäßrigen Lösung bestehen zwei Möglichkeiten: (a) die Gesamtbeprobungsmethode und (b) die Aliquotenbeprobungsmethode. Es sei besonders darauf hingewiesen, daß die Gesamtbeprobung zwar in der Versuchsdurchführung zeitaufwendiger, die mathematische Aufbereitung der Ergebnisse jedoch einfacher ist (Anhang 5). Allerdings liegt die Entscheidung für die jeweilige Methodik beim Experimentator, der auch die verfügbaren Laboreinrichtungen und -mittel in Rechnung zu stellen hat.

(a) Gesamtbeprobungsmethode: Proben mit dem gleichen Boden-Lösungs-Verhältnis werden vorbereitet, und zwar so viele, wie Zeitintervalle zur Untersuchung der Adsorptionskinetik vorgesehen sind. Nach Zentrifugation und, falls gewünscht, Filtration wird die wäßrige Phase möglichst vollständig erhalten und nach beispielsweise 4 h gemessen. Bei der zweiten Probe erfolgt die Messung nach 8 h, bei der dritten nach 24 h usw.

(b) Aliquotenbeprobungsmethode: Für jedes Boden-Lösungs-Verhältnis wird lediglich eine Duplikatprobe vorbereitet. Bei festgelegten Zeitintervallen wird das Gemisch zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Eine kleine Aliquote der wäßrigen Phase wird sofort auf die Testsubstanz analysiert. Anschließend wird der Versuch mit dem ursprünglichen Gemisch fortgesetzt. Folgt auf die Zentrifugation Filtration, so sollte das Labor für die Zentrifugation kleiner wäßriger Aliquoten ausgestattet sein. Es empfiehlt sich, daß das Gesamtvolumen der abgenommenen Aliquoten nicht höher ist als 1 % des Gesamtvolumens der Lösung, damit sich das Boden-Lösungs-Verhältnis nicht signifikant ändert und die Masse des zur Adsorption verfügbaren gelösten Stoffes während des Tests nicht abnimmt.

Der Adsorptionsanteil A_{t_i} wird zu jedem Zeitpunkt (t_i) auf der Basis der nominellen Anfangskonzentration und der gemessenen Konzentration zur Probenahmezeit (t_i), korrigiert um den Leerwert, berechnet. Graphische Darstellungen von A_{t_i} in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 1 Anhang 5) werden erzeugt, um das Erreichen des Gleichgewichtsplateaus abzuschätzen². Der K_d -Wert bei Gleichgewicht wird ebenfalls berechnet. Ausgehend von diesem K_d -Wert werden aus Abb. 1 geeignete Boden-Lösungs-Verhältnisse so ausgewählt, daß der Adsorptionsanteil über 20 % und vorzugsweise >50 % liegt (61). Alle anwendbaren Gleichungen und Grundsätze sind im Abschnitt Daten und Abschlußbericht sowie in Anhang 5 aufgeführt.

1.9.2.2 *Bestimmung der Zeit zur Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts und der bei Gleichgewicht adsorbierten Menge Testsubstanz*

Wie bereits erwähnt, gestatten graphische Darstellungen von A_{t_i} bzw. C_{aq}^{ads} in Abhängigkeit von der Zeit eine Abschätzung des Erreichens des Adsorptionsgleichgewichts und der bei Gleichgewicht adsorbierten Menge Testsubstanz. Beispiele für solche graphischen Darstellungen werden in den Abb. 1 und 2 gezeigt. Die Gleichgewichtseinstellungszeit ist die Zeit, die das System benötigt, um ein Plateau zu erreichen.

Wird bei einem speziellen Boden kein Plateau, sondern ein kontinuierlicher Anstieg festgestellt, so können dafür Faktoren wie Bioabbau oder langsame Diffusion verantwortlich sein. Ein Bioabbau läßt sich nachweisen, indem das Experiment mit einer sterilisierten Probe des Bodens wiederholt wird. Wird kein Plateau erreicht, sollte der Experimentator nach anderen Phänomenen suchen, die bei seinen spezifischen Untersuchungen beteiligt sein könnten. Zu diesem Zweck könnten entsprechende Modifizierungen an den Versuchsbedingungen (Temperatur, Schüttelzeiten, Boden-Lösungs-Verhältnisse) vorgenommen werden. Die Entscheidung darüber, ob das Testverfahren fortgesetzt werden soll, auch wenn es möglicherweise nicht gelingt, ein Gleichgewicht zu erreichen, liegt im Ermessen des Experimentators.

1.9.2.3 *Adsorption an der Oberfläche des Testgefäßes und Stabilität der Testsubstanz*

Einige Informationen zur Adsorption der Testsubstanz an der Oberfläche von Testgefäßen und zu ihrer Stabilität lassen sich aus der Analyse der Kontrollproben ableiten. Wird ein Verfall außerhalb der Standardabweichung der analytischen Methode beobachtet, könnte ein abiotischer Abbau und/oder eine Adsorption an der Oberfläche des Testgefäßes beteiligt sein. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Phänomenen kann getroffen werden, indem die Wände des Gefäßes mit einem bekannten Volumen eines geeigneten Lösungsmittels gründlich gewaschen werden und die Waschlösung auf die Testsubstanz analysiert wird. Ist keine Adsorption an der Oberfläche des Testgefäßes zu beobachten, demonstriert der Verfall eine abiotische Instabilität der Testsubstanz. Wird Adsorption festgestellt, macht sich ein Wechsel des Materials des Testgefäßes erforderlich. Die aus diesem Experiment gewonnenen Daten zur Adsorption an der Oberfläche der Testgefäße können jedoch nicht direkt auf ein Boden-Lösungs-Experiment extrapoliert werden. Die Anwesenheit von Boden wird sich auf diese Adsorption auswirken.

Zusätzliche Angaben zur Stabilität der Testsubstanz lassen sich durch Bestimmung der Stamm-Massenbilanz im Zeitablauf ableiten. Dabei werden die wäßrige Phase, Extrakte von Boden und Testgefäßwänden auf die Testsubstanz analysiert. Die Differenz zwischen der Masse der zugesetzten Testchemikalie und der Summe der Massen der Testchemikalie in der wäßrigen Phase, Extrakte von Boden und Testgefäßwänden ist gleich der abgebauten und/oder verdunsteten und/oder nicht extrahierten Masse. Zur Durchführung einer Massenbilanzbestimmung sollte das Adsorptionsgleichgewicht innerhalb der Versuchszeit erreicht worden sein.

² Einträge der Konzentration der Testsubstanz in der wäßrigen Phase (C_{aq}^{ads}) in Abhängigkeit von der Zeit könnten ferner zur Abschätzung des Erreichens des Gleichgewichtsplateaus verwendet werden (siehe Abb. 2 in Anhang 5).

Die Bestimmung der Massenbilanz erfolgt an beiden Böden sowie für ein Boden-Lösungs-Verhältnis je Boden, das einen Verfall oberhalb 20 % und vorzugsweise >50 % bei Gleichgewicht ergibt. Wenn das Experiment zur Verhältnisfindung mit der Analyse der letzten Probe der wäßrigen Phase nach 48 h abgeschlossen ist, werden die Phasen mittels Zentrifugation und, falls gewünscht, Filtration getrennt. Die wäßrige Phase wird so weitgehend wie möglich aufgefangen, und der Boden wird mit einem Extraktionslösungsmittel (Extraktionskoeffizient mindestens 95 %) versetzt, um die Testsubstanz zu extrahieren. Empfehlenswert sind wenigstens zwei aufeinanderfolgende Extraktionen. Die Menge Testsubstanz in den Boden- und Testgefäßextrakten wird bestimmt und die Massenbilanz berechnet (Gleichung 10, Daten und Abschlußbericht). Fällt sie niedriger aus als 90 %, gilt die Testsubstanz als im Zeitrahmen des Tests instabil. Dennoch könnten die Untersuchungen weiter fortgesetzt werden, wobei dann die Instabilität der Testsubstanz zu berücksichtigen wäre. Für diesen Fall empfiehlt es sich, beide Phasen in der Hauptuntersuchung zu analysieren.

1.9.2.4 Stufe 2 - Adsorptionskinetik bei einer Konzentration der Testsubstanz

Zum Einsatz kommen fünf aus Tabelle 1 ausgewählte Böden. Hierbei wäre es von Vorteil, gegebenenfalls einige oder sämtliche Böden, die bei der Voruntersuchung verwendet wurden, einzubeziehen. In einem solchen Fall muß Stufe 2 für die in der Voruntersuchung benutzten Böden nicht wiederholt werden.

Die Zeit zur Einstellung des Gleichgewichts, das Boden-Lösungs-Verhältnis, das Gewicht der Bodenprobe, das Volumen der wäßrigen Phase in Kontakt mit dem Boden und die Konzentration der Testsubstanz in der Lösung werden auf der Basis der Ergebnisse aus den Voruntersuchungen ausgewählt. Analysen sollten vorzugsweise nach etwa 2, 4, 6, 8 (eventuell auch 10) und 24 h Kontaktzeit erfolgen. Die Rührzeit könnte auf maximal 48 h ausgedehnt werden, sollte eine Chemikalie im Zusammenhang mit den Resultaten der Verhältnisfindung eine längere Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts benötigen. Die Analysenzeiten könnten jedoch flexibel angesetzt werden.

Jedes Experiment (ein Boden und eine Lösung) wird mindestens doppelt ausgeführt, um die Varianz der Resultate abschätzen zu können. Bei jedem Versuch wird eine Leerprobe untersucht. Sie besteht aus dem Boden und 0,01 M CaCl₂-Lösung ohne Testsubstanz und ist hinsichtlich Gewicht und Volumen mit den Versuchsproben identisch. Zu Absicherung gegen unerwartete Ergebnisse wird eine Kontrollprobe mit lediglich der Testsubstanz in 0,01 M CaCl₂-Lösung (ohne Boden) dem gleichen Testverfahren unterzogen.

Der Adsorptionsanteil wird zu jedem Zeitpunkt A_{t_1} und/oder Zeitintervall $A_{\Delta t_1}$ (gemäß den Erfordernissen) berechnet und in Abhängigkeit von der Zeit graphisch aufgetragen. Ebenfalls berechnet werden der Verteilungskoeffizient K_d bei Gleichgewicht sowie der auf organischen Kohlenstoff normierte Adsorptionskoeffizient K_{oc} (für nichtpolare organische Chemikalien).

Ergebnisse des Adsorptionskinetiktests

Der lineare K_d -Wert ist im allgemeinen zur Beschreibung des Sorptionsverhaltens in Boden hinreichend genau (35)(78) und ist ein Ausdruck für die inhärente Mobilität von Chemikalien in Boden. Beispielsweise gelten Chemikalien mit $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ in der Regel als qualitativ mobil. In ähnlicher Weise haben MacCall *et al.* (16) eine Mobilitätssystematik auf der Basis von K_{oc} -Werten aufgestellt. Ferner gibt es Auswaschsystematiken auf der Grundlage einer Beziehung zwischen K_{oc} und DT-50³ (32)(79).

Fehleranalysenuntersuchungen (61) zufolge können K_d -Werte unterhalb $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ zudem nicht genau anhand eines Rückgangs der Konzentration in der wäßrigen Phase abgeschätzt werden, und zwar auch dann nicht, wenn das (aus Sicht der Genauigkeit) günstigste Boden-Lösungs-Verhältnis, nämlich 1:1, angewendet wird. In diesem Fall ist eine Analyse beider Phasen, d. h. von Boden und Lösung, angeraten.

³ DT-50: Abbauzeit für 50 % der Testsubstanz.

Angesichts der vorstehenden Feststellungen empfiehlt es sich, die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens einer Chemikalie in Boden und ihres Mobilitätspotentials fortzusetzen, indem für diese Systeme die Adsorptionsisothermen nach Freundlich bestimmt werden, bei denen eine exakte Bestimmung von K_d nach dem dieser Testmethode zugrundeliegenden Versuchsprotokoll möglich ist. Eine genaue Bestimmung ist möglich, sofern der aus der Multiplikation von K_d mit dem Boden-Lösungs-Verhältnis resultierende Wert größer ist als 0,3, wenn die Messungen auf einem Konzentrationsrückgang in der wäßrigen Phase beruhen (indirekte Methode), bzw. größer ist als 0,1, wenn beide Phasen analysiert werden (direkte Methode) (61).

1.9.2.5 *Stufe 3 - Adsorptionsisothermen und Desorptionskinetik/Desorptionsisothermen*

1.9.2.5.1 Adsorptionsisothermen

Zum Einsatz kommen fünf Substanzen, mit denen vorzugsweise zwei Größenordnungen abgedeckt werden. Bei der Auswahl dieser Konzentrationen sollten die Wasserlöslichkeit und die resultierenden wäßrigen Gleichgewichtskonzentrationen Berücksichtigung finden. Das Boden-Lösungs-Verhältnis je Boden sollte während des Verlaufs der Untersuchung nicht verändert werden. Der Adsorptionstest wird wie vorstehend beschrieben durchgeführt, mit dem einzigen Unterschied, daß die wäßrige Phase nur einmal zu der Zeit analysiert wird, die notwendig ist, um ein Gleichgewicht -wie zuvor in Stufe 2 - bestimmt zu erreichen. Die Gleichgewichtskonzentrationen in der Lösung werden bestimmt, und die adsorbierte Menge wird anhand des Verfalls der Testsubstanz in der Lösung oder nach der direkten Methode berechnet. Die je Einheit Bodenmasse adsorbierte Menge wird graphisch als Funktion der Gleichgewichtskonzentration der Testsubstanz aufgetragen (siehe Abschnitt Daten und Abschlußbericht).

Ergebnisse aus dem Adsorptionsisothermenexperiment

Von den bisher vorgeschlagenen mathematischen Adsorptionsmodellen ist die Freundlich-Isotherme das zur Beschreibung von Adsorptionsprozessen am häufigsten verwendete Modell. Nähere Einzelheiten zur Interpretation und Bedeutung von Adsorptionsmodellen sind in der in den bibliographischen Angaben genannten Literatur zu finden (41)(45)(80)(81)(82).

Anmerkung: Es sei darauf hingewiesen, daß ein Vergleich von K_F (Freundlich-Adsorptionskoeffizient)-Werten für unterschiedliche Substanzen nur möglich ist, wenn diese K_F -Werte in den gleichen Einheiten ausgedrückt werden (83).

1.9.2.5.2 Desorptionskinetik

Der Zweck dieses Experiments besteht darin, zu untersuchen, ob die Adsorption einer Chemikalie an einem Boden reversibel oder irreversibel ist. Diese Information ist insofern von Bedeutung, als auch der Desorptionsprozeß eine wichtige Rolle im Verhalten einer Chemikalie in Feldboden spielt. Darüber hinaus sind Desorptionsdaten nützliche Eingangsdaten für die Computermodellierung von Auswaschungen und aufgelöster Abflußsimulation. Wird eine Desorptionsuntersuchung gewünscht, so empfiehlt es sich, die nachfolgend beschriebene Studie an jedem System auszuführen, bei dem im vorhergehenden Experiment zur Adsorptionskinetik eine genaue Bestimmung von K_d möglich war.

Ähnlich wie bei der Adsorptionskinetikuntersuchung bestehen auch hier zwei Möglichkeiten zur Fortführung des Desorptionskinetikexperiments: (a) die Gesamtbeprobungsmethode und (b) die Aliquotenbeprobungsmethode. Die Wahl der zugrundeliegenden Methodik liegt im Ermessen des Experimentators, der dabei auch die verfügbaren Laboreinrichtungen und -mittel in Rechnung stellen muß.

(a) Gesamtbeprobungsmethode: Für jeden Boden, der zur Fortführung der Desorptionsstudie ausgewählt wurde, werden so viele Proben mit dem gleichen Boden-Lösungs-Verhältnis vorbereitet wie Zeitintervalle zur Untersuchung der Desorptionskinetik vorgesehen sind. Vorzugsweise sollten die gleichen Zeitintervalle wie beim Adsorptionskinetikversuch Anwendung finden, doch kann die Gesamtzeit auch ausgedehnt werden, falls dies zum Erreichen des Desorptionsgleichgewichts im System erforderlich ist. Bei jedem Versuch (ein Boden, eine Lösung) wird eine Leerprobe untersucht. Diese besteht aus dem Boden und 0,01 M CaCl₂-Lösung, ohne Testsubstanz, und ist hinsichtlich Gewicht und Volumen mit denen des Experiments identisch. Als Kontrollprobe wird die Testsubstanz in 0,01 M CaCl₂-Lösung (ohne Boden) dem gleichen Testverfahren unterzogen. Alle Gemische des Bodens mit der Lösung werden bis zum Erreichen des Adsorptionsgleichgewichts geschüttelt (wie zuvor in Stufe 2 bestimmt). Anschließend werden die Phasen mittels Zentrifugieren getrennt und die wäßrigen Phasen so weit wie möglich abgenommen. Für das abgenommene Volumen Lösung wird mit einem gleichen Volumen 0,01 M CaCl₂ ohne Testsubstanz aufgefüllt, und die neuen Gemische werden wieder geschüttelt. Die wäßrige Phase des ersten Glases wird möglichst vollständig aufgefangen und nach beispielsweise 2 h gemessen, die des zweiten Glases nach 4 h, die des dritten nach 6 h usw., bis das Desorptionsgleichgewicht eingestellt ist.

(b) Aliquotenbeprobungsmethode: Nach dem Adsorptionskinetikversuch wird das Gemisch zentrifugiert und die wäßrige Phase so weit wie möglich abgenommen. Für das abgenommene Lösungsvolumen wird mit einem gleichen Volumen 0,01 M CaCl₂ ohne Testsubstanz aufgefüllt. Das neue Gemisch wird bis zur Einstellung des Desorptionsgleichgewichts geschüttelt. Während dieses Zeitraums wird das Gemisch in festgelegten Zeitintervallen zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Eine kleine Aliquote der wäßrigen Phase wird sofort auf die Testsubstanz analysiert. Anschließend läuft der Versuch mit dem ursprünglichen Gemisch weiter. Das Volumen jeder einzelnen Aliquote sollte geringer sein als 1 % des Gesamtvolumens. Zur Aufrechterhaltung des Verhältnisses Boden:Lösung wird in das Gemisch die gleiche Menge frischer 0,01 M CaCl₂-Lösung gegeben. Das Schütteln wird bis zum darauffolgenden Zeitintervall fortgesetzt.

Der Desorptionsanteil wird zu jedem Zeitpunkt (D_{t_i}) und/oder Zeitintervall ($D_{\Delta t_i}$) (je nach den Untersuchungserfordernissen) berechnet und graphisch in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Der Desorptionskoeffizient von K_{ds} bei Gleichgewicht wird ebenfalls berechnet. Alle anwendbaren Gleichungen sind im Abschnitt Daten und Abschlußbericht sowie in Anhang 5 aufgeführt.

Ergebnisse aus dem Desorptionskinetikversuch

Gemeinsame graphische Darstellung des Anteils an Desorption D_{t_i} und Adsorption A_{t_i} in Abhängigkeit von der Zeit erlauben eine Abschätzung der Reversibilität des Adsorptionsvorgangs. Wird das Desorptionsgleichgewicht erreicht, auch wenn dies erst nach dem Zweifachen der Zeit für das Adsorptionsgleichgewicht der Fall ist, und liegt die Gesamtdesorption bei über 75 % der adsorbierten Menge, so gilt die Adsorption als reversibel.

1.9.2.5.3 Desorptionsisothermen

Desorptionsisothermen nach Freundlich werden an den Böden bestimmt, die im Experiment zu den Adsorptionsisothermen verwendet wurde. Der Desorptionstest wird wie im Abschnitt "Desorptionskinetik" beschrieben durchgeführt, mit dem einzigen Unterschied, daß die wäßrige Phase nur einmal, und zwar bei Desorptionsgleichgewicht, analysiert wird. Es wird die Menge der desorbierten Testsubstanz berechnet. Der Gehalt von am Boden adsorbiert bleibender Testsubstanz wird als Funktion der Gleichgewichtskonzentration der Testsubstanz in Lösung aufgetragen (siehe Abschnitt Daten und Abschlußbericht sowie Anhang 5).

2. DATEN UND ABSCHLUSSBERICHT

Die Zusammenstellung der Analysendaten erfolgt in Tabellenform (siehe Anhang 6). Es werden einzelne Messungen und errechnete Mittelwerte angegeben. Von Adsorptionsisothermen werden graphische Darstellungen vorgelegt. Die Berechnungen werden wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

Für die Zwecke des Tests wird davon ausgegangen, daß das Gewicht von 1 cm³ wäßriger Lösung 1 g beträgt. Das Boden-Lösungs-Verhältnis kann in den Darstellungen mit den Einheiten w/w bzw. w/vol ausgedrückt werden.

Die Adsorption (A_{t_i}) wird als der Anteil von unter den Testbedingungen am Boden adsorbierter Substanz bezogen auf die zu Beginn des Tests vorhandene Menge definiert. Ist die Testsubstanz stabil und adsorbiert nicht signifikant an der Behälterwand, so wird A_{t_i} zu jedem Zeitpunkt t_i nach folgender Gleichung berechnet:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (3)$$

Hierin bedeuten:

A_{t_i} = Adsorptionsanteil zum Zeitpunkt t_i (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = Masse der am Boden zur Zeit t_i adsorbierten Testsubstanz (μg);

m_0 = Masse der Testsubstanz im Reagenzglas zu Beginn des Tests (μg).

Detaillierte Angaben zur Vorgehensweise bei der Berechnung des Adsorptionsanteils A_{t_i} für die Gesamtbeprobungs- und die Aliquotenbeprobungsmethode enthält Anhang 5.

Der Verteilungskoeffizient K_d ist der Quotient aus dem Gehalt der Substanz in der Bodenphase und der Massenkonzentration der Substanz in der wäßrigen Lösung unter den Testbedingungen, wenn das Adsorptionsgleichgewicht erreicht wird.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{Boden}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (4)$$

Hierin bedeuten:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = Gehalt der am Boden bei Adsorptionsgleichgewicht adsorbierten Substanz ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = Massenkonzentration der Substanz in der wäßrigen Phase bei Adsorptionsgleichgewicht ($\mu\text{g cm}^{-3}$).

Diese Konzentration wird analytisch unter Berücksichtigung der durch die Leerversuche erhaltenen Werte bestimmt;

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = Masse der am Boden bei Adsorptionsgleichgewicht adsorbierten Substanz (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = Masse der Substanz in der Lösung bei Adsorptionsgleichgewicht (μg);

m_{Boden} = Menge der Bodenphase, ausgedrückt in Trockenmasse Boden (g);

V_0 = Ausgangsvolumen der wäßrigen Phase in Kontakt mit dem Boden (cm^3).

Die Beziehung zwischen A_{eq} und K_d wird wie folgt dargestellt:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{Boden}}} \quad (\text{cm}^3/\text{g}^{-1}) \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (5)$$

Hierin bedeutet:

A_{eq} = Adsorptionsanteil bei Adsorptionsgleichgewicht (%).

Der auf organischen Kohlenstoff normierte Adsorptionskoeffizient K_{oc} setzt den Verteilungskoeffizienten K_d in Beziehung zum Gehalt an organischem Kohlenstoff in der Bodenprobe:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (6)$$

Hierin bedeutet:

$\%OC$ = Anteil an organischem Kohlenstoff in der Bodenprobe (g g^{-1}).

Der K_{oc} -Koeffizient steht für einen einzigen Wert, der die Verteilung hauptsächlich von nichtpolaren organischen Chemikalien zwischen organischem Kohlenstoff im Boden oder Sediment und Wasser charakterisiert. Die Adsorption dieser Chemikalien wird in Korrelation zum organischen Gehalt des sorbierenden Feststoffs gesetzt (7). Folglich sind K_{oc} -Werte abhängig von den spezifischen Eigenschaften der Huminfractionen, die hinsichtlich der Sorptionskapazität aufgrund von Unterschieden in Herkunft, Entstehung usw. erheblich voneinander abweichen.

2.1.1 Adsorptionsisothermen

Die Freundlich-Adsorptionsisothermen-Gleichung setzt die Menge der adsorbierten Testsubstanz in Beziehung zur Konzentration der Testsubstanz in Lösung bei Gleichgewicht (Gleichung 8).

Die Daten werden wie unter dem Punkt "Adsorption" beschrieben behandelt, und für jedes Reagenzglas wird der Gehalt der nach dem Adsorptionstest am Boden adsorbierten Testsubstanz ($C_s^{ads}(eq)$, an anderer Stelle als x/m bezeichnet) berechnet. Es wird angenommen, daß ein Gleichgewicht eingestellt worden ist und daß $C_s^{ads}(eq)$ für den Gleichgewichtswert steht:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{Boden}} = \frac{[C_0 - C_s^{ads}(eq)]V_o}{m_{Boden}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

Die Freundlichsche Adsorptionsgleichung lautet wie folgt (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

bzw. in der linearen Form:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

Hierin bedeuten:

K_F^{ads} = Freundlich-Adsorptionskoeffizient; seine Dimension ist $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$, jedoch nur wenn $1/n = 1$; in allen anderen Fällen wird die Neigung $1/n$ in die Dimension von K_F^{ads} ($\mu\text{g}^{-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$) eingeführt;

n = Regressionskonstante; $1/n$ liegt im allgemeinen im Bereich von 0,7 bis 1,0 und zeigt an, daß Sorptionsdaten oft leicht nichtlinear sind.

Die Gleichungen (8) und (9) werden graphisch aufgetragen, und die Werte von K_F^{ads} und $1/n$ werden mittels Regressionsanalyse nach der Gleichung (9) berechnet. Der Korrelationskoeffizient r^2 der log-Gleichung wird ebenfalls berechnet. Abb. 2 zeigt ein Beispiel für solche graphischen Darstellungen.

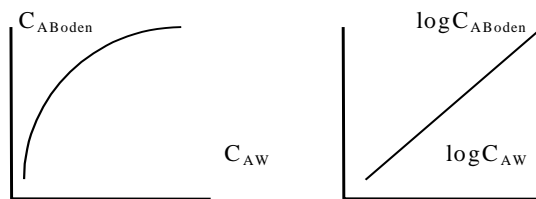


Abb. 2. Freundlich-Adsorptionskurve, normal und linearisiert

2.1.2

Massenbilanz

Die **Massenbilanz** (MB) wird definiert als der Anteil der Substanz, der nach einem Adsorptionstest gegenüber der nominalen Substanzmenge am Beginn des Tests analytisch erhalten werden kann.

Die Behandlung von Daten hängt davon ab, inwieweit das Lösungsmittel vollständig mit Wasser mischbar ist. Im Fall eines wasser-mischbaren Lösungsmittels kann die unter Punkt "Desorption" beschriebene Behandlung von Daten angewendet werden, um die durch Lösungsmittelextraktion rückgewonnene Substanzmenge zu bestimmen. Ist das Lösungsmittel nicht so gut mit Wasser mischbar, muß die Bestimmung der erhaltenen Menge erfolgen.

Die Massenbilanz MB wird für die Adsorption wie folgt berechnet: Es wird angenommen, daß der Term (m_E) der Summe der Massen der Testchemikalien entspricht, die mit einem organischen Lösungsmittel aus dem Boden und von den Oberflächen des Testgefäßes extrahiert wurden:

$$\text{MB} = \frac{(V_{\text{rec}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

Hierin bedeuten:

MB = Massenbilanz (%);

m_E = Gesamtmasse von aus dem Boden und von Wänden des Testgefäßes in zwei Schritten extrahierter Testsubstanz (μg);

C_0 = Anfangsmassenkonzentration der Testlösung in Kontakt mit dem Boden ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

V_{rec} = Volumen des nach dem Adsorptionsgleichgewicht erhaltenen Überstandes (cm^3).

Die Desorption (D) wird als Anteil der unter Testbedingungen desorbierten Testsubstanz bezogen auf die Menge der zuvor adsorbierten Substanz definiert:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

Hierin bedeuten:

D_{t_i} = Desorptionsanteil zum Zeitpunkt t_i , (%);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)$ = Masse der aus Boden zum Zeitpunkt t_i desorbierten Testsubstanz (μg);

$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = Masse der bei Adsorptionsgleichgewicht an Boden adsorbierten Testsubstanz (μg).

Detaillierte Angaben zur Vorgehensweise bei der Berechnung des Desorptionsanteils D_{t_i} für die Gesamtbeprobungs- und die Aliquotenbeprobungsmethode enthält Anhang 5.

Der Scheindesorptionskoeffizient (K_{des}) ist unter den Testbedingungen der Quotient aus dem Gehalt der in der Bodenphase verbleibenden Substanz und der Massenkonzentration der in der wäßrigen Lösung desorbierten Substanz bei Erreichen des Desorptionsgleichgewichts:

$$K_{\text{des}} = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})} \frac{V_{\text{T}}}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (12)$$

Hierin bedeuten:

K_{des} = Desorptionskoeffizient ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = Gesamtmasse der bei Desorptionsgleichgewicht aus Boden desorbierten Testsubstanz (μg);

V_{T} = Gesamtvolumen der wäßrigen Phase in Kontakt mit dem Boden während des Desorptionskinetiktests (cm^3).

Eine Anleitung zur Berechnung von $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ wird in Anhang 5 im Abschnitt "Desorption" gegeben.

Hinweis

Wurde der vorausgehende Adsorptionstest nach der Gesamtbeprobungsmethode durchgeführt, so gilt: Das Volumen V_{T} in der Gleichung (12) ist gleich V_0 .

Desorptionsisothermen

Die Freundlich-Desorptionsisothermen-Gleichung setzt den Gehalt der am Boden adsorbiert bleibenden Testsubstanz in Beziehung zur Konzentration der Testsubstanz in Lösung bei Desorptionsgleichgewicht (Gleichung 16).

Für jedes Reagenzglas wird der Gehalt der an Boden bei Desorptionsgleichgewicht adsorbiert bleibenden Substanz wie folgt berechnet:

$$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})}{m_{\text{soil}}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}$ (eq) wird definiert als:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq}) \frac{V_0}{V_{\text{r}}^{\text{F}}} - m_{\text{aq}}^{\text{A}}(\mu\text{g}) \quad (14)$$

Hierin bedeuten:

$C_{\text{s}}^{\text{des}}$ (eq) = Gehalt der bei Desorptionsgleichgewicht am Boden adsorbiert bleibenden Testsubstanz ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$m_{\text{m}}^{\text{des}}$ (eq) = analytisch bestimmte Masse Substanz in der wäßrigen Phase bei Desorptionsgleichgewicht (μg);

m_{aq}^{A} = Masse der nach Adsorptionsgleichgewichtseinstellung infolge unvollständigen Volumenaustauschs verbliebenen Testsubstanz (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}$ (eq) = Masse der Substanz in der Lösung bei Adsorptionsgleichgewicht (μg);

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_{r}^{F} = Volumen der aus dem Glas zur Messung der Testsubstanz bei Desorptionsgleichgewicht abgenommenen Lösung (cm^3);

V_{R} = Volumen des nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts aus dem Glas abgenommenen und durch das gleiche Volumen einer 0,01 M CaCl_2 -Lösung ersetzten Überstandes (cm^3);

Die Desorptionsgleichung nach Freundlich lautet wie folgt (16):

$$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = K_{\text{F}}^{\text{des}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

bzw. in der linearen Form:

$$\log C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_{\text{F}}^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

Hierin bedeuten:

$K_{\text{F}}^{\text{des}}$ = Freundlich-Desorptionskoeffizient;

n = Regressionskonstante;

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}$ (eq) = Massenkonzentration der Substanz in der wäßrigen Phase bei Desorptionsgleichgewicht ($\mu\text{g cm}^{-3}$).

Die Gleichungen (16) und (17) können graphisch aufgetragen werden, und die Werte von K_F^{des} und $1/n$ werden mittels Regressionsanalyse nach der Gleichung 17 berechnet.

Hinweis:

Ist der Freundlich-Adsorptions- bzw. Desorptionsexponent $1/n$ gleich 1, so wird die Freundlich-Adsorptions- bzw. Desorptionsbindungskonstante (K_F^{ads} und K_F^{des}) gleich der Adsorptions- bzw. der Desorptionsgleichgewichtskonstante (K_d bzw. K_{des}) sein, und die Kurven von C_s in Abhängigkeit von C_{aq} werden linear verlaufen. Sind die Exponenten nicht gleich 1, so verlaufen die Kurven C_s in Abhängigkeit von C_{aq} nicht linear, und die Adsorptions- und die Desorptionskonstante werden entlang der Isothermen variieren.

2.2.2 TESTBERICHT

Der Testbericht sollte folgende Angaben enthalten:

- Vollständige Angaben zu den verwendeten Bodenproben, darunter:
 - geographische Angaben zum Standort (Breite, Länge);
 - Datum der Probenahme;
 - Einsatzstruktur (z. B. landwirtschaftlich genutzter Boden, Forst usw.);
 - Probenahmetiefe;
 - Sand-/Schluff-/Tonanteil;
 - pH-Werte (in 0,01 M CaCl_2);
 - organischer Kohlenstoffgehalt;
 - organischer Substanzgehalt;
 - Stickstoffgehalt;
 - C/N-Verhältnis;
 - Kationenaustauschkapazität (mmol/kg);
 - sämtliche Informationen zur Sammlung und Lagerung von Bodenproben;
 - gegebenenfalls alle für die Interpretation der Adsorption - Desorption der Testsubstanz relevanten Informationen;
 - Angaben zu den für die Bestimmung der einzelnen Parameter verwendeten Methoden.
- Informationen zur Testsubstanz, wenn erforderlich;
- Temperatur der Experimente;
- Zentrifugierbedingungen;
- zur Analyse der Testsubstanz herangezogenes analytisches Verfahren;
- Begründung der eventuellen Verwendung eines Solubilisierungsmittels bei der Herstellung der Vorratslösung der Testsubstanz;
- Erläuterung zu Korrekturen an den Berechnungen, falls relevant;
- Daten gemäß Formular (Anhang 6) und graphische Darstellungen;
- sämtliche Informationen und Beobachtungen, die für die Auslegung der Testergebnisse hilfreich sind.

1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.
6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
12. Calvet R., (1989), "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in *Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil* (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
13. Calvet R., (1980) "Adsorption-Desorption Phenomena" in *Interactions between herbicides and the soil*. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils*. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.
15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, Vol. 38(1), 29-35.
16. McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), "Measurement 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 DC.
17. Lambert S.M., Porter P.E., and Schiefferrstein R.H., (1965), "Movement and sorption of chemicals applied to the soil". *Weeds*, 13, 185-190.
18. Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) "Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". *J.Agric.Food Chem.*, 18, 524-528.
19. Russell M.H., (1995), "Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in *Environmental Behavior of Agrochemicals* (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
20. Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), "Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", *IUPAC Reports on Pesticides* (24). *Pure Appl. Chem.*, 60, 901-932.

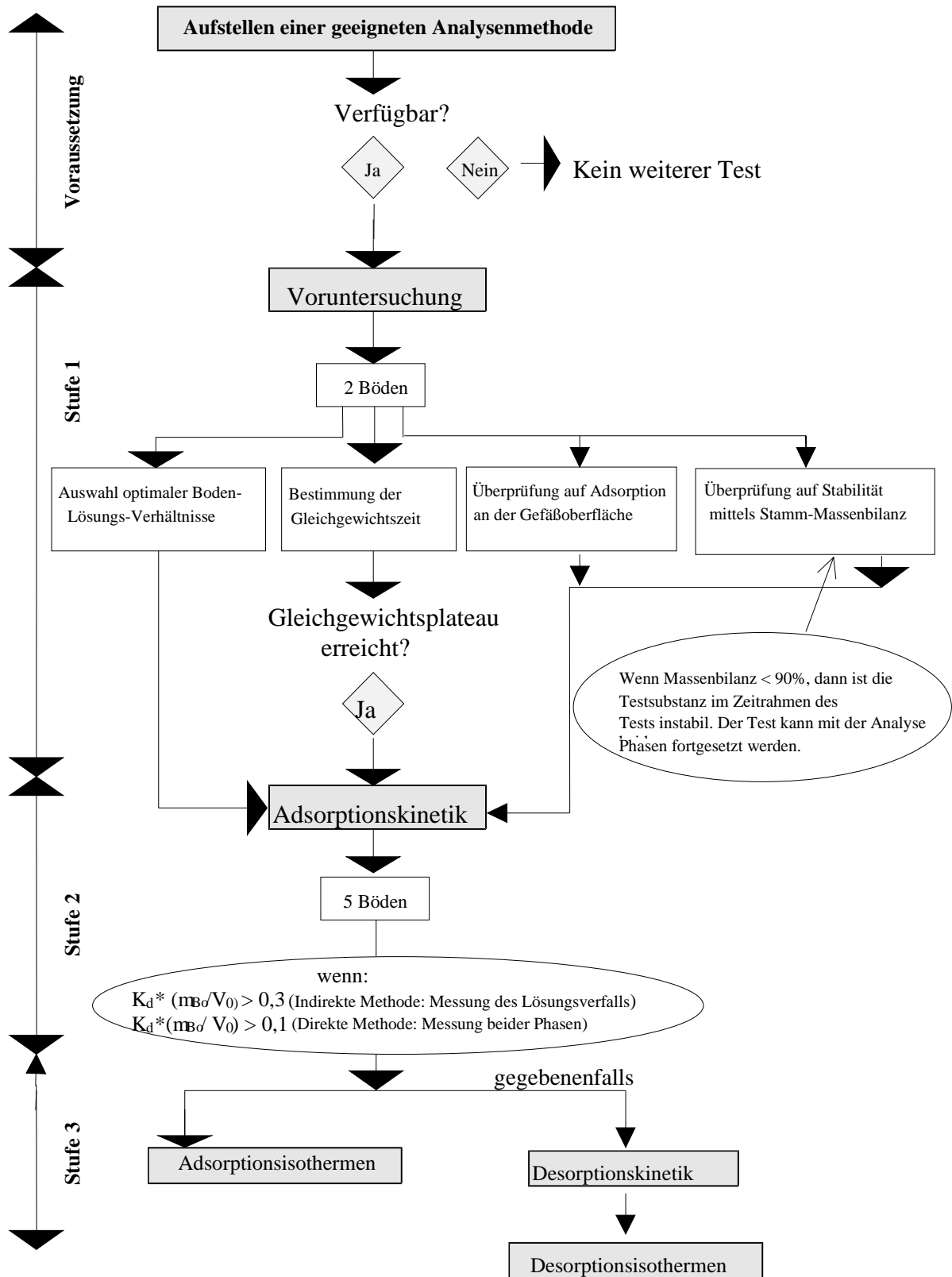
21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
22. Furninge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), "Persistence of herbicides in soil". *J. Sci. Fd Agric.*, 18, 269-273.
23. Burkhard N., and Guth J.A., (1981), "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". *Pestic. Sci.* 12, 45-52.
24. Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). "Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". *Proc. Br. Crop Prot. Conf.*, 3, 961-971.
25. Osgerby J.M., (1973), "Process affecting herbicide action in soil". *Pestic. Sci.*, 4, 247-258.
26. Guth J.A., (1972), "Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". *Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem*, Heft 37, 143-154.
27. Hamaker J.W., (1975), "The interpretation of soil leaching experiments", in *Environmental Dynamics of Pesticides* (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
28. Helling C.S., (1971), "Pesticide mobility in soils". *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 35, 732-210.
29. Hamaker J.W., (1972), "Diffusion and volatilization" in *Organic chemicals in the soil environment* (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.
30. Burkhard N. and Guth J.A., (1981), "Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". *Pestic. Sci.* 12, 37-44.
31. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
32. Gustafson D.I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". *J. Environ. Toxic. Chem.*, 8(4), 339-357.
33. Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). "Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". *J. of Soil Sci.*, 28, 340-350.
34. Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". *Pest. Sci.*, 11, 389-395.
35. Green R.E., and Karickhoff S.W., (1990), "Sorpton estimates for modeling", in *Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2*, pp.80-101,
36. Lambert S.M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". *J. Agri. Food Chem.*, 15, 572-576.
37. Hance R.J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". *J. Agri. Food Chem.*, 17, 667-668.
38. Briggs G.G. (1969), "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". *Nature*, 223, 1288.
39. Briggs G.G. (1981). "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". *J. Agric. Food Chem.*, 29, 1050-1059.
40. Sabljic A., (1984), "Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". *J. Agric. Food Chem.*, 32, 243-246.
41. Bailey G.W., and White J.L., (1970), "Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". *Residue Rev.*, 32, 29-92.
42. Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968), "Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 32:222-234.
43. Karickhoff S.W., (1981) "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". *Chemosphere* 10, 833-846.
44. Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), "Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". *Environ. Toxicol. Safety* 21, 1-17.
45. Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972). "Adsorption in organic chemicals" in *Organic Chemicals in the Soil Environment* (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.
46. Deli J., and Warren G.F., 1971, "Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". *Weed Sci.* 19:67-69.

47. Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". *Weed Science*, Vol. 23, 454-457.
48. Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) "Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International Atomic Energy Agency, Vienna.
49. Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), "Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase", CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
50. ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
51. Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
52. Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. "Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.
53. ISO/ DIS 10381-1 Soil Quality -- Sampling -- Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
54. ISO/DIS 10381-2 Soil Quality -- Sampling -- Part 2: Guidance on sampling techniques.
55. ISO/DIS 10381-3 Soil Quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on safety of sampling.
56. ISO/DIS 10381-4 Soil Quality -- Sampling -- Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
57. ISO/DIS 10381-5 Soil Quality -- Sampling -- Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
58. ISO 10381-6, 1993: Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
59. Green R.E., and Yamane V.K., (1970) "Precision in pesticide adsorption measurements". *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, 353-354.
60. Grover R., and Hance R.J. (1970), "Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". *Soil Sci.*, 109-138.
61. Boesten, J.J.T.I, "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". *Pest. Sci.* 1990, 30, 31-41.
62. Boesten, J.J.T.I. "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106" *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, Brussels, 26-29 April 1994.
63. Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), "Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". *Weed Res.* 21, 227-231.
64. Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), "Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". *J. Environ.Qual.*, 10(3), 382-386.
65. Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), "Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), 227-231.
66. Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), "Sorption of organic substances by soils and sediments". *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), 297-312.
67. Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), "Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". *Chemosphere*, 16(1), 109-116.
68. Lyman W.J. , Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society, Washington DC.
69. Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). "Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.
70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". *Science*, Vol. 206, 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), "Sorption of *p*-Naphthol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 38-42.
72. Karickhoff S.W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833-846.
73. Moreale A., van Bladel R., (1981), "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), 319-322.
74. Müller M., Kördel W. (1996), "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". *Chemosphere*, 32(12), 2493-2504.
75. Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - results of a ring test". *Chemosphere* 30 (7), 1373-1384.
76. Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), "HPLC - screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - comparison of different stationary phases. *Chemosphere* 27 (12), 2341-2352.
77. Hance, R.J., (1967), "The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), "The retention processes: mechanisms" in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
80. Giles C.H., (1970), "Interpretation and use of sorption isotherms" in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, 14-32.
81. Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), "Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". *J. Chem. Soc.*, 3973-93.
82. Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980), "Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption". *Ann. Agron.* 31: 239-251.
83. Bedbur E., (1996), "Anomalies in the Freundlich equation", *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.
84. Guth, J.A., (1985), "Adsorption/desorption", in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
85. Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

ANHANG 1

Testplan



ANHANG 2

EINFLUSS DER GENAUIGKEIT DER ANALYSENMETHODE UND DER KONZENTRATIONSVERÄNDERUNG AUF DIE GENAUIGKEIT VON ADSORPTIONSERGEBNISSEN

Wie die nachstehende Tabelle (84) verdeutlicht, führt dann, wenn die Differenz zwischen der Anfangsmasse ($m_0=110 \mu\text{g}$) und der Gleichgewichtsmasse ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = 100\mu\text{g}$) der Testsubstanz sehr gering ist, eine Abweichung von 5% bei der Messung der Gleichgewichtskonzentration zu einer Abweichung von 50% bei der Berechnung des Gehalts der an Boden adsorbierten Substanz ($m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$) und von 52,4% bei der Berechnung von K_{d} .

Menge des Bodens $m_{\text{Boden}} = 10 \text{ g}$
 Volumen der Lösung $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	R	$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ *	$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ *	R _‡	K _d *	R _‡
	(μg)	($\mu\text{g cm}^{-3}$)		(μg)	($\mu\text{g g}^{-1}$)			
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ oder $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	FÜR A = 9%							
	100	1,000	w. Wert	10	1,00	w. Wert	1	
	101	1,010	1%	9	0,90	10%	0,891	10,9%
	105	1,050	5%	5	0,50	50%	0,476	52,4%
	109	1,090	9%	1	0,10	90%	0,092	90,8%
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ oder $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	FÜR A = 55%							
	50,0	0,500	w. Wert	60,0	6,00	w. Wert	12,00	
	50,5	0,505	1%	59,5	5,95	0,8%	11,78	1,8%
	52,5	0,525	5%	57,5	5,75	4,0%	10,95	8,8%
	55,0	0,550	10%	55,0	5,50	8,3%	10,00	16,7%
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ oder $C_0 = 1.100 \mu\text{g} / \text{cm}^3$	FÜR A = 99%							
	1,100	0,011	w. Wert	108,9	10,89	w. Wert	990	
	1,111	0,01111	1%	108,889	10,8889	0,01%	980	1,0%
	1,155	0,01155	5%	108,845	10,8845	0,05%	942	4,8%
	1,21	0,0121	10%	108,790	10,8790	0,10%	899	9,2%

w. Wert = wahrer Wert

$$* m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}}, \quad K_d = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = Masse der Testsubstanz in der Bodenphase bei Gleichgewicht, μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = Masse der Testsubstanz in der wässrigen Phase bei Gleichgewicht, μg ;

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = Gehalt der Testsubstanz in der Bodenphase bei Gleichgewicht, $\mu\text{g g}^{-1}$;

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = Massenkonzentration der Testsubstanz in der wässrigen Phase bei Gleichgewicht, $\mu\text{g cm}^{-3}$;

R = Analysenfehler bei der Bestimmung der $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$;

R^\dagger = Rechnerische Abweichung als Folge des Analysenfehlers R .

ANHANG 3

ABSCHÄTZUNGSVERFAHREN FÜR K_d

1. Abschätzungsverfahren gestatten eine Vorhersage von K_d ausgehend von Korrelationen mit beispielsweise P_{ow} -Werten (12)(39)(63-68), Wasserlöslichkeitsdaten (12)(19)(21)(39)(68-73) oder Polaritätsdaten, die mittels Anwendung von HPLC auf die entgegengesetzte Phase erhalten wurden (74-76). Wie aus den Tabellen 1 und 2 hervorgeht, ist der K_{oc} bzw. K_{om} der nach diesen Gleichungen berechnet und dann - indirekt - der K_d aus den Gleichungen:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1.724} \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1})$$

2. Das Konzept dieser Korrelationen stützt sich auf zwei Annahmen: (1) Der größte Einfluß auf die Adsorption einer Substanz geht von den organischen Substanzen des Bodens aus; und (2) Die beteiligten Wechselbeziehungen verlaufen überwiegend nichtpolar. Daraus folgt, daß diese Korrelationen (1) nicht oder nur in gewissem Umfang auf polare Substanzen anwendbar sind und (2) nicht anwendbar sind, wenn der organische Substanzgehalt des Bodens sehr klein ist (12). Darüber hinaus sind zwar zufriedenstellende Korrelationen zwischen P_{ow} und Adsorption (19) festgestellt worden, doch für die Beziehung zwischen der Wasserlöslichkeit und dem Umfang der Adsorption ist dies nicht der Fall (19)(21); in diesem Punkt kommen die Studien zu äußerst widersprüchlichen Aussagen.

3. Beispielhafte Korrelationen zwischen dem Adsorptionskoeffizienten und dem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten sowie die Wasserlöslichkeit sind in Tabelle 1 bzw. 2 aufgeführt.

Tabelle 1. Beispielhafte Korrelationen zwischen dem Adsorptionsverteilungskoeffizienten und dem Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten; weitere Beispiele siehe (12) (68).

Substanzen	Korrelationen	Verfasser
Substituierte Harnstoffe	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromatische chlorierte Substanzen	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Verschiedene Pestizide	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl und Mingelgrin (1984) (66)
Aromatische Kohlenwasserstoffe	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles und Mantoura (1987) (67)

Tabelle 2. Beispielhafte Korrelationen zwischen dem Adsorptionsverteilungskoeffizienten und der Wasserlöslichkeit; weitere Beispiele siehe (68) (69).

Verbindungen	Korrelationen	Verfasser
Verschiedene Pestizide	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl und Mingelgrin (1984) (66)
Aliphatische, aromatische chlorierte Substanzen	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α -Naphthol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Cyclische, aliphatische aromatische Substanzen	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Verschiedene Verbindungen	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

ANHANG 4

BERECHNUNGEN ZUR FESTLEGUNG DER ZENTRIFUGATIONSBEDINGUNGEN

Die Zentrifugationszeit ergibt sich nach der folgenden Formel, wobei kugelförmige Partikel angenommen werden:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln \left(\frac{R_b}{R_t} \right) \quad (1)$$

Zur Vereinfachung sind alle Parameter in Nicht-SI-Einheiten beschrieben (g, cm).

Hierin bedeuten:

- ω = die Drehzahl ($=2 \pi \text{ Upm}/60$), rad s^{-1} ;
- Upm = Umdrehungen pro Minute;
- η = Viskosität der Lösung, $\text{g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- r_p = Partikelradius, cm;
- ρ_s = Bodendichte, g cm^{-3} ;
- ρ_{aq} = Lösungsdichte, g cm^{-3} ;
- R_t = Abstand vom Zentrum des Zentrifugenrotors zum oberen Ende der Lösung im Zentrifugenglas, cm;
- R_b = Abstand vom Zentrum des Zentrifugenrotors zum unteren Ende des Zentrifugenglases, cm;
- $R_b - R_t$ = Länge des Boden-Lösungs-Gemischs im Zentrifugenrohr, cm.

In der Praxis wird zur Gewährleistung einer vollständigen Trennung üblicherweise das Doppelte der berechneten Zeiten angesetzt.

2. Die Gleichung (1) kann noch weiter vereinfacht werden, wenn man die Viskosität (η) und die Dichte (ρ_{aq}) der Lösung gleich der Viskosität und der Dichte von Wasser bei 25 °C setzt. Daraus folgt $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$.

Daraus ergibt sich die Zentrifugationszeit nach folgender Gleichung (2):

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. Aus Gleichung (2) wird ersichtlich, daß für die Festlegung der Zentrifugationsbedingungen, d.h. Zeit (t) und Geschwindigkeit (Upm), zwei Parameter von Bedeutung sind, um die Abtrennung von Partikeln mit einer bestimmten Größe zu erreichen (in unserem Fall $0,1 \mu\text{m}$ Radius): (1) die Dichte des Bodens und (2) die Länge des Gemischs im Zentrifugenglas ($R_b - R_t$), d.h. der Abstand, den ein Bodenpartikel vom oberen Ende der Lösung zum unteren Ende des Glases abdeckt; offenkundig hängt bei einem feststehenden Volumen die Länge des Gemischs im Glas vom Quadrat des Radius des Glases ab.

4. In Abb. 1 sind verschiedene Zentrifugationszeiten (t) in Abhängigkeit von der Zentrifugiergeschwindigkeit (Upm) für unterschiedliche Bodendichten (ρ_s) (Abb. 1a) und unterschiedliche Längen des Gemischs in den Zentrifugengläsern (Abb. 2a) dargestellt. Aus Abb. 1a geht der klare Einfluß der Bodendichte hervor. So beträgt die Zentrifugationszeit bei einer herkömmlichen Zentrifugation von 3000 Upm für $1,2 \text{ g cm}^{-3}$ Bodendichte annähernd 240 min, bei $2,0 \text{ g cm}^{-3}$ hingegen nur 50 min. Ebenso läßt sich an Abb. 1b ablesen, daß die Zentrifugationszeit für eine Länge des Gemischs von 10 cm etwa 50 min beträgt, bei einer Länge von 1 cm dagegen nur 7 min. In jedem Fall kommt es darauf an, ein optimales Verhältnis zwischen Zentrifugation, die die kleinstmögliche Länge erfordert, und einer einfachen Handhabung für den Experimentator bei der Abtrennung der Phase nach der Zentrifugation zu finden.

5. Darüber hinaus muß bei der Festlegung der Versuchsbedingungen für die Trennung von Boden/Lösungsphasen vor allem das mögliche Vorhandensein einer dritten "Pseudophase", der Kolloide, in Betracht gezogen werden. Diese Partikel, deren Größe unter $0,2 \mu\text{m}$ liegt, können einen erheblichen Einfluß auf den gesamten Adsorptionsmechanismus einer Substanz in einer Bodensuspension ausüben. Wird die Zentrifugation wie vorstehend beschrieben durchgeführt, verbleiben Kolloide in der wäßrigen Phase und werden gemeinsam mit der wäßrigen Phase analysiert. Dadurch gehen die Informationen über ihren Einfluß verloren.

Verfügt das ausführende Labor über Ultrazentrifugier- oder Ultrafiltriereinrichtungen, könnte die Adsorption/Desorption einer Substanz in Boden eingehender untersucht werden, z. B. die Adsorption der Substanz an den Kolloiden. In diesem Fall sollte eine Ultrazentrifugation von 60000 Upm/min bzw. eine Ultrafiltration mit einer Filterporosität von 100000 Dalton zur Anwendung kommen, um die drei Phasen Boden, Kolloide und Lösung zu trennen. Das Testprotokoll sollte ebenfalls entsprechend modifiziert werden, damit alle drei Phasen einer Substanzanalyse unterzogen werden.

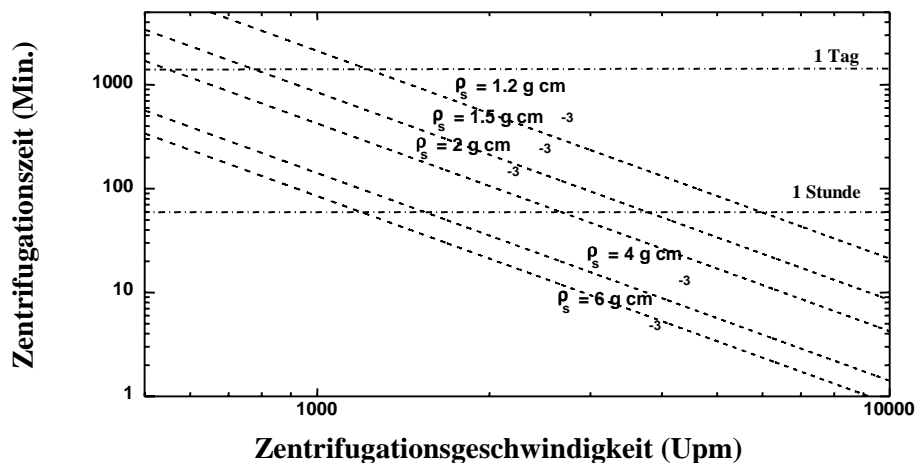


Abb. 1a. Variationen der Zentrifugationszeit (t) in Abhängigkeit von der Zentrifugiergeschwindigkeit (Upm) für unterschiedliche Bodendichten (ρ_s). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ bei 25°C .

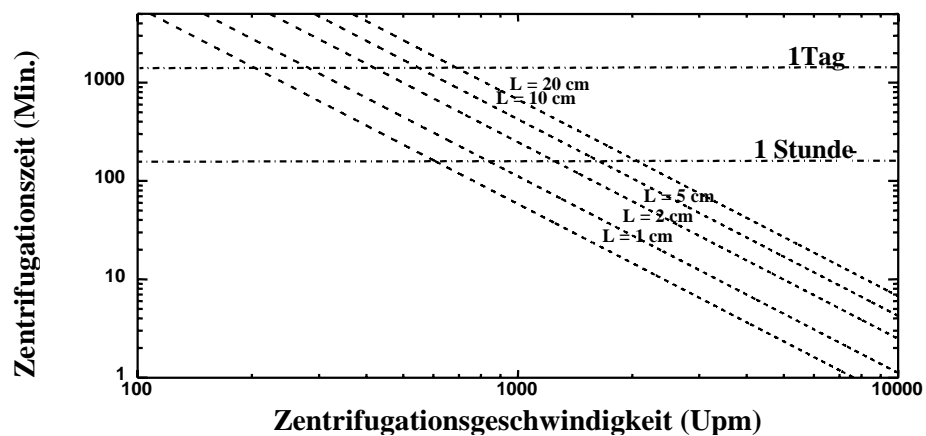
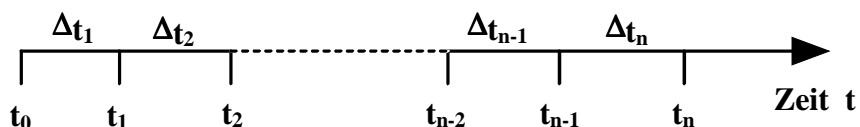


Abb. 1b. Variationen der Zentrifugationszeit (t) in Abhängigkeit von der Zentrifugiergeschwindigkeit (Upm) für unterschiedliche Längen des Gemischs im Zentrifugenglas ($R_b - R_t = L$; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ bei 25°C und $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

ANHANG 5

BERECHNUNG VON ADSORPTION A (%) UND DESORPTION D (%)

Die Zeitplanung des Ablaufs sieht wie folgt aus:



Für alle Berechnungen wird angenommen, daß die Testsubstanz stabil ist und nicht signifikant an den Behälterwänden adsorbiert.

ADSORPTION A (A%)

a) Gesamtbeprobungsmethode

Der Adsorptionsanteil wird für jedes Reagenzglas (i) zu jedem Zeitpunkt (t_i) nach folgender Gleichung berechnet:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (1)^4$$

Die Terme dieser Gleichung lassen sich wie folgt berechnen:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

Hierin bedeuten:

A_{t_i} = Adsorptionsanteil (%) zum Zeitpunkt t_i ;

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = Masse der Testsubstanz an Boden zum Zeitpunkt t_i , an dem die Analyse durchgeführt wird (μg);

m_0 = Masse Testsubstanz im Reagenzglas zu Beginn des Tests (μg);

C_0 = Anfangsmassenkonzentration der Testlösung in Kontakt mit dem Boden ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ = Massenkonzentration der Substanz in der wäßrigen Phase zur Zeit t_i , zu der die Analyse durchgeführt wird ($\mu\text{g cm}^{-3}$); diese Konzentration wird analytisch unter Berücksichtigung der anhand der Leerproben gewonnenen Werte bestimmt.

V_0 = Anfangsvolumen der Testlösung in Kontakt mit dem Boden (cm^3).

Die Werte des Adsorptionsanteils A_{t_i} bzw. $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ werden graphisch in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen, und die Zeit, nach der das Sorptionsgleichgewicht erreicht ist, wird bestimmt. Beispiele für solche graphischen Darstellungen sind die Abb. 1 und 2.

⁴ Gleichungen sowohl auf die direkte als auch auf die indirekte Methode anwendbar. Alle anderen Gleichungen gelten nur für die indirekte Methode.

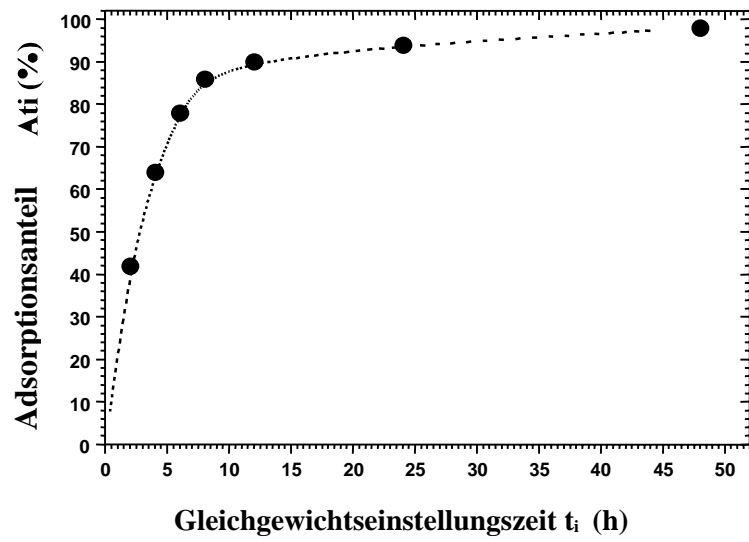


Abb. 1. Graphische Darstellung eines Adsorptionsgleichgewichts

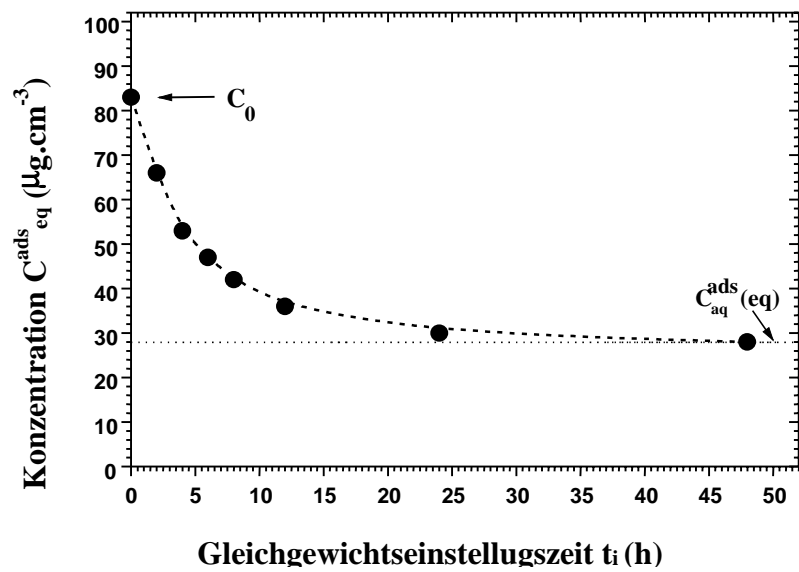


Abb. 2. Massenkonzentration der Testsubstanz in der wässrigen Phase (C_{aq}) in Abhängigkeit von der Zeit

b) Aliquotenbeprobungsmethode

Bei den folgenden Gleichungen wird in Rechnung gestellt, daß die Adsorptionsprozedur durch Messungen der Testsubstanz in kleinen Aliquoten der wäßrigen Phase in bestimmten Zeitintervallen ausgeführt wird.

- Während jedes Zeitintervalls wird die Menge der am Boden adsorbierten Substanz wie folgt berechnet:

- für das erste Zeitintervall $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a} \right) \quad (4)$$

- für das zweite Zeitintervall $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a} \right) \quad (5)$$

- für das dritte Zeitintervall $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a} \right) \quad (6)$$

- für das n^{ten} Zeitintervall $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a} \right) \quad (7)$$

- Der Adsorptionsanteil in jedem Zeitintervall, $A_{\Delta t_i}$, wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (8)^5$$

wohingegen der Adsorptionsanteil (A_{t_i}) zu einem Zeitpunkt t_i nach folgender Gleichung erhalten wird:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (9)^5$$

⁵ Gleichungen sowohl auf die direkte als auch auf die indirekte Methode anwendbar. Alle anderen Gleichungen gelten nur für die indirekte Methode.

Die Werte der Adsorption A_{t_i} bzw. $A_{\Delta t_i}$ (in bezug auf die Anforderungen der Untersuchung) werden graphisch in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen, und die Zeit, nach der das Sorptionsgleichgewicht eingestellt ist, wird bestimmt.

- Nach der Gleichgewichtszeit t_{eq} :

- ist die Masse der am Boden adsorbierten Testsubstanz:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^5$$

- ist die Masse der Testsubstanz in der Lösung:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^5$$

- und ist der Adsorptionsanteil bei Gleichgewicht:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)^5$$

Die vorstehend verwendeten Parameter werden wie folgt definiert:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = Masse der am Boden während der Zeitintervalle $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots$ bzw. Δt_n adsorbierten Substanz (μg);

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$ = Masse der in einer Aliquote v_a^A zu den Zeitpunkten t_1, t_2, \dots bzw. t_n gemessenen Substanz (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = Masse der am Boden bei Adsorptionsgleichgewicht adsorbierten Substanz (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = Masse der Substanz in der Lösung bei Adsorptionsgleichgewicht (μg);

v_a^A = Volumen der Aliquote, in der die Testsubstanz gemessen wird (cm^3);

$A_{\Delta t_i}$ = entsprechender Adsorptionsanteil in einem Zeitintervall Δt_i (%);

A_{eq} = Adsorptionsanteil bei Adsorptionsgleichgewicht (%).

DESORPTION D (%)

Als die Zeit t_0 , bei der das Desorptionskinetikexperiment beginnt, gilt der Augenblick, in dem das höchste erhaltene Volumen der Testsubstanzlösung (nach Einstellen des Adsorptionsgleichgewichts) durch ein identisches Volumen 0,01 M CaCl_2 -Lösung ersetzt wird.

a) Gesamtbeprobungsmethode

Zu einem Zeitpunkt t_i wird die Masse der Testsubstanz in der wäßrigen Phase gemessen, die aus dem Glas i (V_r^i) abgenommen wurde, und die desorbierte Masse wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Bei Desorptionsgleichgewicht ist $t_i = t_{Gl}$, und folglich ist $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Die Masse der während eines Zeitintervalls (Δt_i) desorbierten Testsubstanz wird durch folgende Gleichung erhalten:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Die Berechnung des Desorptionsanteils erfolgt:

- zu einem Zeitpunkt t_i aus der Gleichung:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (15)$$

- und während eines Zeitintervalls (Δt_i) aus der Gleichung:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (16)$$

Hierin bedeuten:

D_{t_i} = Desorptionsanteil zu einem Zeitpunkt t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = Desorptionsanteil entsprechend einem Zeitintervall Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = Masse der zu einem Zeitpunkt t_i desorbierten Testsubstanz (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = Masse der während eines Zeitintervalls Δt_i desorbierten Testsubstanz (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = Masse der zu einem Zeitpunkt t_i in einem Lösungsvolumen V_r^i analytisch gemessenen Testsubstanz, die zur Analyse abgenommen wird (μg);

m_{aq}^A = Masse der nach Adsorptionsgleichgewichtseinstellung infolge unvollständigen Volumenaustauschs verbleibenden Testsubstanz (μg);

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = Masse der Testsubstanz in der Lösung bei Adsorptionsgleichgewicht (μg);

V_{R} = Volumen des nach Erreichen des Adsorptionsgleichgewichts aus dem Glas abgenommenen und durch ein identisches Volumen 0,01 M CaCl_2 -Lösung ersetzten Überstandes (cm^3);

V_{T}^i = Volumen der im Desorptionskinetikversuch aus dem Glas (i) zur Messung der Testsubstanz abgenommenen Lösung (cm^3).

Die Desorptionswerte D_{t_i} bzw. $D_{\Delta t_i}$ (gemäß den Anforderungen der Untersuchung) werden graphisch in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen, und die Zeit, nach der das Desorptionsgleichgewicht erreicht wird, wird bestimmt.

b) Aliquotenbeprobungsmethode

Bei den nachstehenden Gleichungen wird in Rechnung gestellt, daß die zuvor ausgeführte Adsorptionsprozedur mittels Messung der Testsubstanz in kleinen Aliquoten (v_{a}^{A}) der wäßrigen Phase (Aliquotenbeprobungsmethode siehe Abschnitt 1.9 "Durchführung des Tests") ausgeführt wurde. Es wird angenommen, daß a) das Volumen des aus dem Glas nach dem Adsorptionskinetikversuch abgenommenen Überstandes durch ein identisches Volumen 0,01 M CaCl_2 -Lösung (V_{R}) ersetzt wurde, und daß b) das Gesamtvolumen der wäßrigen Phase in Kontakt mit dem Boden (V_{T}) während des Desorptionskinetikversuchs konstant bleibt und nach folgender Gleichung erhalten wird:

$$V_{\text{T}} = V_0 - \sum_{i=1}^n v_{\text{a}}^{\text{A}}(i) \quad (18)$$

Zu einem Zeitpunkt t_i :

- Die Masse der Testsubstanz wird in einer kleinen Aliquote (v_{a}^{D}) gemessen, und die desorbierte Masse wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{V_{\text{T}} - (i-1) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}}}{V_{\text{T}}} \right) \quad (19)$$

- Bei Desorptionsgleichgewicht ist $t_i = t_{\text{eq}}$, und folglich ist $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$.
- Der Desorptionsanteil D_{t_i} wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (20)$$

In einem Zeitintervall (Δt_i):

- Während jedes Zeitintervalls wird die Menge der desorbierten Substanz wie folgt berechnet:

— für das erste Zeitintervall $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad \text{und} \quad m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_1) = m_{\text{s}}^{\text{aq}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— für das zweite Zeitintervall $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) \quad \text{und}$$

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_2) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \left[m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) \right] \quad (22)$$

— für das n^{ten} Intervall $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-1) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-i) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \cdot m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right) \right]$$

$$\text{und } m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_n) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Abschließend wird der Desorptionsanteil für jedes Zeitintervall, $D_{\Delta t_i}$, nach folgender Gleichung berechnet:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (24)$$

wobei der Desorptionsanteil D_{t_i} zu einem Zeitpunkt t_i durch folgende Gleichung erhalten wird:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

Dabei werden die vorstehend eingesetzten Parameter wie folgt definiert:

$m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = Masse der nach den Zeitintervallen $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots$ bzw. Δt_n am Boden adsorbiert bleibenden Substanz (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = Masse der während der Zeitintervalle $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots$ bzw. Δt_n desorbierten Substanz (μg);

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$ = Masse der in einer Aliquote (v_a^D) zu den Zeitpunkten t_1, t_2, \dots bzw. t_n , gemessenen Substanz (μg);

V_T = Gesamtvolumen der wäßrigen Phase in Kontakt mit dem Boden während des nach der Aliquotenbeprobungsmethode durchgeführten Desorptionskinetikversuchs (cm^3);

m_{aq}^A = Masse der nach Adsorptionsgleichgewichtseinstellung infolge unvollständigen Volumenaustauschs verbliebenen Testsubstanz (μg);

$$m_{\text{aq}}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

V_R = Volumen des aus dem Glas nach Einstellen des Adsorptionsgleichgewichts abgenommenen und durch das identische Volumen 0,01 M CaCl_2 -Lösung ersetzten Überstandes (cm^3);

v_a^D = Volumen der während des nach der Aliquotenbeprobungsmethode durchgeführten Desorptionskinetikversuchs als Probe zu Analysezwecken aus dem Glas abgenommenen Aliquote (i) (cm^3);

$$v_a^D \leq 0.02 \cdot V_T \quad (27)$$

ANHANG 6

ADSORPTION-DESORPTION IN BÖDEN: DATENBERICHTSFORMULARE

Getestete Substanz:

Getesteter Boden:

Trockenmassegehalt des Bodens (105 °C, 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Eignung der Analysenmethode

Bodeneinwaage	µg	
Boden: Trockenmasse	µg	
Volumen CaCl ₂ -Lösung.	cm ³	
Nennkonz. fertige Lösung.	µg cm ⁻³	
Analysenkonz. fertige Lösung.	µg cm ⁻³	

Prinzip der zugrundeliegenden Analysenmethode:

Kalibrierung der Analysenmethode:

Getestete Substanz:

Getesteter Boden:

Trockenmassegehalt des Bodens (105 °C, 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Adsorptionstest: Leer- und Kontrollwerte

	Symbol	Einheiten	Leerwert		Leerwert		Kontrollwert	
Glas Nr.								
Bodeneinwaage	-	g					0	0
Wassermenge in Bodeneinwaage (rechnerisch)		cm ³					-	-
Volumen zugesetzter 0,01 M CaCl ₂ -Lösung		cm ³						
Volumen der zugesetzten Vorratslösung der Testsubstanz		cm ³	0	0				
Gesamtvolumen wäß. Phase (rechnerisch)		cm ³					-	-
Anfangskonzentration der Testsubstanz in wäßriger Phase		µg cm ⁻³						
Nach Schütteln und Zentrifugieren								
Konzentration in wäßriger Phase		µg cm ⁻³						

Hinweis: Falls erforderlich, können weitere Spalten angefügt werden

Getestete Substanz:

Getesteter Boden:

Trockenmassegehalt des Bodens (105 °C 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Massenbilanz

	Symbol	Einheiten				
Glas Nr.						
Bodeneinwaage	-	g				
Boden: Trockenmasse	m_{Boden}	g				
Wasservolumen in Bodeneinwaage (rechnerisch)	V_{WS}	ml				
Volumen 0,01 M CaCl_2 -Lösg. zur Gleichgewichtseinstellung des Bodens		ml				
Volumen der Vorratslösung		cm^3				
Gesamtvolumen der wäß. Phase in Kontakt mit Boden	V_0	cm^3				
Anfangskonzentration der Testlösung	C_0	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Gleichgewichtseinstellungszeit	-	h				
Nach Schütteln und Zentrifugieren₁						
Konzentr. Testsubst. Wäß. Phase bei Adsorptionsgleichgewicht Leerkorrektur berücksichtigt	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Gleichgewichtseinstellungszeit	t_{eq}	h				
Erste Verdünnung mit Lösungsmittel						
Abgenommenes Volumen wäß. Phase	V_{rec}	cm^3				
Zugesetztes Volumen Lösungsmittel	ΔV	cm^3				
Erste Extraktion mit Lösungsmittel						
Signalanalysiert in Lösungsmittel	S_{E1}	var.				
Konz. Testsubst. in Lösungsmittel	C_{E1}	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Masse der aus Boden und von Gefäßwänden extrahierten Substanz	m_{E1}	μg				
Zweite Verdünnung mit Lösungsmittel						
Abgenommenes Volumen Lösungsmittel	ΔV_s	cm^3				
Zugesetztes Volumen Lösungsmittel	$\Delta V'$	cm^3				
Zweite Extraktion mit Lösungsmittel						
Signalanalysiert in Lösungsmittelphase	S_{E2}	var.				
Konz. Testsubst. in Lösungsmittel	C_{E2}	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Masse der aus Boden und von Gefäßwänden extrahierten Substanz	m_{E2}	μg				
Gesamtmasse Testsubst. extrahiert in zwei Schritten	m_{E}	μg				
Massenbilanz	MB	%				

Getestete Substanz:

Getesteter Boden:

Trockenmassegehalt des Bodens (105 °C, 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Adsorptionsisothermen

	Symbol	Einheiten								
Glas Nr.										
Bodeneinwaage	-	g								
Boden: Trockenmasse	E	g								
Wasservolumen in Bodeneinwaage (rechnerisch)	V_{ws}	cm^3								
Volumen 0,01 M CaCl ₂ -Lösung zur Gleichgewichtseinstellung des Bodens		cm^3								
Volumen zugesetzter Vorratslösung		cm^3								
Gesamtvolumen wäß. Phase in Kontakt mit Boden (rechnerisch)	V_0	cm^3								
Konzentration. Lösung	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Gleichgewichtseinstell.-zeit	-	h								
Nach Schütteln und Zentrifugieren										
Konzentration Subst. wäß. Phase Leerkorrektur berücksichtigt	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Temperatur		°C								
Adsorb. Masse je Einheit Boden	$C_s^{ads}(eq)$	$\mu g\ g^{-1}$								

Regressionsanalyse:

Wert von K_F^{ads} :

Wert von l/n :

Regressionskoeffizient r^2 :

Getestete Substanz:

Getesteter Boden:

Trockenmassegehalt des Bodens (105 °C, 12 h):.....%

Temperatur:.....°C

Zugrundeliegende Analysenmethodik: Indirekt Gesamt Aliquoten

Desorptionstest

	Symbol	Einheiten	Zeit-intervall	Zeit-intervall	Zeit-intervall	Zeit-intervall
Glas Nr. aus dem Adsorptionsschritt						
Masse von an Boden bei Adsorptionsgleichgewicht adsorbierter Substanz	$m_s^{ads} (eq)$	μg				
Abgenommenes Volumen wäß. Phase, ersetzt durch 0,01 M CaCl ₂	V_R	cm^3				
Gesamtvolumen wäß. Phase in Kontakt mit Boden	GM V_0	cm^3				
	AM V_T	cm^3				
Masse der nach Adsorptionsgleichgewichtseinstellung infolge unvollst. Volumenaustauschs verbliebenen Testsubstanz	m_{aq}^A	μg				
Desorptionskinetik						
Gemessene Masse von aus Boden zur Zeit t_i desorbierter Substanz	$m_m^{des} (t_i)$	μg				
Volumen der abgenommenen Lösung aus dem Glas (i) zur Messung der Testsubstanz	GM V_R^i	cm^3				
	AM v_a^D	cm^3				
Masse der aus Boden zur Zeit t_i desorbierten Substanz (rechnerisch)	$m_{aq}^{des} (t_i)$	μg				
Masse der aus Boden im Zeitintervall Δt_i desorbierten Substanz (rechnerisch)	$m_{aq}^{des} (\Delta t_i)$	μg				
Desorptionsanteil						
Desorption zur Zeit t_i	D_{t_i}	%				
Desorption im Zeitintervall Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Scheindesorptionskoeffizient	K_{des}					

GM: Gesamtbeprobungsmethode
AM: Aliquotenbeprobungsmethode

C.19. SCHÄTZUNG DES ADSORPTIONSKOEFFIZIENTEN (K_{oc}) IM BODEN UND IN KLÄRSCHLAMM MITTELS DER HOCHDRUCK-FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE (HPLC)

1. METHODE

Diese Methode entspricht der OECD TG121 (2000).

1.1 EINLEITUNG

Das Sorptionsverhalten von Stoffen in Böden oder Klärschlämmen kann anhand von Parametern beschrieben werden, die experimentell mittels der Testmethode C18 bestimmt werden. Ein wichtiger Parameter ist der Adsorptionskoeffizient, der als das Verhältnis zwischen der Konzentration des Stoffs im Boden/Klärschlamm und der Konzentration des Stoffs in der wässrigen Phase im Adsorptionsgleichgewicht definiert wird. Der aufgrund des Gehalts des Bodens an organischem Kohlenstoff genormte Adsorptionskoeffizient, K_{oc} , ist ein nützlicher Indikator für die Fähigkeit eines chemischen Stoffs zur Bindung an organischen Stoff im Boden oder Klärschlamm und gestattet Vergleiche zwischen unterschiedlichen Chemikalien. Dieser Parameter kann durch Korrelation mit der Wasserlöslichkeit und dem Verteilungskoeffizienten n-Octanol/Wasser geschätzt werden (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Die in diesem Test beschriebene Versuchsmethode wendet für die Schätzung des Adsorptionskoeffizienten K_{oc} im Boden und in Klärschlamm die HPLC an (8). Die Schätzwerte sind verlässlicher als die der QSAR-Berechnungen (9). Als Schätzmethode kann sie die in der Test-Methode C.18 verwendeten *Batch equilibrium*-Experimente nicht vollständig ersetzen. Jedoch kann der geschätzte K_{oc} für die Auswahl geeigneter Testparameter für Adsorptions-/Desorptionsstudien gemäß der Testmethode C18 durch Berechnung von K_d (Verteilungskoeffizient) oder K_f (Adsorptionskoeffizient nach Freundlich) nach der Gleichung 3 (siehe Abschnitt 1.2) nützlich sein.

1.2 DEFINITIONEN

K_d : Der Verteilungskoeffizient Feststoff/Wasser wird als das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen C einer gelösten Testsubstanz in einem zweiphasigen System, das aus einem Sorptionsmittel (Boden oder Klärschlamm) und einer wässrigen Phase besteht, definiert; er ist eine reine Zahl, wenn Konzentrationen in beiden Phasen in Gewicht/Gewicht ausgedrückt sind. Wird die Konzentration in der wässrigen Phase in Gewicht/Volumen ausgedrückt, sind die Einheiten $\text{ml}\cdot\text{g}^{-1}$. K_d kann je nach den Eigenschaften des Sorptionsmittels unterschiedlich und auch konzentrationsabhängig sein.

$$K_d = \frac{C_{\text{soil}}}{C_{\text{aq}}} \text{ or } \frac{C_{\text{sludge}}}{C_{\text{aq}}} \quad (1)$$

dabei ist:

C_{soil} = Konzentration der Testsubstanz im Boden im Gleichgewichtszustand ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
 C_{sludge} = Konzentration der Testsubstanz im Klärschlamm im Gleichgewichtszustand ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
 C_{aq} = Konzentration der Testsubstanz in der wässrigen Phase im Gleichgewichtszustand ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$).

K_f : Der Adsorptionskoeffizient nach Freundlich wird definiert als die Konzentration der Testsubstanz im Boden oder im Klärschlamm (x/m), wenn die Gleichgewichtskonzentration C_{aq} in der wässrigen Phase gleich eins ist; er wird in µg·g⁻¹Sorptionsmittel ausgedrückt. Sein Wert kann je nach den Eigenschaften des Sorptionsmittels unterschiedlich sein.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

dabei ist:

x/m = die im Gleichgewichtszustand an eine Menge Sorptionsmittel m (g) adsorbierte Menge der Testsubstanz x (µg)

1/n = Neigung der Adsorptionsisotherme nach Freundlich

C_{aq} = Konzentration der Testsubstanz in wässriger Phase im Gleichgewichtszustand (µg · ml⁻¹)

$$\text{Bei } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc}: Ist der aufgrund des organischen Kohlenstoffgehalts (f_{oc}) eines Sorptionsmittels genormte Verteilungskoeffizient (K_d) oder Adsorptionskoeffizient nach Freundlich (K_f); dieser Koeffizient ist insbesondere für nicht ionisierte Chemikalien ein ziemlich genauer Indikator für den Grad der Adsorption eines Stoffes an das Sorptionsmittel und ermöglicht Vergleiche zwischen verschiedenen Chemikalien. Je nach den Meßgrößen von K_d und K_f kann K_{oc} eine reine Zahl sein oder in ml · g⁻¹ oder µg · g⁻¹ organische Stoffe ausgedrückt werden.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} (\text{dimensionslos oder ml} \cdot \text{g}^{-1}) \text{ oder } \frac{K_f}{f_{oc}} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (3)$$

Das Verhältnis zwischen K_{oc} und K_d ist nicht immer linear, daher können K_{oc}-Werte auch je nach Bodentyp variieren, doch ist ihre Variabilität im Vergleich zu den K_d-oder K_f-Werten viel geringer. Der Adsorptionskoeffizient (K_{oc}) wird von dem Kapazitätsfaktor (k') mittels einer Eichkurve log k'/log K_{oc} der ausgewählten Referenzverbindungen hergeleitet.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

dabei ist:

t_R : HPLC-Retentionszeit der Test- und Referenzsubstanz (Minuten)

t₀ : HPLC-Totzeit (Minuten) (siehe Abschnitt 1.8.2).

P_{ow} : Der Verteilungskoeffizient Octanol/Wasser wird definiert als das Verhältnis der Konzentrationen gelöster Stoffe in n-Octanol und Wasser; er ist eine reine Zahl.

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

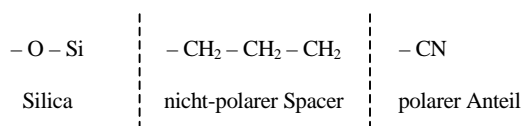
1.3 REFERENZSUBSTANZEN

Die Strukturformel, die Reinheit und die Dissoziationskonstante (sofern zutreffend) sollten vor Anwendung der Methode bekannt sein. Informationen über die Löslichkeit in Wasser und organischen Lösemitteln, über den Trennungskoeffizienten Octanol/Wasser und über Hydrolyse-Merkmale sind nützlich.

Um die gemessenen HPLC-Retentionsdaten einer Testsubstanz mit ihrem Adsorptionskoeffizienten K_{oc} zu korrelieren, muß eine Eichkurve $\log K_{oc}/\log k'$ erstellt werden. Mindestens sechs Referenzpunkte sollten verwendet werden, davon zumindest einer über und einer unter dem erwarteten Wert der Testsubstanz. Die Genauigkeit der Methode wird erheblich verbessert, wenn Referenzsubstanzen verwendet werden, die von der Struktur her mit der Testsubstanz verwandt sind. Liegen derartige Daten nicht vor, muß der Anwender die geeigneten Eichsubstanzen selbst auswählen. In diesem Fall sollte eine allgemeinere Reihe von strukturell heterogenen Stoffen gewählt werden. Empfohlene Referenzsubstanzen und ihre K_{oc} -Werte sind in den Tabellen 1 und 3 des Anhangs aufgelistet. Die Wahl anderer Eichsubstanzen ist zu begründen.

1.4 PRINZIP DER TESTMETHODE

Die HPLC wird auf Analysensäulen durchgeführt, die mit im Handel erhältlicher Cyanopropyl-Festphase mit lipophilen und polaren Anteilen gefüllt sind. Ferner wird eine gemäßigt polare stationäre Phase auf der Grundlage einer Silica-Matrix verwendet:



Das Prinzip der Testmethode ist ähnlich wie bei der Testmethode A.8 (Verteilungskoeffizient, HPLC-Methode). Während die Testsubstanz die Säule mit der mobilen Phase passiert, steht die Testsubstanz zu der stationären Phase in einer Wechselwirkung. Durch die Trennung zwischen der mobilen und der stationären Phase wird die Testsubstanz verzögert. Die Ambivalenz der stationären Phase mit polaren und nicht polaren Verbindungsstellen ermöglicht eine ähnliche Wechselwirkung zwischen polaren und nicht polaren Gruppen eines Moleküls wie bei organischen Stoffen in Boden- oder Klärschlamm-Matrizen. Dies ermöglicht die Feststellung des Verhältnisses zwischen der Retentionszeit auf der Säule und dem Koeffizienten der Adsorption durch organischen Stoff.

Der pH-Wert hat insbesondere bei polaren Substanzen einen signifikanten Einfluß auf das Sorptionsverhalten. Bei landwirtschaftlichen Böden oder Behältern von Klärschlammbehandlungsanlagen schwankt der pH-Wert normalerweise zwischen 5,5 und 7,5. Für ionisierbare Stoffe sind zwei Tests mit sowohl ionisierten als auch nicht ionisierten Formen in geeigneten Pufferlösungen durchzuführen, jedoch nur in Fällen, in denen zumindest 10 % der Testverbindung bei pH-Werten zwischen 5,5 und 7,5 dissoziiert vorliegen.

Da die Bewertung ausschließlich aufgrund der Relation zwischen der Retention in der HPLC-Säule und dem Adsorptionskoeffizienten erfolgt, ist keine quantitative Analyseverfahren, sondern nur eine Bestimmung der Retentionszeit erforderlich. Sofern eine Reihe geeigneter Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen und die Versuche unter Standardbedingungen durchgeführt werden können, bietet die Methode einen schnellen und wirksamen Weg zur Schätzung des Adsorptionskoeffizienten K_{oc} .

Die HPLC-Methode ist auf (markierte oder nicht markierte) Chemikalien anwendbar, für die ein geeignetes Detektionssystem (z. B. Spektrophotometer, Radioaktivitätsanzeiger) zur Verfügung steht und die für die Dauer des Tests stabil genug sind. Die Methode kann insbesondere für Chemikalien brauchbar sein, deren Untersuchung in anderen Versuchssystemen schwierig ist (d. h. flüchtige Stoffe; Stoffe, die in Wasser in einer analytisch meßbaren Konzentration nicht löslich sind; Stoffe mit einer starken Affinität gegenüber der Oberfläche von Inkubationssystemen). Die Methode kann auf Mischungen angewendet werden, die nicht aufgelöste Elutionsbänder ergeben. In einem solchen Fall sind die Ober- und Untergrenzen der $\log K_{oc}$ -Werte der Verbindungen der Testmischung anzugeben.

Zwar können Unreinheiten zuweilen zu Problemen bei der Interpretation der HPLC-Ergebnisse führen, doch sind sie von geringerer Bedeutung, solange die Testsubstanz auf analytischem Wege identifiziert und von den Unreinheiten getrennt werden kann.

Die Methode ist mit den in Tabelle 1 des Anhangs aufgelisteten Stoffen validiert worden und wurde auch auf verschiedene andere Chemikalien angewandt, die zu den folgenden Chemikalienklassen gehören:

- aromatische Amine (z. B. Trifluralin, 4-Chloranilin, 3,5-Dinitroanilin, 4-Methylanilin, N-Methylanilin, 1-naphthylamin);
- aromatische Carbonsäureester (z.B. Benzoesäuremethylester, 3,5-Dinitrobenzoesäureethylester);
- aromatische Kohlenwasserstoffe (z.B. Toluol, Xylol, Ethylbenzol, Nitrobenzol);
- Aryloxyphenoxypropionsäureester (z.B. Diclofop-methyl, Fenoxaprop-ethyl, Fenoxaprop-P-ethyl);
- Benzimidazol- und Imidazol-Fungizide (z.B. Carbendazim, Fuberidazol, Triazoxid);
- Carbonsäureamide (z.B. 2-Chlorbenzamid, N,N-Dimethylbenzamid, 3,5-Dinitrobenzamid, N-Methylbenzamid, 2-Nitrobenzamid, 3-Nitrobenzamid);
- Chlorkohlenwasserstoffe (z.B. Endosulfan, DDT, Hexachlorbenzol, Quintozen, 1,2,3-Trichlorbenzol);
- phosphororganische Insektizide (z.B. Azinphos-methyl, Disulfoton, Fenamiphos, Isfenphos, Pyrazophos, Sulprofos, Triazophos);
- Phenole (z.B. Phenol, 2-Nitrophenol, 4-Nitrophenol, Pentachlorphenol, 2,4,6-Trichlorphenol, 1-Naphthol);
- Phenylharnstoffderivative (z.B. Isoproturon, Monolinuron, Pencycuron);
- Pigmentfarbstoffe (z.B. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
- polyaromatische Kohlenwasserstoffe (z.B. Acenaphthen, Naphthalin);
- 1,3,5-Triazin-Herbizide (z.B. Prometryn, Propazin, Simazin, Terbutryn);
- Triazolderivate (z.B. Tebuconazol, Triadimefon, Tradimenol, Triapenthenol).

Die Methode ist nicht auf Stoffe anwendbar, die entweder mit dem Eluenten oder der stationären Phase reagieren. Ferner ist sie nicht auf Stoffe anwendbar, die in einer spezifischen Wechselwirkung mit anorganischen Verbindungen stehen (z.B. Bildung von Clusterkomplexen mit Tonmineralien). Es ist möglich, daß sich die Methode nicht für oberflächenaktive Stoffe, anorganische Verbindungen und gemäßigt oder stark organische Säuren und Basen eignet. $\log K_{oc}$ -Werte im Bereich 1,5 bis 5,0 können bestimmt werden. Ionisierbare Stoffe müssen mittels einer gepufferten mobilen Phase gemessen werden, doch ist darauf zu achten, daß eine Präzipitation von Pufferkomponenten oder der Testsubstanz vermieden wird.

1.6 QUALITÄTSKRITERIEN

1.6.1 Genauigkeit

Normalerweise kann der Adsorptionskoeffizient einer Testsubstanz auf +/- 0,5 log. Einheiten des Werts geschätzt werden, der nach der *Batch equilibrium*-Methode (siehe Tabelle 1 des Anhangs) bestimmt wird. Größere Genauigkeit kann erzielt werden, wenn die verwendeten Referenzsubstanzen von der Struktur her mit der Testsubstanz verwandt sind.

1.6.2 Wiederholbarkeit

Die Bestimmungen müssen mindestens doppelt durchgeführt werden. Die von Einzelmessungen hergeleiteten log K_{oc} -Werte müssen innerhalb von 0,25 log. Einheiten liegen.

1.6.3 Reproduzierbarkeit

Die bisher mit der Methode gewonnenen Erfahrungen sprechen für ihre Validität. Eine Prüfung der HPLC-Methode, bei der 48 Stoffe (zumeist Pestizide) verwendet wurden, für die verlässliche Daten über K_{oc} in Böden vorlagen, ergab einen Korrelationskoeffizienten von = 0,95 (10) (11).

Ein Ringversuch mit 11 teilnehmenden Laboratorien wurde durchgeführt, um die Methode zu verbessern und zu validieren (12). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 des Anhangs enthalten.

1.7 BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.7.1 Vorbereitende Schätzung des Adsorptionskoeffizienten

Der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient P_{ow} (= K_{ow}) und in bestimmtem Maße die Wasserlöslichkeit können als Indikatoren für den Adsorptionsgrad, insbesondere für nicht ionisierte Stoffe dienen und können somit zur Bereichsfindung verwendet werden. Für verschiedene Gruppen von Chemikalien wurden eine Reihe nützlicher Korrelationen veröffentlicht (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2 Geräte

Erforderlich ist ein Flüssig-Chromatograph, der mit einer impulsfreien Pumpe und einem geeigneten Detektor ausgerüstet ist. Es wird empfohlen, ein Injektionsventil mit einer Injektionsschleife zu verwenden. Ferner ist ein im Handel erhältliches chemisch gebundenes Cyanpropylharz auf Silica-Basis (z.B. Hypersil und Zorbax CN) zu verwenden. Eine Vorsäule mit demselben Material kann zwischen dem Injektionssystem und der Analysensäule platziert werden. Säulen unterschiedlicher Lieferanten können hinsichtlich der Trennwirkung sehr unterschiedlich sein. Als Richtschnur müssen folgende Kapazitätsfaktoren k' erzielt werden: $\log k' > 0,0$ für $\log K_{oc} = 3,0$ und $\log k' > -0,4$ für $\log K_{oc} = 2,0$ bei Verwendung von Methanol/Wasser 55/45 % als mobile Phase.

1.7.3 **Mobile Phasen**

Von den verschiedenen mobilen Phasen, die getestet wurden, werden folgende zwei empfohlen:

- Methanol/Wasser (55/45 % v/v)
- Methanol/0,01M Citratpuffer pH 6,0 (55/45% v/v)

Zur Herstellung der Eluierflüssigkeit sind Methanol von HPLC-Qualität und destilliertes Wasser oder Citratpuffer zu verwenden. Das Gemisch wird vor der Verwendung entgast. Es empfiehlt sich, eine isokratische Elution anzuwenden. Wenn das Methanol/Wasser-Gemisch nicht geeignet ist, können andere Gemische aus organischen Lösemitteln und Wasser, z. B. Ethanol/Wasser- oder Acetonitril/Wasser-Gemische versucht werden. Für ionisierende Verbindungen wird die Verwendung einer Pufferlösung zur pH-Stabilisierung empfohlen. Es ist darauf zu achten, dass Salzniederschlag/Salzpräzipitation und eine Säulenverschlechterung vermieden werden, die bei einigen organische Phase/Puffer-Gemischen auftreten können.

Es dürfen keine Zusätze, wie Ionenpaar-Reagenzien verwendet werden, weil sie die Sorptionseigenschaften der stationären Phase beeinträchtigen können. Derartige Veränderungen der stationären Phase können irreversibel sein. Aus diesem Grunde ist es unbedingt erforderlich, daß Versuche, bei denen Zusätze verwendet werden, an getrennten Säulen durchgeführt werden.

1.7.4 **Gelöste Stoffe**

Test- und Referenzsubstanzen sollten in der mobilen Phase gelöst werden.

1.8 DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1.8.1 **Testbedingungen**

Die Temperatur während der Messungen sind aufzuzeichnen. Für das Säulenkompartiment wird eine Temperaturregelung sehr empfohlen, um konstante Bedingungen während der Eichung und Schätzung sowie der Messung der Testsubstanz zu gewährleisten.

1.8.2 **Bestimmung der Totzeit t_0**

Für die Bestimmung der Totzeit t_0 können zwei unterschiedliche Methoden angewendet werden (siehe auch Abschnitt 1.2).

1.8.2.1 *Bestimmung der Totzeit t_0 durch eine homologe Reihe*

Es hat sich herausgestellt, daß dieses Verfahren verlässliche und standardisierte t_0 -Werte ergibt. Für weitere Einzelheiten siehe Testmethode A.8: Verteilungskoeffizient (n-Octanol/Wasser), HPLC-Methode.

1.8.2.2 *Bestimmung der Totzeit t_0 durch inerte Stoffe, bei denen keine Retention durch die Säule auftritt*

Diese Technik basiert auf der Injektion von Formamid-, Harnstoff- oder Natriumnitratlösungen. Die Messungen sollten zumindest doppelt ausgeführt werden.

1.8.3 **Bestimmung der Retentionszeiten t_R**

Referenzsubstanzen sind gemäß der Beschreibung in Abschnitt 1.3 auszuwählen. Sie können zur Bestimmung ihrer Retentionszeiten als gemischter Standard injiziert werden, sofern bestätigt worden ist, daß die Retentionszeiten der einzelnen Referenzstandards nicht durch das Vorhandensein der anderen Referenzstandards beeinflußt werden. Die Eichung muß in regelmäßigen Abständen mindestens zweimal täglich erfolgen, um unerwarteten Veränderungen in der Leistung der Säule Rechnung zu tragen. Die Injektionen sind vorzugsweise vor und nach den Injektionen der Testsubstanz durchzuführen, um sicher zu sein, daß die Retentionszeiten unverändert sind. Die Testsubstanzen werden getrennt in möglichst kleinen Dosen injiziert (um ein Überladen der Säule zu vermeiden), dann werden ihre Retentionszeiten bestimmt.

Um die Verlässlichkeit der Messung zu erhöhen, sind sie zumindest doppelt durchzuführen. Die von Einzelmessungen hergeleiteten $\log K_{oc}$ -Werte müssen im Bereich von 0,25 \log Einheiten liegen.

1.8.4 **Bewertung**

Die Kapazitätsfaktoren k' werden aus der Totzeit t_0 und den Retentionszeiten t_R der gewählten Testsubstanzen nach der Formel 4 (siehe Abschnitt 1.2) berechnet. Die $\log k'$ -Daten der Referenzsubstanzen werden daraufhin gegen ihre in den Tabellen 1 und 3 des Anhangs genannten $\log K_{oc}$ -Werte aus den *Batch equilibrium*-Experimenten aufgetragen. Mit Hilfe dieser Kurve wird der $\log k'$ -Wert einer Testsubstanz zur Bestimmung ihres $\log K_{oc}$ -Wertes verwendet. Wenn die tatsächlichen Werte zeigen, daß der $\log K_{oc}$ der Testsubstanz außerhalb des Eichbereichs liegt, ist der Test unter Verwendung anderer geeigneterer Referenzsubstanzen zu wiederholen.

2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

Der Bericht muß folgende Informationen enthalten:

- Identität, Reinheit und gegebenenfalls pK_a -Werte von Test- und Referenzsubstanzen;
- Beschreibung der Apparatur und der Betriebsbedingungen, z.B. Typ und Abmessung der Analysensäule (sowie Vorsäule), Detektionsvorrichtung, mobile Phase (Verhältnis zwischen Bestandteilen und pH-Wert), Temperaturbereich während der Messungen;
- Totzeit und die für ihre Bestimmung angewandte Methode;
- Mengen der in die Säule eingebrachten Test- und Referenzsubstanzen;
- Retentionszeiten der für die Eichung verwendeten Referenzverbindungen;
- Einzelheiten der angepaßten Regressionslinie ($\log k'/\log K_{oc}$) und grafische Darstellung der Regressionslinie;
- durchschnittliche Retentionsdaten und geschätzter $\log K_{oc}$ -Wert der Testverbindung;
- Chromatogramme.

3. **LITERATUR**

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1-67.
- (3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.
- (4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297-312.
- (6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, 831-832.
- (7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, 833-846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere , 35(1/2), 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), 2493-2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, 285-304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

ANHANG

Tabelle 1

Vergleich von K_{oc} -Werten für Böden und Klärschlämme, und mittels der HPLC-Screeningmethode^{1,2} berechneten Werten

Stoffe	CAS-No.	log K_{oc} Klär- schlamm	log K_{oc} HPLC	Δ	log K_{oc} Böden	log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazin	1912-24-9	1.66	2.14	0.48	1.81	2.20	0.39
Linuron	330-55-2	2.43	2.96	0.53	2.59	2.89	0.30
Fenthion	55-38-9	3.75	3.58	0.17	3.31	3.40	0.09
Monuron	150-68-5	1.46	2.21	0.75	1.99	2.26	0.27
Phenanthren	85-01-8	4.35	3.72	0.63	4.09	3.52	0.57
Benzoessäurephenylester	93-99-2	3.26	3.03	0.23	2.87	2.94	0.07
Benzamid	55-21-0	1.60	1.00	0.60	1.26	1.25	0.01
4-nitrobenzamid	619-80-7	1.52	1.49	0.03	1.93	1.66	0.27
Acetanilid	103-84-4	1.52	1.53	0.01	1.26	1.69	0.08
Anilin	62-53-3	1.74	1.47	0.27	2.07	1.64	0.43
2,5-Dichloranilin	95-82-9	2.45	2.59	0.14	2.55	2.58	0.03

¹ W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121 - 128.

² W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107 - 119.

Tabelle 2

Ergebnisse eines Ringversuchs (11 teilnehmende Laboratorien) zur Verbesserung und Validierung der HPLC-Methode¹

Stoff	CAS-No.	log K_{oc} [OECD 106]	K_{oc}	log K_{oc}
			[HPLC-Methode]	
Atrazin	1912-24-9	1.81	78 ± 16	1.89
Monuron	150-68-5	1.99	100 ± 8	2.00
Triapenthenol	77608-88-3	2.37	292 ± 58	2.47
Linuron	330-55-2	2.59	465 ± 62	2.67
Fenthion	55-38-9	3.31	2062 ± 648	3.31

¹ W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

Tabelle 3

**Empfohlene Referenzsubstanzen für die HPLC-Screeningmethode
auf der Grundlage von Bodenadsorptionsdaten**

Referenzsubstanz	CAS-No.	durchschn. log K _{oc} - Werte vom Chargen- Gleichgewicht	Anzahl K _{oc} - Daten	log S.D.	Quelle
Acetanilid	103-84-4	1.25	4	0.48	a
Phenol	108-95-2	1.32	4	0.70	a
2-Nitrobenzamid	610-15-1	1.45	3	0.90	b
N,N-Dimethylbenzamid	611-74-5	1.52	2	0.45	a
4-Methylbenzamid	619-55-6	1.78	3	1.76	a
Methylbenzoat	93-58-3	1.80	4	1.08	a
Atrazin	1912-24-9	1.81	3	1.08	c
Isoproturon	34123-59-6	1.86	5	1.53	c
3-Nitrobenzamid	645-09-0	1.95	3	1.31	b
Anilin	62-53-3	2.07	4	1.73	a
3,5-Dinitrobenzamid	121-81-3	2.31	3	1.27	b
Carbendazim	10605-21-7	2.35	3	1.37	c
Triadimenol	55219-65-3	2.40	3	1.85	c
Triazoxid	72459-58-6	2.44	3	1.66	c
Triazophos	24017-47-8	2.55	3	1.78	c
Linuron	330-55-2	2.59	3	1.97	c
Naphthalin	91-20-3	2.75	4	2.20	a
Endosulfan-diol	2157-19-9	3.02	5	2.29	c
Methiocarb	2032-65-7	3.10	4	2.39	c
Acid Yellow 219	63405-85-6	3.16	4	2.83	a
1,2,3-trichlorobenzen	87-61-6	3.16	4	1.40	a
γ-HCH	58-89-9	3.23	5	2.94	a
Fenthion	55-38-9	3.31	3	2.49	c
Direct Red 81	2610-11-9	3.43	4	2.68	a
Pyrazophos	13457-18-6	3.65	3	2.70	c
α-Endosulfan	959-98-8	4.09	5	3.74	c
Diclofop-methyl	51338-27-3	4.20	3	3.77	c
Phenanthren	85-01-8	4.09	4	3.83	a
Basic Blue 41 (mix)	26850-47-5 12270-13-2	4.89	4	4.46	a
DDT	50-29-3	5.63	1	–	b

/a/ W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).

/b/ B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.

/c/ Von der Industrie vorgelegte Daten.

C.20 DAPHNIA MAGNA, REPRODUKTIONSTEST

1. METHODE

Diese Methode zur Prüfung der Reproduktionstoxizität entspricht der OECD TG 211 (1998).

1.1 EINLEITUNG

Die primäre Zielsetzung der Prüfung besteht darin, die Wirkung von Chemikalien auf die Reproduktionsleistung der *Daphnia magna* zu bestimmen.

1.2 DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Elterntiere: Dies sind diejenigen weiblichen Daphnien, die zu Beginn der Prüfung vorhanden sind und deren Reproduktionsleistung in der Prüfung untersucht werden soll.

Nachkommen: Dies sind die jungen *Daphnien*, die von den Elterntieren im Verlauf der Prüfung produziert werden.

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): Dies ist die niedrigste geprüfte Dosiskonzentration, bei der sich eine statistisch signifikante Wirkung auf die Reproduktion und die Mortalität der Elterntiere (bei $p < 0,05$) im Vergleich zu der Kontrolle innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums beobachten läßt. Alle Prüfkonzentrationen oberhalb der LOEC müssen jedoch eine schädigende Wirkung haben, die gleich den bei der LOEC beobachteten Wirkungen oder größer als diese ist. Können diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden, muß ausführlich erklärt werden, wie die LOEC (und damit auch die NOEC) ausgewählt wurde.

No Observed Effect Concentration (NOEC): Dies ist die Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, bei der im Vergleich zu der Kontrolle innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$) vorliegt.

EC_x: Dies ist die Konzentration der in Wasser gelösten Prüfsubstanz, die zu einer Verringerung der Reproduktion der *Daphnia magna* um x Prozent innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums führt.

Immanente Wachstumsrate: Dies ist ein Maß für das Wachstum der Population, welches die Reproduktionsleistung und die altersspezifische Mortalität mit einbezieht (20) (21) (22). In stabilen Populationen ist die immanente Wachstumsrate gleich null. Bei wachsenden Populationen ist sie positiv, und bei schrumpfenden Populationen ist sie negativ. Letztere kann eindeutig keine Erhaltung der Art ermöglichen und führt schließlich zum Aussterben.

Nachweisgrenze: Dies ist die niedrigste Konzentration, die nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden kann.

Bestimmungsgrenze: Dies ist die niedrigste Konzentration, die quantitativ gemessen werden kann.

Mortalität: Ein Tier wird als tot protokolliert, wenn es unbeweglich ist, d. h., wenn es nicht schwimmen kann oder sich keine Bewegungen von Anhängseln oder Postabdomen innerhalb von 15 Sekunden nach vorsichtigem Hin- und Herbewegen des Prüfbehälters beobachten lassen. (Wird eine andere Definition herangezogen, muß diese zusammen mit dem dazugehörigen Literaturhinweis angegeben werden.)

1.3 PRINZIP DER METHODE

Junge weibliche *Daphnien* (die Elterntiere), die zu Beginn der Prüfung weniger als 24 Stunden alt sind, werden der dem Wasser in verschiedenen Konzentrationen zugesetzten Prüfsubstanz ausgesetzt. Die Dauer der Prüfung beträgt 21 Tage. Am Ende der Prüfung wird die gesamte Anzahl an lebenden Nachkommen, die von den am Ende der Prüfung noch lebenden Elterntieren produziert wurden, bewertet. Dies bedeutet, daß Jungtiere, die von erwachsenen Tieren, welche im Verlauf der Prüfung sterben, produziert werden, aus den Berechnungen ausgeschlossen werden. Die Reproduktionsleistung von Elterntieren kann auch auf andere Art und Weise angegeben werden (z. B. Anzahl an lebenden Nachkommen, die je Tier und Tag ab dem ersten Tag, an dem Nachkommen festgestellt wurden, produziert werden), diese Angaben sollten jedoch zusätzlich zu der Gesamtanzahl an Jungtieren, bezogen auf die am Ende der Prüfung noch lebenden Elterntiere, protokolliert werden. Die Reproduktionsleistung der Tiere, die der Prüfsubstanz ausgesetzt wurden, wird mit der Leistung der Kontrolle(n) verglichen, um die niedrigste Wirkkonzentration (LOEC) und damit auch die höchste Konzentration ohne Wirkung (NOEC) zu bestimmen. Zusätzlich sind die Daten so weit wie möglich mit Hilfe eines Regressionsmodells zu analysieren, um die Konzentration zu schätzen, die zu einer x %igen Verringerung der Reproduktionsleistung führen würde (d. h., EC₅₀, EC₂₀ oder EC₁₀).

Das Überleben der Elterntiere und die Zeit bis zur Produktion der ersten Brut müssen ebenfalls berichtet werden. Andere sich auf die jeweilige Substanz beziehende Wirkungen auf Parameter wie das Wachstum (z. B. die Länge) und eine mögliche immanente Wachstumsrate können ebenfalls untersucht werden.

1.4 ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

Ergebnisse einer akuten Toxizitätsprüfung (siehe Methode C.2, Teil I), die an *Daphnia magna* durchgeführt wurde, sollten zur Verfügung stehen. Das Ergebnis kann bei der Auswahl eines geeigneten Bereichs an Prüfkonzentrationen in den Reproduktionsprüfungen von Nutzen sein. Die Wasserlöslichkeit und der Dampfdruck der Prüfsubstanz sollten bekannt sein, und ein zuverlässiges analytisches Verfahren für die Quantifizierung der Prüfsubstanz in den Prüflösungen mit dokumentierter Restitutionsgüte und Nachweisgrenze sollte vorhanden sein.

Zu den Informationen über die Prüfsubstanz, die bei der Festlegung der Prüfbedingungen von Nutzen sein können, gehören die Strukturformel, die Reinheit der Substanz, die Lichtstabilität, die Stabilität unter den Versuchsbedingungen, pKa, P_{ow} und die Ergebnisse einer Prüfung zur leichten biologischen Abbaubarkeit (siehe Methode C.4).

1.5 VALIDITÄTSKRITERIEN

Damit die Validität einer Prüfung gegeben ist, sollten die folgenden Leistungskriterien in der/den Kontrolle(n) erfüllt werden:

- Die Mortalität der Elterntiere (weibliche *Daphnien*) darf am Ende der Prüfung 20 % nicht übersteigen;
- Die mittlere Anzahl an lebenden Nachkommen, die pro am Ende der Prüfung noch lebendem Elterntier produziert wurden, ist ≥ 60 .

1.6 BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1 Prüfanordnung

Prüfgefäße und andere Geräte, die mit den Prüflösungen in Berührung kommen, sollten ganz aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Werkstoff bestehen. Normalerweise handelt es sich bei den Prüfgefäßen um Glaskolben.

Zusätzlich werden einige oder alle der folgenden Geräte erforderlich sein:

- Sauerstoffmeßgerät (mit einer Mikroelektrode oder einem anderen geeigneten Gerät zur Messung von gelöstem Sauerstoff in Proben von geringem Volumen);
- geeignetes Geräte zur Regelung der Temperatur;
- pH-Meßgerät;
- Gerät zur Bestimmung der Wasserhärte;
- Gerät zur Bestimmung der gesamten organischen Kohlenstoffkonzentration (TOC) von Wasser oder Gerät zur Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (COD);

— geeignetes Gerät zur Regelung der Beleuchtungsverhältnisse und zur Messung der Lichtstärke.

1.6.2 **Prüforganismen**

In der Prüfung soll die Art *Daphnia magna* Straus verwendet werden. Andere *Daphnien*-Arten können zum Einsatz kommen, sofern sie die Validitätskriterien, soweit zutreffend, erfüllen (die Validitätskriterien hinsichtlich der Reproduktionsleistung in den Kontrollen sollten für die *Daphnien*-Art relevant sein). Werden andere *Daphnien*-Arten verwendet, müssen diese eindeutig identifiziert werden, außerdem ist ihre Verwendung zu begründen.

Der Klon sollte möglichst durch eine Genotypbestimmung identifiziert worden sein. Untersuchungen (1) haben gezeigt, daß die Reproduktionsleistung von Klon A (der aus dem IRCHA in Frankreich stammt) (3) das Validitätskriterium eines Mittelwerts von ≥ 60 Nachkommen je überlebendem Elterntier gleichbleibend erfüllt, wenn die Kultur unter den in dieser Methode beschriebenen Bedingungen erfolgt. Andere Klone sind jedoch annehmbar, sofern nachgewiesen ist, daß die *Daphnien*-Kultur die Validitätskriterien für eine Prüfung erfüllt.

Zu Beginn der Prüfung sollten die Tiere weniger als 24 Stunden alt sein, und sie dürfen nicht zur ersten Nachkommenschaft einer Brut gehören. Sie sollten aus einem gesunden Bestand stammen (d. h., keine Anzeichen von Streß aufweisen, beispielsweise eine hohe Mortalität, das Vorhandensein von männlichen Tieren oder Ephippien, verzögerte Produktion der ersten Brut, verfärbte Tiere, usw.). Die Zuchttiere müssen unter ähnlichen Kulturbedingungen (Licht, Temperatur, Medium, Fütterung und Tiere je Volumeinheit) gehalten werden wie die Tiere, die in der Prüfung verwendet werden. Wird bei der Prüfung ein anderes Kulturmedium für die *Daphnien* verwendet als bei der routinemäßigen *Daphnien*-Kultur, empfiehlt sich eine Eingewöhnungszeit vor der Prüfung, die im Normalfall etwa 3 Wochen dauert (d. h. eine Generation), um Streß für die Elterntiere zu vermeiden.

1.6.3 **Prüfmedium**

In dieser Prüfung wird der Einsatz eines vollständig definierten Mediums empfohlen. Dadurch kann die Verwendung von Additiven (z. B. Seetang, Bodenextrakt, usw.), die sich nur schwer charakterisieren lassen, vermieden werden, und es bestehen größere Chancen auf eine Standardisierung unter den Prüfeinrichtungen. Die Medien Elendt M4 (4) und M7 (siehe Anhang 1) haben sich für diesen Zweck als geeignet erwiesen. Allerdings sind andere Medien (z. B. (5) (6)) annehmbar, sofern nachgewiesen ist, daß die Leistung der *Daphnien*-Kultur die Validitätskriterien für die Prüfung erfüllt.

Werden Medien verwendet, die undefinierte Additive enthalten, sollten diese Additive klar und deutlich spezifiziert werden und es sollten in dem Prüfbericht Angaben zur Zusammensetzung enthalten sein, insbesondere im Hinblick auf den Kohlenstoffgehalt, da dies zu der gebotenen Nahrung beitragen kann. Empfohlen wird, daß der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) und/oder der chemische Sauerstoffbedarf (COD) des Stammsatzes des organischen Additivs bestimmt und eine Schätzung des sich daraus ergebenden Beitrags zu dem TOC/COD in dem Prüfmedium vorgenommen wird. Die Empfehlung lautet, daß die TOC-Anteile in dem Medium (d. h., vor dem Zusatz von Algen) unter 2 mg/l liegen sollten (7).

Enthalten die Prüfsubstanzen Metalle, ist es wichtig, anzuerkennen, daß die Eigenschaften des Prüfmediums (z. B. Härte, Chelatbildungsvermögen) Einfluß auf die Toxizität der Prüfsubstanz haben können. Aus diesem Grunde sollte möglichst ein umfassend definiertes Prüfmedium verwendet werden. Gegenwärtig sind jedoch die einzigen umfassend definierten Medien, die bekanntermaßen für die Langzeitkultur von *Daphnia magna* geeignet sind, Elendt M4 und M7. Beide Medien enthalten den Chelatbildner EDTA. Untersuchungen haben gezeigt (2), daß die ‚scheinbare Toxizität‘ von Cadmium im allgemeinen niedriger ist, wenn die Reproduktionsprüfung in den Medien M4 und M7 durchgeführt wird, als in Medien, die kein EDTA enthalten. M4 und M7 werden aus diesem Grunde nicht für Prüfsubstanzen empfohlen, die Metalle enthalten, und andere Medien, die bekannte Chelatbildner enthalten, sollten ebenfalls vermieden werden. Bei Substanzen, die Metall enthalten, kann die Verwendung eines alternativen Mediums ratsam sein, beispielsweise rekonstituiertes hartes Süßwasser (7) nach ASTM, das kein EDTA enthält und dem Seetangextrakt zugesetzt wurde (8). Diese Kombination von rekonstituiertem hartem Süßwasser nach ASTM und Seetangextrakt ist ebenfalls für die Langzeitkultur und Prüfung von *Daphnia magna* (2) geeignet, auch wenn sie aufgrund der organischen Komponente in dem zugesetzten Seetangextrakt immer noch eine geringfügige chelatbildende Wirkung ausübt.

Zu Beginn und im Verlauf der Prüfung sollte die gelöste Sauerstoffkonzentration über 3 mg/l liegen. Der pH-Wert sollte sich im Bereich von 6 bis 9 befinden und in jedem einzelnen Test um nicht mehr als 1,5 Einheiten schwanken. Eine Härte von mehr als 140 mg/l (als CaCO₃) wird empfohlen. Bei Prüfungen mit diesem und höheren Werten wurde eine Reproduktionsleistung im Einklang mit den Validitätskriterien (9) (10) nachgewiesen.

1.6.4 **Prüflösungen**

Prüflösungen der gewählten Konzentrationen werden im allgemeinen durch Verdünnung eines Stammsatzes hergestellt. Stammsätze sollten möglichst durch Auflösung der Substanz im Prüfmedium hergestellt werden.

In einigen Fällen kann zwar der Einsatz von organischen Löse- oder Dispersionsmitteln erforderlich sein, um einen Stammsatz von geeigneter Konzentration zu erzielen, jedoch sollten alle Anstrengungen unternommen werden, um die Verwendung derartiger Stoffe zu vermeiden. Beispiele für geeignete Lösemittel sind Aceton, Ethanol, Methanol, Dimethylformamid und Triethylenglycol. Beispiele für geeignete Dispersionsmittel sind Cremophor RH40, Methylcellulose 0,0 1% und HCO-40. In jedem Fall sollte die Prüfsubstanz in den Prüflösungen die Löslichkeitsgrenze im Prüfmedium nicht überschreiten.

Lösemittel werden zur Herstellung eines Stammsatzes verwendet, der genau in Wasser dosiert werden kann. Bei der empfohlenen Lösemittelkonzentration in dem endgültigen Prüfmedium (d. h. $\leq 0,1$ ml/l) sind die obengenannten Lösemittel nicht toxisch und führen nicht zu einer höheren Wasserlöslichkeit einer Substanz.

Dispersionsmittel können bei einer genauen Dosierung und Dispersion helfen. Bei der empfohlenen Konzentration in dem endgültigen Prüfmedium ($\leq 0,1$ ml/l) sind die obengenannten Dispersionsmittel nicht toxisch und führen nicht zu einer höheren Wasserlöslichkeit einer Substanz.

1.7 AUSLEGUNG DER PRÜFUNG

Die Behandlungen sollten den Prüfgefäßen zugeordnet werden, und die gesamte anschließende Handhabung der Prüfgefäße sollte nach dem Zufallsprinzip erfolgen. Ist dies nicht der Fall, kann dies zu einer einseitigen Ausrichtung führen, die als Konzentrationswirkung ausgelegt werden könnte. Insbesondere wenn mit Versuchseinheiten in einer Behandlungs- oder Konzentrationsreihenfolge umgegangen wird, könnten verschiedene zeitabhängige Auswirkungen wie beispielsweise die Müdigkeit des Prüfers oder andere Fehler zu größeren Wirkungen bei den höheren Konzentrationen führen. Außerdem sollte eine Blockbildung für die Prüfung in Erwägung gezogen werden, wenn die Prüfergebnisse wahrscheinlich durch eine anfängliche oder umweltbezogene Bedingung der Prüfung wie der Position in der Prüfeinrichtung beeinflusst werden.

1.8 DURCHFÜHRUNG DER PRÜFUNG

1.8.1 **Expositionsbedingungen**

1.8.1.1 *Dauer*

Die Dauer der Prüfung beträgt 21 Tage.

1.8.1.2 *Besatz*

Die Elterntiere werden jeweils einzeln in einem Prüfgefäß mit 50 bis 100 ml Prüfmedium in jedem Gefäß gehalten.

Mitunter können größere Volumina erforderlich sein, um die Anforderungen des für die Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration zum Einsatz kommenden analytischen Verfahrens zu erfüllen, auch wenn ein Poolen von Wiederholungen für die chemische Analyse ebenfalls zulässig ist. Werden größere Volumina als 100 ml verwendet, muß unter Umständen die den *Daphnien* verabreichte Ration erhöht werden, um ein entsprechendes Nahrungsangebot und die Einhaltung der Validitätskriterien sicherzustellen. Bei Durchflußprüfungen können aus technischen Gründen alternative Konzepte in Erwägung gezogen werden (z. B. vier Gruppen von jeweils zehn Tieren in einem größeren Prüfvolumen), dann sollten allerdings Änderungen an der Auslegung der Prüfung protokolliert werden.

1.8.1.3 *Anzahl an Tieren*

Bei semistatischen Prüfungen werden mindestens 10 Tiere einzeln bei jeder Prüfkonzentration und mindestens 10 Tiere einzeln in den Kontrollreihen gehalten.

Bei Durchflußprüfungen haben sich 40 Tiere, die in vier Gruppen von jeweils 10 Tieren bei jeder Prüfkonzentration aufgeteilt werden, als geeignet erwiesen (1). Eine geringere Anzahl an Prüforganismen kann verwendet werden, und mindestens 20 Tiere je Konzentration, die in zwei oder mehr Wiederholungen mit einer gleichen Anzahl von Tieren aufgeteilt werden (z. B. vier Wiederholungen mit jeweils fünf Daphnien), werden empfohlen. Zu beachten ist, daß es bei Prüfungen, bei denen die Tiere in Gruppen gehalten werden, nicht möglich sein wird, die Reproduktionsleistung als Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen pro am Ende der Prüfung noch lebendem Elterntier darzustellen, wenn Elterntiere sterben. In diesen Fällen sollte die Reproduktionsleistung als ‚Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen pro zu Beginn der Prüfung vorhandenem Elterntier‘ angegeben werden’.

1.8.1.4 *Fütterung*

Bei semistatischen Prüfungen sollte die Fütterung möglichst täglich, zumindest jedoch dreimal pro Woche erfolgen (d. h., entsprechend dem Wechsel des Prüfmediums). Abweichungen hiervon (z. B. bei Durchflußprüfungen) sollten protokolliert werden.

Während der Prüfung sollte die Nahrung der Elterntiere möglichst aus lebenden Algenzellen von einer oder mehreren der folgenden Arten bestehen: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* (jetzt *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) und *Scenedesmus subspicatus*. Die gebotene Nahrung sollte auf der Menge an organischem Kohlenstoff (C) beruhen, die jedem Elterntier zur Verfügung gestellt wird. Untersuchungen (12) haben gezeigt, daß bei *Daphnia magna* Rationen zwischen 0,1 und 0,2 mg C/*Daphnie*/Tag hinreichend sind, um die zur Erfüllung der Validitätskriterien der Prüfung erforderliche Anzahl an Nachkommen zu erzielen. Die Ration kann entweder aus einer gleichbleibenden Gabe während des gesamten Prüfzeitraums bestehen, oder es kann, sofern gewünscht, am Anfang eine geringere Menge dargeboten werden, die dann im Verlauf der Prüfung erhöht wird, um dem Wachstum der Elterntiere Rechnung zu tragen. In diesem Falle sollte die Ration zu allen Zeiten nach wie vor innerhalb des empfohlenen Bereichs von 0,1 bis 0,2 mg C/*Daphnie*/Tag bleiben.

Kommen zur Bestimmung der erforderlichen Futtermenge Ersatzgrößen zum Einsatz, beispielsweise die Anzahl an Algenzellen oder die Lichtextinktion (aus Gründen der Zweckmäßigkeit, weil die Messung des Kohlenstoffgehalts zeitaufwendig ist), muß jede Prüfeinrichtung ihr eigenes Nomogramm erstellen, in dem die Ersatzgröße in bezug zum Kohlenstoffgehalt der Algenkultur gesetzt wird (Anleitung zur Erstellung von Nomogrammen siehe Anhang 2). Nomogramme sollten zumindest einmal pro Jahr oder häufiger überprüft werden, wenn sich die Bedingungen für die Algenkultur geändert haben. Dabei hat sich die Lichtextinktion als eine bessere Ersatzgröße für den Kohlenstoffgehalt als die Zellenanzahl erwiesen (13).

Den *Daphnien* sollte eine konzentrierte Algensuspension gefüttert werden, um das Volumen des Algenkulturmediums, das in die Prüfgefäße gelangt, auf ein Mindestmaß zu beschränken. Die Konzentration der Algen läßt sich durch Zentrifugieren mit anschließender Resuspension in destilliertem Wasser, entionisiertem Wasser oder *Daphnien*-Kulturmedium erreichen.

1.8.1.5 *Licht*

16 Stunden Licht mit einer Stärke von nicht mehr als $15 \text{ bis } 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.8.1.6 *Temperatur*

Die Temperatur der Prüfmedien sollte innerhalb eines Bereichs von 18 bis 22° C liegen. Allerdings sollte die Temperatur bei jeder einzelnen Prüfung nach Möglichkeit um nicht mehr als 2° C innerhalb dieser Grenzwerte schwanken (z. B. 18 bis 20, 19 bis 21 oder 20 bis 22° C). Zur Überwachung der Temperatur kann die Verwendung eines zusätzlichen Prüfgefäßes angebracht sein.

1.8.1.7 *Belüftung*

Die Prüfgefäße dürfen während der Prüfung nicht belüftet werden.

1.8.2 **Prüfkonzentration**

Im Normalfall sollten mindestens fünf Prüfkonzentrationen verwendet werden, die in einer geometrischen Reihe angeordnet sind und sich um einen Faktor von möglichst nicht mehr als 3,2 voneinander unterscheiden, und es sollte die angemessene Anzahl an Wiederholungen für jede Prüfkonzentration eingesetzt werden (siehe 1.8.1.3). Werden weniger als fünf Konzentrationen verwendet, sollte eine Begründung dafür angegeben werden. Substanzen sollten nicht oberhalb ihrer Löslichkeitsgrenze im dem Prüfmedium getestet werden.

Bei der Festlegung des Bereichs von Konzentrationen sollte folgendes bedacht werden:

- i. Wenn das Ziel die Ermittlung der LOEC/NOEC ist, muß die niedrigste Prüfkonzentration so niedrig sein, daß die Fruchtbarkeit bei dieser Konzentration nicht signifikant niedriger als in der Kontrolle ist. Ist dies nicht der Fall, muß die Prüfung mit einer geringeren niedrigsten Konzentration wiederholt werden.
- ii. Wenn das Ziel die Bestimmung der LOEC/NOEC ist, muß die höchste Prüfkonzentration so hoch sein, daß die Fruchtbarkeit bei dieser Konzentration signifikant niedriger als in der Kontrolle ist. Ist dies nicht der Fall, muß die Prüfung mit einer höheren höchsten Konzentration wiederholt werden.
- iii. Wenn die EC_x für Wirkungen auf die Reproduktion geschätzt wird, ist es ratsam, hinreichende Konzentrationen zur Bestimmung der EC_x mit einem angemessenen Vertrauensbereich zu verwenden. Wenn die EC_{50} für Wirkungen auf die Reproduktion geschätzt wird, ist es ratsam, daß die höchste Prüfkonzentration höher als diese EC_{50} ist. Andernfalls ist es zwar immer noch möglich, die EC_{50} zu schätzen, der Vertrauensbereich für die EC_{50} ist jedoch sehr weit, und es ist vielleicht nicht möglich, die Angemessenheit des angepaßten Modells zufriedenstellend zu bewerten.
- iv. Der Prüfkonzentrationsbereich sollte möglichst keine Konzentration beinhalten, die eine statistisch signifikante Wirkung auf das Überleben von erwachsenen Tieren hat, da dies die Art der Prüfung von einer einfachen Reproduktionsprüfung in eine kombinierte Reproduktions- und Mortalitätsprüfung verwandeln würde, für die eine deutlich komplexere statistische Auswertung erforderlich ist.

Wenn die Toxizität der Prüfsubstanz im Vorfeld bekannt ist (z. B. aus einer akuten Toxizitätsprüfung und/oder aus Voruntersuchungen zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs), dürfte dies bei der Auswahl geeigneter Prüfkonzentrationen helfen.

Wird ein Löse- oder Dispersionsmittel zur Herstellung der Prüflösungen verwendet (siehe Abschnitt 1.6.4), sollte dessen Endkonzentration in den Prüfgefäßen 0,1 ml/l nicht übersteigen und in allen Prüfgefäßen gleich sein.

1.8.3 **Kontrollen**

Eine Kontrollreihe mit dem Prüfmedium und, sofern zutreffend, auch eine Kontrollreihe mit dem Löse- oder Dispersionsmittel sollten zusätzlich zu den Testreihen durchgeführt werden. Werden Löse- oder Dispersionsmittel verwendet, sollte deren Konzentration gleich den Konzentrationen in den Gefäßen mit der Prüfsubstanz sein. Die entsprechende Anzahl an Wiederholungen sollte zum Einsatz kommen (siehe Abschnitt 1.8.1.3).

Im allgemeinen sollte in einer ordentlich durchgeführten Prüfung der Variationskoeffizient rund um die mittlere Anzahl an lebenden Nachkommen, die pro Elterntier in der/den Kontrolle(n) produziert werden, $\leq 25\%$ sein, und dies sollte bei Prüfkonzepten mit einzeln gehaltenen Tieren protokolliert werden.

1.8.4 **Erneuerung des Prüfmediums**

Die Häufigkeit, mit der das Prüfmedium erneuert wird, hängt von der Stabilität der Prüfsubstanz ab, jedoch sollte es zumindest dreimal pro Woche ausgetauscht werden. Wenn aus vorhergehenden Stabilitätsprüfungen (siehe Abschnitt 1.4) bekannt ist, daß die Konzentration der Prüfsubstanz während des maximalen Erneuerungszeitraums (d. h. 3 Tage) nicht stabil ist (d. h., außerhalb des Bereichs von 80 bis 120 % der nominalen Konzentration oder Unterschreitung von 80 % der gemessenen anfänglichen Konzentration), sollte ein häufigerer Wechsel des Prüfmediums oder der Einsatz einer Durchflußprüfung in Erwägung gezogen werden.

Wird das Medium in semistatischen Prüfungen erneuert, wird eine zweite Reihe von Prüfgefäßen vorbereitet, in die die Elterntiere beispielsweise mit einer Glaspipette von geeignetem Durchmesser umgesetzt werden. Dabei sollte die Menge an Prüfmedium, die zusammen mit den *Daphnien* umgesetzt wird, so gering wie möglich sein.

1.8.5 **Beobachtungen**

Die Ergebnisse der Beobachtungen während der Prüfung sollten auf Datenblättern (siehe Beispiele in Anhang 3 und 4) protokolliert werden. Sind andere Messungen erforderlich (siehe 1.3 und 1.8.8), sind gegebenenfalls weitere Beobachtungen vonnöten.

1.8.6 **Nachkommen**

Die Nachkommen, die von jedem Elterntier produziert werden, sollten vom Auftreten der ersten Brut an möglichst täglich entfernt und gezählt werden, um zu verhindern, daß diese die für die erwachsenen Tiere bestimmte Nahrung verbrauchen. Für diese Methode braucht zwar nur die Anzahl an lebenden Nachkommen gezählt werden, vorhandene unreife Eier oder tote Nachkommen sollten jedoch ebenfalls festgehalten werden.

1.8.7 **Mortalität**

Sterbefälle unter den Elterntieren sollten möglichst täglich protokolliert werden, sie sollten zumindest zu den gleichen Zeiten wie die Nachkommen gezählt werden.

1.8.8 **Sonstige Parameter**

Auch wenn dieses Verfahren in der Hauptsache zur Bewertung der Wirkungen auf die Reproduktion dienen soll, besteht die Möglichkeit, daß auch andere Auswirkungen in hinreichendem Maße für eine statistische Auswertung quantifiziert werden können. Besonders wünschenswert sind dabei Wachstumsmessungen, denn sie liefern Informationen über mögliche subletale Wirkungen, die unter Umständen nützlicher als die Reproduktionsmessung alleine sind; empfohlen wird die Vermessung der Länge der Elterntiere (d. h., die Körperlänge ohne Afterstachel) am Ende der Prüfung. Weitere Parameter, die sich messen oder berechnen lassen, sind unter anderem die Zeit bis zur Produktion der ersten Brut (und folgender Bruten), Anzahl und Umfang der Bruten je Tier, Anzahl an unreifen Eiern, Vorhandensein von männlichen Tieren oder Ephippien und die immanente Populationswachstumsrate.

1.8.9 **Häufigkeit von analytischen Bestimmungen und Messungen**

Die Sauerstoffkonzentration, die Temperatur, die Härte und pH-Werte sollten zumindest einmal pro Woche gemessen werden, und zwar in frischen und alten Medien, in der/den Kontrolle(n) und in der höchsten Konzentration der Prüfsubstanz.

Während der Prüfung werden die Konzentrationen der Prüfsubstanz in regelmäßigen Abständen bestimmt.

Bei semistatischen Prüfungen, bei denen erwartet wird, daß die Konzentration der Prüfsubstanz innerhalb von $\pm 20\%$ der Nominalkonzentration konstant bleibt (d. h., innerhalb des Bereichs von 80 bis 120 % - siehe Abschnitt 1.4 und 1.8.4), wird empfohlen, daß zumindest die höchste und die niedrigste Prüfkonzentration, frisch hergestellt und zum Zeitpunkt des Austauschs, einmal während der ersten Woche der Prüfung analysiert werden (d. h., Analysen sollten anhand einer Probe derselben Lösung erfolgen – wenn diese frisch hergestellt ist und beim Austausch). Diese Bestimmungen sollten anschließend zumindest in wöchentlichen Abständen wiederholt werden.

Bei Prüfungen, bei denen nicht damit zu rechnen ist, daß die Konzentration der Prüfsubstanz innerhalb von $\pm 20\%$ der Nominalkonzentration konstant bleibt, ist es notwendig, alle Prüfkonzentrationen, frisch hergestellt und beim Austausch, zu analysieren. Bei denjenigen Prüfungen jedoch, bei denen die gemessene Anfangskonzentration der Prüfsubstanz zwar nicht innerhalb von $\pm 20\%$ der nominalen Konzentration stabil bleibt, bei der jedoch hinreichend nachgewiesen werden kann, daß die Anfangskonzentrationen reproduzierbar und stabil sind (d. h. innerhalb des Bereichs von 80 bis 120 % der Anfangskonzentrationen), könnten die chemischen Bestimmungen in Woche 2 und 3 der Prüfung auf die höchste und die niedrigste Konzentration reduziert werden. In allen Fällen braucht die Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentrationen vor der Erneuerung des Prüfmediums nur an einem Wiederholungsgefäß bei jeder Prüfkonzentration vorgenommen zu werden.

Bei einer Durchflußprüfung ist ein ähnliches Probenahmeverfahren wie für semistatistische Prüfungen beschrieben angebracht (die Messung der ‚alten‘ Lösungen gilt in diesem Fall jedoch nicht). Es kann allerdings ratsam sein, die Anzahl an Probenahmen in der ersten Woche zu erhöhen (z. B. drei Meßreihen), um sicherzugehen, daß die Prüfkonzentrationen stabil bleiben. Bei diesen Prüfarten sollte die Durchsatzrate des Verdünnungsmittels und der Prüfsubstanz täglich überprüft werden.

Ist nachgewiesen, daß die Konzentration der geprüften Substanz während der gesamten Prüfung zufriedenstellend innerhalb von $\pm 20\%$ der Nominalkonzentration oder der gemessenen Anfangskonzentration bleibt, können die Ergebnisse auf nominalen oder gemessenen Anfangswerten beruhen. Wenn die Abweichung von der nominalen oder gemessenen Anfangskonzentration größer als $\pm 20\%$ ist, sollten die Ergebnisse als zeitgewichtetes Mittel dargestellt werden (siehe Anhang 5).

2. DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

2.1 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Mit dieser Prüfung soll die Wirkung der Prüfsubstanz auf die Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen, die pro am Ende der Prüfung noch lebendem Elterntier produziert wurden, bestimmt werden. Dabei sollte die Gesamtanzahl an Nachkommen je Elterntier für jedes Prüfgefäß (d. h. für jede Wiederholung) berechnet werden. Wenn in einer Wiederholung das Elterntier während der Prüfung stirbt oder sich als Männchen herausstellt, dann wird die Wiederholung von der Analyse ausgeschlossen. Die Analyse beruht dann auf einer verringerten Anzahl von Wiederholungen.

Zur Schätzung der LOEC und damit auch der NOEC für Wirkungen der Chemikalie auf die Reproduktionsleistung müssen die mittlere Reproduktionsleistung unter den Wiederholungen für jede Konzentration und die gepoolte Reststandardabweichung berechnet werden; dies kann durch eine Varianzanalyse (ANOVA) erfolgen. Der Mittelwert für jede Konzentration muß dann mit Hilfe einer angemessenen Mehrfachvergleichsmethode mit dem Kontrollmittelwert verglichen werden. Von Nutzen können dabei Dunnett'sche oder Williams'sche Tests sein (14)(15)(16)(17). Überprüft werden muß, ob die ANOVA-Voraussetzung der Homogenität der Varianz zutreffend ist. Es wird empfohlen, dies eher graphisch als durch eine formale Signifikanzprüfung zu ermitteln (18); eine geeignete Alternative besteht in der Durchführung eines Bartlett'schen Tests. Gilt diese Annahme nicht, sollte überlegt werden, die Daten zur Homogenisierung von Varianzen vor der Durchführung der ANOVA zu transformieren oder eine gewichtete ANOVA durchzuführen. Der Umfang der mit der ANOVA nachweisbaren Wirkung (d. h. die geringste signifikante Differenz) sollte berechnet und protokolliert werden.

Zur Schätzung der Konzentration, die eine 50%ige Verringerung der Reproduktionsleistung verursachen würde (d. h., die EC_{50}), sollte eine geeignete Kurve wie beispielsweise die logistische Kurve an die Daten unter Einsatz eines statistischen Verfahrens wie der Methode der kleinsten Quadrate angepaßt werden. Die Kurve könnte so parametrisiert werden, daß die EC_{50} und deren Standardfehler direkt abgeschätzt werden können. Dies würde die Berechnung des Vertrauensbereichs für die EC_{50} deutlich erleichtern. Soweit keine guten Gründe dafür vorliegen, anderen Vertrauensbereichen den Vorzug zu geben, sollte der zweiseitige 95 % Vertrauensbereich angegeben werden. Das Anpassungsverfahren sollte möglichst einen Weg bieten, um die Signifikanz der mangelnden Anpassung zu bewerten. Dies kann graphisch erfolgen oder indem man die Restsumme der Quadrate in ‚mangelnde Anpassung‘ und ‚reine Fehlerkomponenten‘ unterteilt und eine Signifikanzprüfung für die mangelnde Anpassung durchführt. Da Behandlungen, die zu einer höheren Fruchtbarkeit führen, wahrscheinlich eine größere Varianz in der Anzahl an produzierten Jungtieren aufweisen als Behandlungen, die eine niedrige Fruchtbarkeit ergeben, sollte eine Gewichtung der beobachteten Werte in Erwägung gezogen werden, um den unterschiedlichen Varianzen in den verschiedenen Behandlungsgruppen Rechnung zu tragen (Hintergrundinformationen siehe Literaturhinweis 18).

Bei der Analyse der Daten aus dem endgültigen Ringversuch (2) wurde eine logistische Kurve anhand des folgenden Modells angepaßt, auch wenn auch andere geeignete Modelle herangezogen werden können:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

Dabei gilt:

Y: Gesamtanzahl an Jungtieren pro Elterntier, das am Ende der Prüfung noch lebt (für jedes Gefäß berechnet)

x: Konzentration der Substanz

c: Erwartete Anzahl an Jungtieren bei $x = 0$

x_0 : EC_{50} in der Population

b: Steigungsparameter

Dieses Modell kommt wahrscheinlich für eine große Anzahl von Situationen in Frage, es wird jedoch Prüfungen geben, bei denen es nicht angemessen ist. Wie oben angeregt, sollte die Validität des Modells überprüft werden. In einigen Fällen kann auch ein Hormesis-Modell, bei dem niedrige Konzentrationen zu größeren Wirkungen führen, angebracht sein (19).

Andere Wirkkonzentrationen wie die EC_{10} oder EC_{20} können ebenfalls geschätzt werden, auch wenn vielleicht besser eine andere Parametrierung für das Modell als bei der Schätzung der EC_{50} zu verwenden ist.

2.2 ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

2.2.1 **Prüfsubstanz:**

- Physikalische Beschaffenheit und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Daten zur chemischen Identität, einschließlich Reinheit.

2.2.2 **Geprüfte Daphnienart:**

- Der Klon (ob er einer Gentyptisierung unterzogen wurde), der Lieferant oder die Bezugsquelle (sofern bekannt) und die zum Einsatz kommenden Kulturbedingungen. Wird eine andere Art als *Daphnia magna* eingesetzt, sollte dies protokolliert und begründet werden.

2.2.3 **Prüfbedingungen:**

- Zum Einsatz kommendes Prüfverfahren (z. B. semistatisches oder Durchflußverfahren, Volumen, Besatz mit Anzahl *Daphnien* pro Liter);
- Belichtungsdauer und Lichtstärke;
- Auslegung der Prüfung (z. B. Anzahl an Wiederholungen, Anzahl an Elterntieren je Wiederholung);
- nähere Angaben zum verwendeten Kulturmedium;
- sofern verwendet, zugesetztes organisches Material, einschließlich Zusammensetzung, Herkunft, Herstellungsverfahren, TOC/COD der Stammansätze, Schätzung des sich daraus ergebenden TOC/COD im Prüfmedium;
- detaillierte Informationen über die Fütterung, einschließlich Menge (in mg C/*Daphnie*/Tag) und Plan (z. B. Art von Futtermittel(n), einschließlich der spezifische Name (Art) bei Algen und, sofern bekannt, der Stamm, die Kulturbedingungen);

- Art der Herstellung von Stammansätzen und Häufigkeit der Erneuerung (sofern verwendet, müssen das Löse- oder Dispersionsmittel und dessen Konzentration angegeben werden).

2.2.4

Ergebnisse:

- Ergebnisse von eventuellen vorhergehenden Untersuchungen zur Stabilität der Prüfsubstanz;
- die nominalen Prüfkonzentrationen und die Ergebnisse aller Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz in den Prüfgefäßen (siehe Beispieldatenblätter in Anhang 4); die Restitutionsgüte der Methode und die Bestimmungsgrenze sollten ebenfalls protokolliert werden;
- Wasserqualität innerhalb der Prüfgefäße (d. h., pH-Wert, Temperatur und gelöste Sauerstoffkonzentration sowie TOC und/oder COD und Härte, soweit zutreffend) (siehe Beispieldatenblatt in Anhang 3);
- die gesamte Aufzeichnung der lebenden Nachkommen für jedes Elterntier (siehe Beispieldatenblatt in Anhang 3);
- die Anzahl an Todesfällen unter den Elterntieren und der Tag, an dem diese eingetreten sind (siehe Beispieldatenblatt in Anhang 3);
- der Variationskoeffizient für die Kontrollfruchtbarkeit (anhand der Gesamtanzahl von lebenden Nachkommen je Elterntier, das am Ende der Prüfung noch lebt);
- Darstellung der Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen je Elterntier (für jede Wiederholung), das am Ende der Prüfung noch lebt, im Verhältnis zur Prüfkonzentration der Prüfsubstanz;
- die Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) für die Reproduktion, einschließlich einer Beschreibung der eingesetzten statistischen Verfahren und einer Angabe zum Umfang der Wirkung, die nachgewiesen werden konnte, und die No Observed Effect Concentration (NOEC) für die Reproduktion; soweit zutreffend, sollten die LOEC/NOEC für die Mortalität der Elterntiere ebenfalls protokolliert werden;
- soweit zutreffend, die EC_x für die Reproduktion und die Vertrauensbereiche und ein Diagramm für das angepaßte Modell, das für deren Berechnung herangezogen wurde, die Steigung der Dosisreaktionskurve und deren Standardfehler;
- andere beobachtete biologische Wirkungen oder Messungen: alle anderen biologischen Wirkungen dokumentieren, die beobachtet oder gemessen wurden (z. B. Wachstum von Elterntieren), einschließlich einer angemessenen Begründung;
- eine Erklärung für eine eventuelle Abweichung von der Prüfmethode.

3.

LITERATUR

- 1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.
- 2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.
- 3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **21**, 257-265.
- 4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, **154**, 25-33.
- 5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- 6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **47**, 775-782.

- 7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

- 8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- 9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, 1-8.
- 10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), 185-196.
- 11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.
- 12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 2053-2058.
- 13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.
- 14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.
- 15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.
- 16) 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.
- 17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, 510-531.
- 18) Draper N.R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.
- 19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.
- 20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.
- 21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.
- 22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

ANHANG 1

HERSTELLUNG DER VOLLSTÄNDIG DEFINIERTEN MEDIEN ELENDT M7 UND M4

Gewöhnung an die Medien ElenDt M7 und M4

Einige Prüfeinrichtungen haben Schwierigkeiten, *Daphnien* direkt in die Medien M4 (1) und M7 umzusetzen. Erfolg wurde jedoch mit einer schrittweisen Eingewöhnung erzielt, d. h., dem Wechsel von dem eigenen Medium in 30 %iges ElenDt, dann in 60 %iges ElenDt und dann in 100 %iges ElenDt. Die Eingewöhnungszeiten können dabei durchaus einen Monat betragen.

HERSTELLUNG

Spurenelemente

Zunächst werden gesonderte Stammansätze (I) einzelner Spurenelemente in Wasser mit geeignetem Reinheitsgrad, z. B. entionisiertes oder destilliertes Wasser oder Wasser aus umgekehrter Osmose, hergestellt. Aus diesen unterschiedlichen Stammansätzen (I) wird ein zweiter alleiniger Stammansatz (II) hergestellt, der alle Spurenelemente enthält (kombinierte Lösung), d. h.:

Stammansätze I (einzelne Substanz)	Wasser zugesezte Menge mg/l	Konzentra- tion (in Verhältnis zum Medium M4) -fach	Zur Herstellung des kombinierten Stammansatzes II zu Wasser die folgende Menge an Stammansatz I zugeben ml/l	
			M 4	M 7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl ₂ * 6 H ₂ O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000	1,0	1,0
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000	1,0	1,0
Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O	5 000	2 000	-	-
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1 991	2 000	-	-
Sowohl die Na ₂ EDTA- als auch die FeSO ₄ -Lösung werden einzeln hergestellt, zusammengegossen und sofort im Autoklaven behandelt. Dies ergibt:				
21 Fe-EDTA-Lösung		1 000fach	20,0	5,0

Medien M4 und M7

Die Medien M4 und M7 werden anhand des Stammansatzes II, der Makronährstoffe und Vitamine wie folgt hergestellt:

	Wasser zugesetzte Menge mg/l	Konzentration (im Verhältnis zum Medium M4) -fach	Zur Herstellung des Mediums zugesetzte Menge an Stammansatz ml/l	
			M 4	M 7
Stammansatz II kombinierte Spurenelemente		20	50	50
Makronährstoff-Stammansätze (einzelne Substanz)				
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ * 9 H ₂ O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0,1	0,1
Kombinierter Vitaminstammansatz	-	10 000	0,1	0,1
Der kombinierte Vitaminstammansatz wird hergestellt, indem man die 3 Vitamine einem Liter Wasser zusetzt, wie im folgenden angegeben:				
Thiaminhydrochlorid	750	10 000	-	-
Cyanocobalamin (B ₁₂)	10	10 000	-	-
Biotin	7,5	10 000	-	-

Der kombinierte Vitaminstammansatz wird in kleinen Portionen tiefgefroren aufbewahrt. Vitamine werden den Medien kurz vor der Verwendung zugesetzt.

Hinweis 1 Um die Ausfällung von Salzen bei der Herstellung der vollständigen Medien zu vermeiden, die Portionen von Stammansätzen in etwa 500 bis 800 ml Wasser entionisiertes Wasser geben und dann auf 1 Liter auffüllen.

Hinweis 2: Erstmals in einer Publikation erwähnt wird das Medium M4 bei Elenndt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

ANHANG 2

ANALYSE DES GESAMTEN ORGANISCHEN KOHLENSTOFFS (TOC) UND ERSTELLUNG VON NOMOGRAMMEN FÜR DEN TOC-GEHALT VON ALGENFUTTER

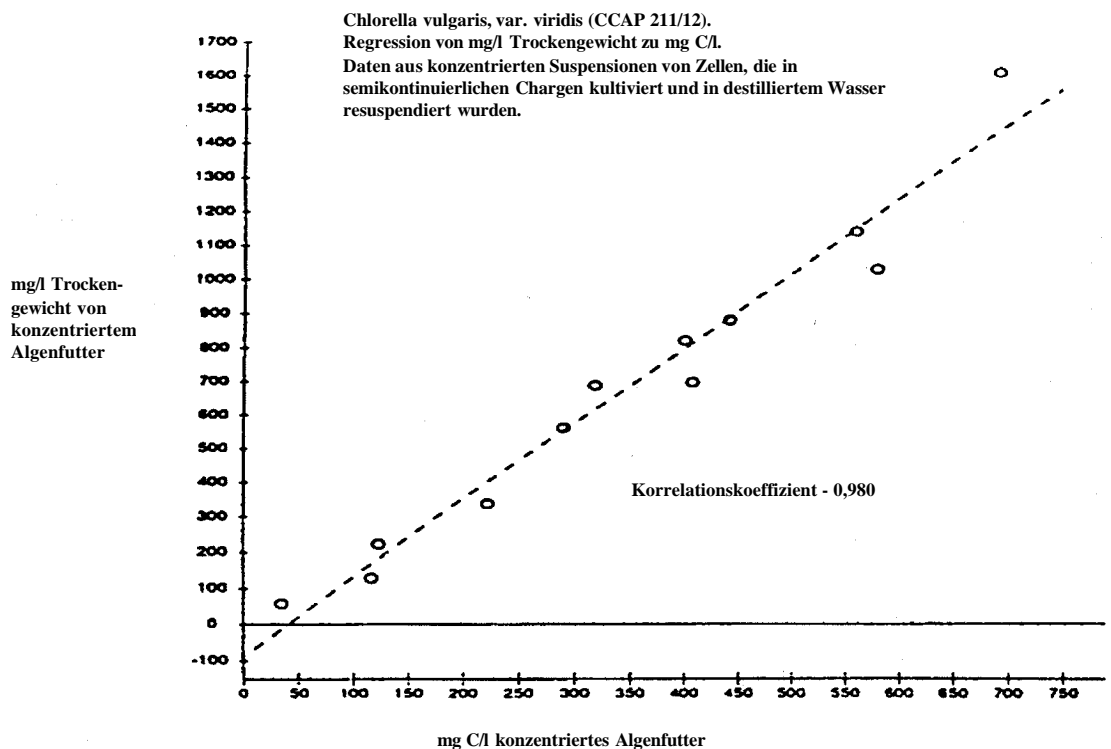
Bekanntermaßen wird der Kohlenstoffgehalt des Algenfutters normalerweise nicht direkt gemessen, sondern aus Korrelationen (d. h. Nomogrammen) mit Ersatzgrößen wie der Algenzellenzahl oder der Lichtextinktion abgeleitet.

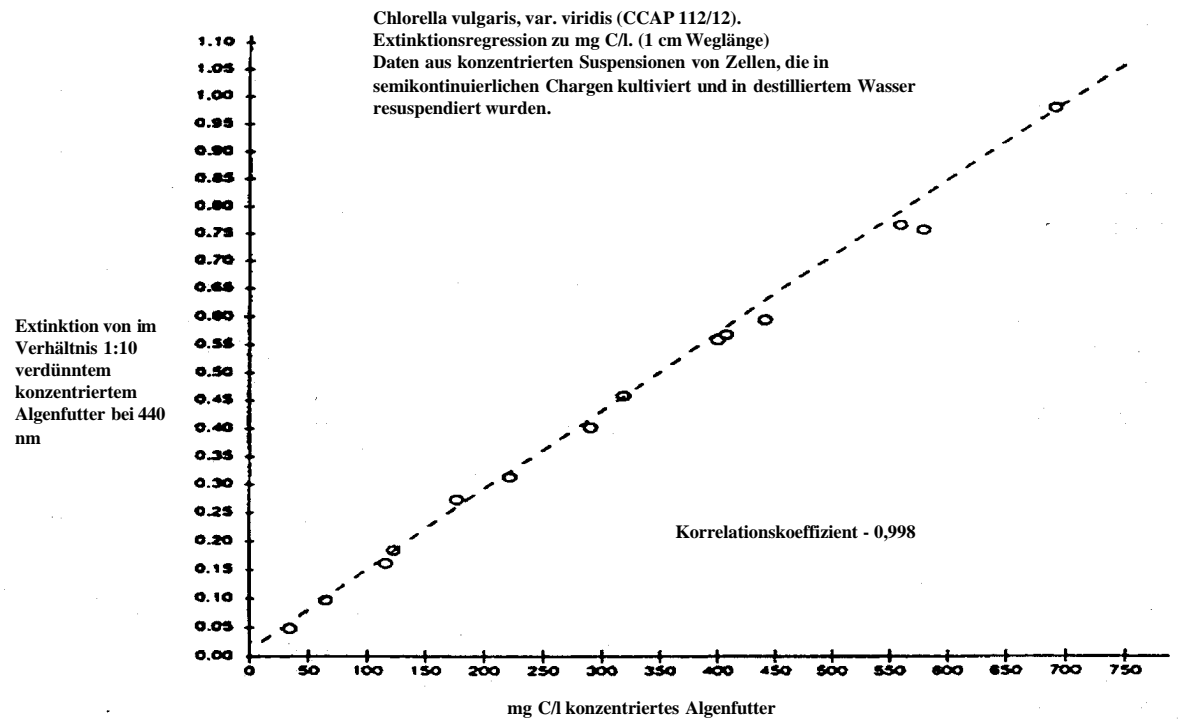
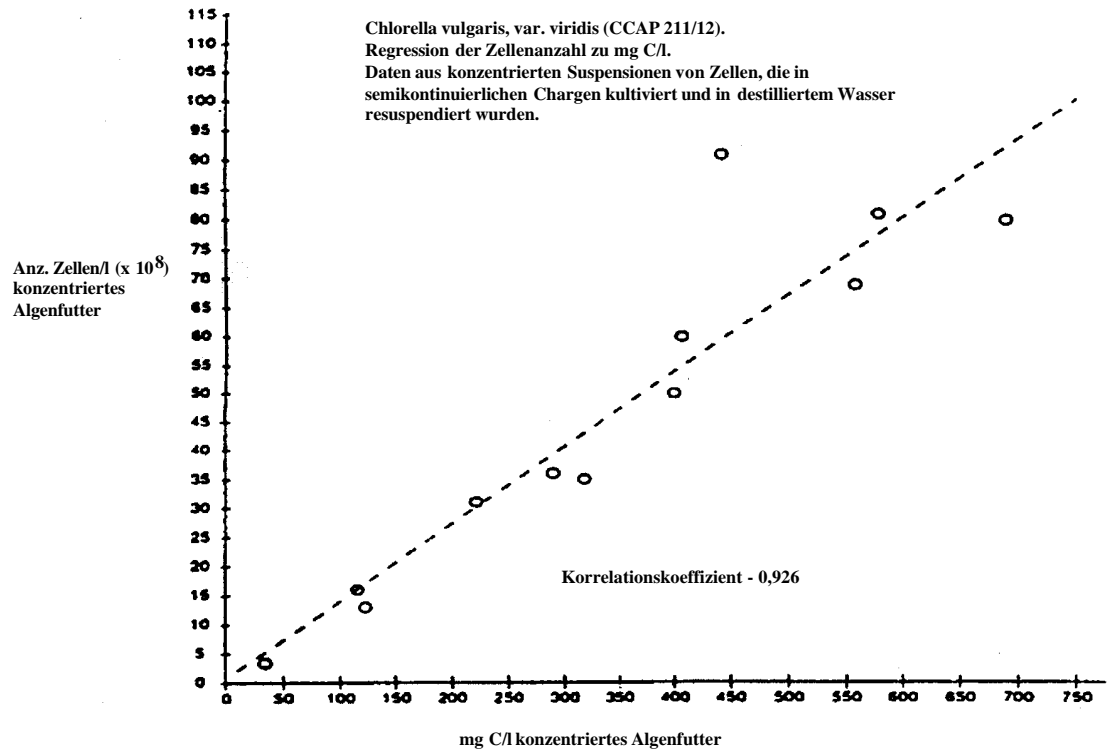
Der TOC sollte eher durch Oxidation bei hoher Temperatur als durch UV- oder Persulfatmethoden gemessen werden (siehe hierzu auch: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Für die Erstellung von Nomogrammen sollten die Algen durch Zentrifugierung von dem Wachstumsmedium getrennt werden, gefolgt von einer Resuspension in destilliertem Wasser. Den Ersatzparameter und die TOC-Konzentration in jeder Probe in einer Dreifachwiederholung messen. Es sollten Blindproben des destillierten Wassers analysiert und die TOC-Konzentration von der TOC-Konzentration in der Algenprobe abgeleitet werden.

Nomogramme sollten über den geforderten Bereich von Kohlenstoffkonzentrationen linear verlaufen. Beispiele hierzu finden sich weiter unten.

Hinweis: Diese Beispiele sollten nicht für Umrechnungen herangezogen werden; wichtig ist, daß die Prüfeinrichtungen ihre eigenen Nomogramme erstellen.





ANHANG 3

BEISPIELDATENBLATT ZUR PROTOKOLLIERUNG DER ERNEUERUNG DES PRÜFMEDIUMS, VON PHYSIKALISCH-CHEMISCHEN ÜBERWACHUNGSDATEN, DER FÜTTERUNG, DAPHNIEN-REPRODUKTION UND MORTALITÄT VON ERWACHSENEN TIEREN

Versuch Nr.⁰: Ausgangsdaten: Klon: Medium: Futterart: Prüfsubstanz: Nominale Konz.:

Tag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Medium-erneuerung (ankreuzen)																									
pH-Wert *																									neu
																									alt
O ₂ mg/l *																									neu
																									alt
Temp. (°C) *																									neu
																									alt
Geb. Futter (ankreuzen)																									
Anz. leb. Nachkommen †																									Gesamt
Gefäß 1																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
																									Gesamt
Kumulative Mortalität bei erwachs. Tieren ‡																									

* Angeben, welches Gefäß für den Versuch verwendet wurde

‡ Die Mortalität von erwachsenen Tieren als ‚M‘ in dem betreffenden Kästchen protokollieren

† Unreife Bruten als ‚AB‘ in dem betreffenden Kästchen protokollieren

ANHANG 5

BERECHNUNG EINES ZEITGEWICHTETEN MITTELS

Zeitgewichtetes Mittel

In Anbetracht der Tatsache, daß sich die Konzentration der Prüfsubstanz während des Zeitraums zwischen den Erneuerungen des Prüfmediums verringern kann, muß überlegt werden, welche Konzentration als für den Konzentrationsbereich, dem die Elterndaphnien ausgesetzt werden, repräsentativ ausgewählt werden sollte. Die Auswahl sollte dabei sowohl auf biologischen als auch auf statistischen Erwägungen beruhen. Wenn man beispielsweise davon ausgeht, daß die Reproduktion am stärksten durch die zur Anwendung kommende Spitzenkonzentration beeinflusst wird, dann sollte die maximale Konzentration herangezogen werden. Wenn jedoch die kumulierte oder längerfristige Wirkung der toxischen Substanz für wichtiger gehalten wird, dann hat eine Durchschnittskonzentration eine größere Relevanz. In diesem Fall besteht ein geeigneter anzusetzender Durchschnittswert aus der zeitgewichteten mittleren Konzentration, da hierbei die Streubreite der Augenblickskonzentration im Laufe der Zeit berücksichtigt wird.

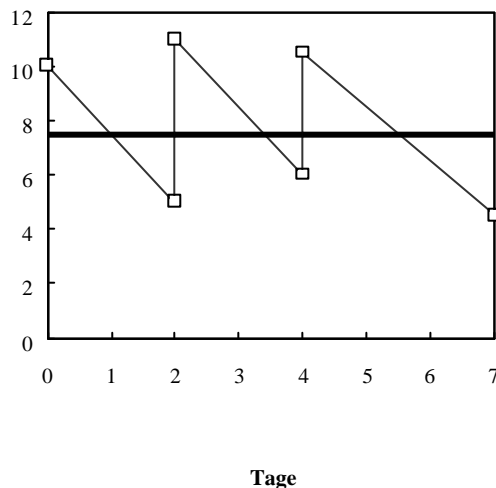


Bild 1: Beispiel für ein zeitgewichtetes Mittel

Bild 1 zeigt ein Beispiel für eine (vereinfachte) Prüfung, die 7 Tage dauert und bei der an Tag 0, 2 und 4 das Prüfmedium erneuert wird.

- Die dünne Zickzacklinie stellt die Konzentration zu jedem Zeitpunkt dar. Es wird angenommen, daß der Rückgang der Konzentration einem exponentiellen Zerfallsprozeß folgt.
- Die 6 eingezeichneten Punkte stellen die beobachteten Konzentrationen dar, die am Anfang und am Ende eines jeden Erneuerungszeitraums gemessen wurden.
- Die dicke durchgezogene Linie gibt die Lage des zeitgewichteten Mittels an.

Das zeitgewichtete Mittel wird so berechnet, daß die Fläche unterhalb des zeitgewichteten Mittels gleich der Fläche unterhalb der Konzentrationskurve ist. Die Berechnung für das obengenannte Beispiel wird in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Berechnung des zeitgewichteten Mittels

Erneuerung Nr.°	Tage	Konz0	Konz1	Ln(Konz0)	Ln(Konz1)	Fläche
1	2	10.000	4.493	2.303	1.503	13.767
2	2	11.000	6.037	2.398	1.798	16.544
3	3	10.000	4.066	2.303	1.403	19.781
Gesamtanzahl Tage: 7					Gesamtfläche	50.091
					Zeitgew. Mittel	7.156

Tage steht für die Anzahl von Tagen des Erneuerungszeitraums.

Konz0 ist die gemessene Konzentration zu Beginn eines jeden Erneuerungszeitraums.

Konz1 ist die gemessene Konzentration am Ende eines jeden Erneuerungszeitraums.

$\ln(Konz0)$ ist der natürliche Logarithmus von *Konz0*

$\ln(Konz1)$ ist der natürliche Logarithmus von *Konz1*

Fläche ist die Fläche unter der exponentiellen Kurve für jeden Erneuerungszeitraum. Sie wird wie folgt berechnet:

$$Fläche = \frac{Konz0 - Konz1}{\ln(Konz0) - \ln(Konz1)} \times Tage$$

Das zeitgewichtete Mittel (zeitgew. Mittel) ist gleich der *Gesamtfläche* dividiert durch die *Gesamtanzahl Tage*.

Natürlich müßte die Tabelle für die *Daphnien*-Reproduktionsprüfung auf einen Zeitraum von 21 Tagen erweitert werden.

Klar ist, daß, wenn Beobachtungen nur am Anfang und am Ende eines jeden Erneuerungszeitraums erfolgen, nicht bestätigt werden kann, ob der Zerfallsprozeß tatsächlich exponentiell verläuft. Eine andere Kurve würde zu einer anderen Berechnung für die *Fläche* führen. Jedoch ist ein exponentieller Zerfallsprozeß durchaus plausibel und wahrscheinlich die beste Kurve, die bei Fehlen anderer Informationen zu verwenden ist.

Vorsicht ist allerdings geboten, wenn in der chemischen Analyse am Ende des Erneuerungszeitraums keine Substanz gefunden wird. Sofern keine Möglichkeit besteht, abzuschätzen, wie schnell die Substanz aus der Lösung verschwunden ist, ist es unmöglich, eine realistische Fläche unter der Kurve zu erhalten, und damit auch unmöglich, ein vernünftiges zeitgewichtetes Mittel zu bestimmen.