

(9) Kapitel C.10 erhält folgende Fassung:

## „C.10. SIMULATION DER AEROBEN ABWASSERBEHANDLUNG:

### C.10-A: BELEBTSCHLAMM - C.10-B: BIOFILME

#### C.10-A: Belebtschlamm

#### EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD *Test Guideline* (TG) 303 (2001). In den 1950er Jahren wurde erkannt, dass die neu auf dem Markt eingeführten Tenside in Kläranlagen und Flüssen exzessive Schaumbildung verursachten. Sie wurden bei der aeroben Behandlung nicht vollständig abgebaut und behinderten in einigen Fällen auch den Abbau anderer organischer Substanzen. Im Rahmen zahlreicher Untersuchungen wurde sodann geprüft, wie Tenside aus Abwässern entfernt werden könnten und ob neue industriell hergestellte chemische Stoffe für die Abwasserbehandlung geeignet sind. Dazu wurden Modellanlagen verwendet, die für die beiden wichtigsten Arten der aeroben biologischen Abwasserbehandlung (Belebtschlamm- und Tropfkörperverfahren) repräsentativ sind. Es wäre unpraktisch und sehr kostspielig gewesen, jede neu auf dem Markt eingeführte chemische Substanz auf kommunale Klärwerke zu verteilen und diese zu überwachen, selbst auf lokaler Basis.

#### AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

##### Belebtschlammanlagen

2. Es wurden Belebtschlamm-Modellanlagen in Größenordnungen von 300 ml bis ca. 2000 ml Fassungsvermögen beschrieben. Einige dieser Modellanlagen gewährleisteten realitätsnahe Bedingungen mit Absetztanks und Schlämmen, die in den Belüftungstank zurückgepumpt wurden, während andere ohne Absetzvorrichtungen betrieben wurden, siehe z. B. *Swisher* (1). Die Größe der Apparatur ist stets ein Kompromiss: Sie muss einerseits groß genug sein, um einen reibungslosen mechanischen Ablauf und Probenahmen in einem Umfang zu gewährleisten, der den Betrieb der Ablage nicht beeinträchtigt, darf jedoch andererseits nicht so groß sein, dass sie zu viel Platz und Materialien in Anspruch nimmt.
3. Zwei Apparaturen, die häufig eingesetzt wurden und sich bewährt haben, sind die Modellanlage vom Typ *Husmann* (2) und der Poröse Topf (*Porous Pot*) (3)(4), die als erste für die Untersuchung von Tensiden verwendet wurden; beide Modelle werden in diesem Kapitel näher beschrieben. Auch andere Modellanlagen, z. B. *Eckenfelder* (5), wurden mit Erfolg eingesetzt. Aufgrund des mit diesem Simulationstest verbundenen

relativ hohen Kosten- und Arbeitsaufwands wurde parallel dazu die Möglichkeit einfacherer und kostengünstigerer Screeningtests untersucht, die zurzeit in Kapitel C.4 (A-F) dieses Anhangs (6) beschrieben sind. Die Erfahrung mit zahlreichen Tensiden und anderen chemischen Substanzen hat gezeigt, dass sich Stoffe mit positiven („*pass*“) Ergebnissen im Screeningtest (auf leichte biologische Abbaubarkeit) auch im Simulationstest zersetzen. Einige der Stoffe mit negativen („*fail*“) Ergebnissen im Screeningtest reagierten positiv („*pass*“) im Test auf potenzielle (inhärente) Bioabbaubarkeit (Kapitel C.12 (7) und C.19 (8) dieses Anhangs), doch nur wenige Substanzen dieser letzten Gruppe zersetzen sich im Simulationstest, während Stoffe mit negativen Ergebnissen im Test auf inhärente Abbaubarkeit im Simulationstest nicht abgebaut wurden (9)(10)(11).

4. Für bestimmte Zwecke reichen Simulationstests, die stets unter denselben Prozessbedingungen durchgeführt werden, aus; die Ergebnisse dieser Tests werden als prozentuale Abnahme der Prüfsubstanz oder des gelösten organischen Kohlenstoffs (*Dissolved Organic Carbon*, DOC) ausgedrückt. Unter der vorliegenden Prüfmethode wird ein solcher Test beschrieben. Im Gegensatz zur vorherigen Version dieses Kapitels, die nur einen einzigen Apparaturtypus beschrieb, bei dem die Behandlung synthetischer Abwässer in gekoppelten Anlagen nach der relativ simplen Methode des Überschussschlammabzugs erfolgte, bietet diese aktuelle Version Variationsmöglichkeiten, d. h. es werden Alternativen für Apparaturtyp, Betriebsmodus, Abwässer und Überschussschlammabzug beschrieben. Der vorliegende Text lehnt sich eng an die ISO-Norm 11733 (12) an, die im Zuge der Ausarbeitung des Textes eingehend geprüft wurde, obgleich die Methode keinem Ringtest unterzogen wurde.
5. Für andere Zwecke muss die Konzentration der Prüfsubstanz im Ablauf genauer bekannt sein, und zur Bestimmung dieser Konzentration ist eine umfassendere Methode erforderlich. Beispielsweise muss die Schlammabzugsrate im Tagesverlauf und während der gesamten Prüfungsdauer präziser kontrolliert werden, und die Modellanlagen müssen bei verschiedenen Abzugsraten betrieben werden. Damit die Methode in jeder Hinsicht umfassend ist, sollten die Tests auch unter zwei oder drei verschiedenen Temperaturbedingungen durchgeführt werden: Eine derartige Methode wird von *Birch* (13)(14) beschrieben und ist in Anlage 6 zusammengefasst. Der aktuelle Wissensstand reicht jedoch nicht aus, um entscheiden zu können, welches der kinetischen Modelle zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit chemischer Substanzen bei der Abwasserbehandlung und im Wassermilieu im Allgemeinen geeignet ist. Die Anwendung der Monod-Kinetik (siehe Beispielfall in Anlage 6) ist auf chemische Substanzen begrenzt, die in Konzentrationen von 1 mg/l oder mehr präsent sind, wengleich auch die Meinung vertreten wird, dass selbst dies zu beweisen ist. Tests bei Konzentrationen, die die Konzentrationen in Abwässern akkurater widerspiegeln, sind in Anlage 7 beschrieben, werden jedoch, ebenso wie die Tests in Anhang 6, nicht als eigenständige Prüfmethode geführt, sondern lediglich in den Anlagen genannt.

### *Filtration*

6. Sehr viel weniger Arbeit wurde in Modell-Tropfkörper investiert, vielleicht, weil sie aufwändiger und weniger kompakt sind als Modell-Belebtschlammanlagen. *Gerike et al* entwickelten Tropfkörperanlagen und betrieben sie im Koppelmodus

(15). Die Filter waren relativ groß (2 m hoch mit einem Fassungsvermögen von 60 l) und für jeden einzelnen waren 2 l/Std. Abwasser erforderlich. *Baumann et al* (16) simulierten Tropfkörper, indem 1 m lange Röhren (mit 14 mm Innendurchmesser) mit zuvor für 30 Minuten in Belebtschlammkonzentrat getränkten Polyester-Vliesstreifen ausgekleidet wurden. Die Prüfsubstanz wurde als einzige C-Quelle in einer Mineralsalzlösung in die vertikal angeordnete Röhre gegeben, und die biologische Abbaubarkeit wurde durch Messung des DOC im Ablauf und des CO<sub>2</sub> im austretenden Gas bestimmt.

7. Biofilter wurden auf andere Weise simuliert (15): Die Innenwandungen von Drehrohren, in einem kleinen Neigungswinkel zur Horizontalen angeordnet, wurden mit Abwasser (ungefähr 250 ml/Std.) mit und ohne Zusatz von Prüfsubstanz beaufschlagt, und die gesammelten Abläufe wurden auf DOC und/oder die betreffende Prüfsubstanz analysiert.

## PRINZIP DER PRÜFMETHODE

8. Dieses Verfahren ist ausgelegt, um die Elimination und den Primär- und/oder den vollständigen biologischen Abbau wasserlöslicher organischer Substanzen durch aerobe Mikroorganismen in einem das Belebtschlammverfahren simulierenden kontinuierlich betriebenen Prüfsystem bestimmt werden. Ein leicht biologisch abbaubares organisches Medium und die organische Prüfsubstanz dienen als C-Quellen und Energiequellen für die Mikroorganismen.
9. Zwei kontinuierlich betriebene Prüfsysteme (Belebtschlamm- oder *Porous-Pot*-Anlagen) werden unter identischen Bedingungen, die je nach Prüfungszweck festgelegt werden, parallel betrieben. In der Regel betragen die mittlere hydraulische Verweilzeit 6 Stunden und das mittlere Schlammalter (Schlammverweilzeit) 6 bis 10 Tage. Überschussschlamm wird nach einer von zwei Methoden abgezogen, und der Zulauf (organisches Medium) von ausschließlich einer der beiden Prüfanlagen wird mit Prüfsubstanz einer Konzentration von üblicherweise 10 mg/l DOC bis 20 mg/l DOC beschickt. Die zweite Anlage fungiert als Kontrollanlage zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit des organischen Mediums.
10. Anhand häufig gezogener Ablaufproben werden durch spezifische Analyse der DOC (vorzugsweise) oder der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) sowie die Prüfsubstanzkonzentration (soweit erforderlich) im Ablauf der mit der Prüfsubstanz beschickten Anlage bestimmt. Es wird davon ausgegangen, dass die Differenz zwischen den DOC- oder CSB-Konzentrationen in den Abläufen der Prüf- und der Kontrollanlage auf die Prüfsubstanz oder ihre organischen Stoffwechselprodukte zurückzuführen ist. Um die Elimination der Prüfsubstanz zu ermitteln, wird diese Differenz mit der durch die zugeführte Prüfsubstanz bedingten DOC- oder CSB-Konzentration im Zulauf verglichen.
11. In der Regel lässt sich biologische Abbaubarkeit durch sorgfältige Prüfung der Konzentrations-Zeit-Kurve der Elimination von der Bioadsorption unterscheiden; dies kann gewöhnlich durch einen Test auf leichte biologische Abbaubarkeit, bei dem ein akklimatisiertes Inokulum aus der mit der Prüfsubstanz beaufschlagten Anlage zum Einsatz kommt, bestätigt werden.

## ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

12. Die Reinheits-, Wasserlöslichkeits-, Flüchtigkeits- und Adsorptionsmerkmale der Prüfsubstanz sollten bekannt sein, um eine akkurate Ergebnisauswertung zu ermöglichen. Normalerweise können flüchtige und nicht lösliche chemische Substanzen nur getestet werden, wenn besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden (siehe Anlage 5). Auch die chemische Struktur oder zumindest die empirische Formel sollten bekannt sein, um theoretische Werte berechnen und/oder gemessene Parameterwerte (z. B. für den theoretischen Sauerstoffbedarf (*Theoretical Oxygen Demand*, ThOD), den gelösten organischen Kohlenstoff (*Dissolved organic carbon*, DOC) und den chemischen Sauerstoffbedarf (CSB)) überprüfen zu können.
13. Informationen über die Toxizität der Prüfsubstanz für Mikroorganismen (siehe Anlage 4) können für die Wahl geeigneter Testkonzentrationen zweckdienlich und für die korrekte Auswertung niedriger Abbaubarkeitswerte ausschlaggebend sein.

## NEGATIVE / POSITIVE TESTERGEBNISSE (PASS/FAIL)

14. Bei der ersten Anwendung dieses Simulationstests (Bestätigungstest) zur Bestimmung der primären Bioabbaubarkeit von Tensiden müssen über 80 % der betreffenden chemischen Substanz abgebaut werden, bevor das Tensid in den Verkehr gebracht werden kann. Werden diese 80 % nicht erreicht, kann der vorliegende Simulationstest (Bestätigungstest) durchgeführt werden, und das Tensid darf nur in den Verkehr gebracht werden, wenn über 90 % der betreffenden chemischen Substanz abgebaut wurden. Im Allgemeinen stellt sich die *Pass-/Fail*-Frage bei chemischen Substanzen nicht, und der Wert der prozentualen Abnahme kann zur approximativen Berechnung der wahrscheinlichen Umweltkonzentration einer chemischen Substanz verwendet werden, die zur Analyse der von chemischen Substanzen ausgehenden Gefahren erforderlich ist. Testergebnisse folgen in der Regel dem Schema „Alles oder Nichts“. Einige Untersuchungen reiner Chemikalien haben in mehr als drei Viertel aller Fälle eine prozentuale DOC-Abnahme von > 90 % und bei über 90 % der Substanzen, die sich als in signifikantem Maße biologisch abbaubar erwiesen haben, von > 80 % ergeben.
15. Relativ wenige chemische Substanzen (z. B. Tenside) sind in den für diese Prüfung verwendeten Konzentrationen (ungefähr 10 mg C/l) in Abwässern vorhanden. Einige Substanzen manifestieren in diesen Konzentrationen möglicherweise eine Hemmwirkung, bei anderen kann die Abnahmegeschwindigkeit bei niedrigen Konzentrationen unterschiedlich sein. Die Zersetzung könnte mit modifizierten Methoden, bei denen die Prüfsubstanz realitätsnäher in niedrigen Konzentrationen verwendet wird, akkurater bewertet und die so erhobenen Daten könnten zur Berechnung von kinetischen Konstanten verwendet werden. Die hierzu erforderlichen Versuchstechniken sind jedoch noch nicht umfassend validiert, und auch die kinetischen Modelle zur Beschreibung der beim biologischen Abbau stattfindenden Reaktionen liegen noch nicht fest (siehe Anlage 7).

## REFERENZSUBSTANZEN

16. Um sicherzustellen, dass das Testverfahren korrekt durchgeführt wird, ist es sinnvoll, gelegentlich parallel zur Untersuchung der Prüfsubstanz auch andere Substanzen zu analysieren, deren Verhalten bekannt ist. Dazu zählen Adipinsäure, 2-Phenylphenol, 1-Naphthol, Diphensäure, 1-Naphthoesäure usw. (9)(10)(11).

## REPRODUZIERBARKEIT VON TESTERGEBNISSEN

17. Es gibt wesentlich weniger Studienberichte über Simulationstests als über Tests auf leichte Bioabbaubarkeit. Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zwischen (Simultan-)Replikaten ist gut (10 % bis 15 %) bei Prüfsubstanzen, die zu mindestens 80 % abgebaut werden, bei weniger gut abgebauten Substanzen ist die Schwankungsbreite jedoch größer. Bei bestimmten grenzwertigen Substanzen wurden innerhalb des neunwöchigen Prüfungszeitraums mitunter auch weit auseinanderliegende Ergebnisse (z. B. 10%, 90%) verzeichnet.
18. Bei den mit den beiden Apparaturtypen erzielten Ergebnissen zeigten sich nur geringe Unterschiede, einige chemische Substanzen wurden in Haushaltsabwasser jedoch umfassender und konsistenter abgebaut als in synthetischem Abwasser (OECD).

## BESCHREIBUNG DES PRÜFVERFAHRENS

### Geräte

#### *Prüfsystem*

19. Das Prüfsystem für eine Prüfsubstanz umfasst eine Prüfanlage und eine Kontrollanlage; werden jedoch nur spezifische Analysen durchgeführt (primäre Bioabbaubarkeit), ist nur eine Prüfanlage erforderlich. Eine Kontrollanlage kann für mehrere Prüfanlagen verwendet werden, die entweder mit derselben oder mit unterschiedlichen Prüfsubstanzen beschickt werden. Bei gekoppelten Anlagen (Anlage 3) muss jede Prüfanlage über eine separate Kontrollanlage verfügen. Beim Prüfsystem kann es sich entweder um eine Belebtschlamm-Modellanlage vom Typ *Husmann* (Anlage 1, Abbildung 1) oder um eine *Porous-Pot*-Anlage (Anlage 1, Abbildung 2) handeln. In beiden Fällen sind ausreichend große Vorrats-/Sammelgefäße für die Zu- bzw. Abläufe erforderlich, ebenso wie Pumpen zur Dosierung des Zustroms (entweder mit Prüfsubstanzlösung gemischt oder separat).
20. Jede Belebtschlammanlage besteht aus einem Belüftungsgefäß (Belebung) mit einem bekannten Fassungsvermögen von ca. 3 Liter Belebtschlamm und einem Absetzgefäß (Nachklärung) eines Fassungsvermögens von ungefähr 1,5 Litern; durch Regelung der Höhe des Absetzgefäßes können die Füllmengen bis zu einem bestimmten Grad geändert werden. Gefäße anderer Größen sind zulässig, wenn vergleichbare hydraulische Frachten eingehalten werden. Ist es nicht möglich, die Temperatur im Prüfraum im gewünschten Bereich zu halten, wird die Verwendung von wasserummantelten Gefäßen (temperiertes Wasser) empfohlen. Für die

kontinuierliche oder intermittente Rückführung von Belebtschlamm aus dem Absetzgefäß ins Belüftungsgefäß wird eine Druckluft- oder Dosierpumpe verwendet.

21. Das *Porous-Pot*-System besteht aus einem porösen inneren Zylinder mit konischem Boden, der in einem geringfügig größeren, aus undurchlässigem Kunststoff bestehenden formgleichen Gefäß fixiert ist. Als Material für das poröse Gefäß ist poröses Polyethylen einer Porengröße von maximal 90 µm und 2 mm Dicke geeignet. Der Schlamm wird durch die Filtrierwirkung der porösen Wand vom behandelten organischen Medium abgetrennt. Der Ablauf sammelt sich in dem ringförmigen Bereich, von dem aus er in das Sammelgefäß überfließt. Da kein Absetzen erfolgt, gibt es auch keine Schlammrückführung. Das gesamte System kann in einem thermostatisch kontrollierten Wasserbad montiert werden. Poröse Töpfe können in den Anfangsstadien verstopfen und überlaufen. In diesem Fall wird die poröse Auskleidung erneuert; dazu wird zunächst der Schlamm aus dem Topf in einen sauberen Eimer abgeschlaucht und die verstopfte Innenauskleidung wird entfernt. Der undurchlässige äußere Zylinder wird ausgewischt, eine saubere Auskleidung wird eingesetzt und der Schlamm wird in den Topf zurückgeführt. Außerdem werden alle an den Rändern der verstopften Innenauskleidung anhaftenden Schlammreste sorgfältig abgeschabt und ebenfalls zurück in den Topf transferiert. Verstopfte Töpfe werden zunächst mit einem feinen Wasserstrahl gesäubert, um Schlammreste zu entfernen; anschließend wird das Gerät zunächst in verdünnte Natriumhypochlorit-Lösung, dann in Wasser gesetzt und gründlich mit Wasser abgespült.
22. Die Belüftung des Schlammes in den Belüftungsgefäßen beider Systeme erfordert geeignete Verfahren, z. B. gesinterte Würfel (Sprudelsteine) und Druckluft. Die Luft muss bei Bedarf gesäubert werden, indem sie durch einen geeigneten Filter geleitet und gewaschen wird. Das System muss ausreichend belüftet werden, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten und die Schlammflocken während des Prüfungsvorgangs in ständiger Suspension zu halten.

#### *Filtrationsgerät oder Zentrifuge*

23. Gerät zur Filtration von Proben mit Membranfiltern einer geeigneten Porenweite (Nennöffnungsdurchmesser 0,45 µm), die lösliche organische Substanzen adsorbieren und ein Minimum an organischem Kohlenstoff freisetzen. Bei Verwendung von Filtern, die organischen Kohlenstoff freisetzen, sind die Filter sorgfältig mit heißem Wasser zu waschen, um den Kohlenstoff zu entfernen. Alternativ kann eine Zentrifuge einer Kapazität von 40 000 m/s<sup>2</sup> verwendet werden.

#### *Analysegerät*

24. Apparatur zur Bestimmung folgender Größen:
  - DOC (gelöster organischer Kohlenstoff) und TOC (gesamter organischer Kohlenstoff) oder CSB (chemischer Sauerstoffbedarf);
  - bestimmte chemische Substanz, soweit erforderlich;
  - suspendierte Feststoffe, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration im Wasser;
  - Temperatur, Azidität und Alkalinität;

- Ammonium, Nitrit und Nitrat, wenn der Test unter nitrifizierenden Bedingungen durchgeführt wird.

#### *Wasser*

25. Leitungswasser (Trinkwasser) mit einem DOC-Gehalt von weniger als 3 mg/l. Soweit nicht bereits bekannt, die Alkalinität bestimmen.
26. Deionisiertes Wasser mit einem DOC-Gehalt von weniger als 2 mg/l DOC.

#### *Organisches Medium*

27. Als organisches Medium kommt synthetisches Abwasser, Haushaltsabwasser oder eine Mischung aus beiden Abwasserarten in Frage. Es hat sich gezeigt (11)(14), dass die alleinige Verwendung von Haushaltsabwasser oft zu einer höheren prozentualen DOC-Abnahme führt und selbst die Abnahme und den biologischen Abbau bestimmter chemischer Substanzen fördert, die bei Verwendung von synthetischem Abwasser (OECD) nicht abgebaut werden. Außerdem wirkt die konstante oder intermittente Zugabe von Haushaltsabwasser auf den Belebtschlamm, einschließlich der entscheidenden Absetzfähigkeit, häufig stabilisierend. Die Verwendung von Haushaltsabwasser wird demnach empfohlen. Bei jeder neuen Charge von organischem Medium die DOC- oder die CSB-Konzentration messen. Die Azidität oder Alkalinität des organischen Mediums sollte bekannt sein. Das organische Medium kann die Zugabe einer geeigneten Pufferlösung (Natriumhydrogencarbonat oder Kaliumdihydrogenphosphat) erfordern, wenn die Azidität oder Alkalinität gering ist, um während des Tests einen pH-Wert von etwa  $7,5 \pm 0,5$  im Belüftungsgefäß zu gewährleisten. Wieviel Pufferlösung zuzugeben ist und wann, muss auf Fallbasis entschieden werden. Werden kontinuierlich oder intermittierend Abwassermischungen verwendet, muss der DOC-Wert (oder der CSB-Wert) der Mischung möglichst konstant gehalten werden, z. B. durch Verdünnung mit Wasser.

#### *Synthetisches Abwasser*

28. In jedem Liter Leitungswasser Folgendes auflösen: 160 mg Pepton; 110 mg Fleischextrakt; 30 mg Harnstoff; 28 mg wasserfreies Dikaliumhydrogen-phosphat ( $K_2HPO_4$ ); 7 mg Natriumchlorid ( $NaCl$ ); 4 mg Calciumchlorid-Dihydrat ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ); 2 mg Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ ). Dieses synthetische Abwasser (OECD) hat Beispielcharakter und ergibt eine mittlere DOC-Konzentration im Zulauf von etwa 100 mg/l. Alternativ können andere Zusammensetzungen mit ähnlicher DOC-Konzentration verwendet werden, die realitätsnäher sind. Ist ein weniger konzentrierter Zulauf erforderlich, das synthetische Abwasser mit Leitungswasser verdünnen, beispielsweise im Verhältnis 1:1, um eine Konzentration von ungefähr 50 mg/l zu erhalten. Ein derart verdünnter Zulauf fördert das Wachstum nitrifizierender Organismen, und diese Modifikation sollte vorgenommen werden, wenn die Simulation nitrifizierender Kläranlagen untersucht werden soll. Dieses synthetische Abwasser kann aus destilliertem Wasser in konzentrierter Form hergestellt und bis zu einer Woche bei ungefähr 1 °C gelagert werden. Bei Bedarf mit Leitungswasser verdünnen. (Dieses Medium ist eher ungeeignet, weil die Stickstoffkonzentration sehr hoch und der Kohlenstoffgehalt relativ niedrig ist; es gibt jedoch keine besseren Empfehlungen, außer Hinzufügung

von mehr Phosphat als Puffer und zusätzlichem Pepton).

### *Haushaltsabwasser*

29. Es sollte frisch abgesetztes Abwasser verwendet werden, das täglich von einer vorwiegend Haushaltsabwässer behandelnden Kläranlage bezogen wird. Es sollte vor der Vorklärung aus der Ablaufrinne des Vorklärbeckens oder aus dem Beschickungswasser der Belebtschlammanlage gezogen werden und weitgehend frei von Grobstoffen sein. Das Abwasser kann nach mehrtägiger, jedoch höchstens siebentägiger Lagerung bei 4 °C verwendet werden, sofern erwiesen ist, dass der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) (oder der chemische Sauerstoffbedarf, CSB) während der Lagerung nicht wesentlich (d. h. um weniger als 20 %) abgenommen hat. Um Störungen des Systems zu vermeiden, sollte der DOC (oder der CSB) jedes neuen Ansatzes vor dessen Verwendung auf einen geeigneten konstanten Wert eingestellt werden, z. B. durch Verdünnung mit Leitungswasser.

### *Belebtschlamm*

30. Zur Beimpfung Belebtschlamm aus dem Belüftungsbecken einer ordnungsgemäß betriebenen Kläranlage oder einer Labor-Belebtschlammanlage entnehmen, die vorwiegend Haushaltsabwässer behandeln.

### *Stammlösungen der Prüfsubstanz*

31. Für angemessen lösliche chemische Substanzen in geeigneten Konzentrationen (z. B. 1 bis 5 g/l) in entionisiertem Wasser oder in einer mineralischen Kulturlösung aus synthetischem Abwasser Stammlösungen ansetzen (für nicht lösliche und flüchtige Chemikalien siehe Anlage 5). Den DOC- und den TOC-Wert der Stammlösung bestimmen und die Messungen bei jeder neuen Charge wiederholen. Bei einer Differenz zwischen DOC und TOC von mehr als 20 % die Wasserlöslichkeit der Prüfsubstanz überprüfen. Den DOC oder die durch spezifische Analyse der Stammlösung gemessene Konzentration der Prüfsubstanz mit dem Nennwert vergleichen, um festzustellen, ob die Wiederfindungsrate ausreicht (in der Regel kann mit > 90 % gerechnet werden). Vor allem bei Dispersionen ist festzustellen, ob der DOC als Analyseparameter verwendet werden kann oder nicht oder ob nur ein prüfsubstanzspezifisches Analyseverfahren angewendet werden kann. Bei Dispersionen müssen die Proben zentrifugiert werden. Für jede neue Charge den DOC, den CSB bzw. die Prüfsubstanz durch spezifische Analyse messen.
32. Den pH-Wert der Stammlösung bestimmen. Extremwerte zeigen an, dass die Zugabe der chemischen Substanz den pH-Wert des Belebtschlamm im Prüfsystem beeinflussen kann. In diesem Fall die Stammlösung mit kleinen Mengen anorganischer Säure oder Base neutralisieren, um einen pH-Wert von  $7 \pm 0,5$  zu erhalten, wobei eine Ausfällung der Prüfsubstanz zu vermeiden ist.



## PRÜFVERFAHREN

33. Das beschriebene Verfahren betrifft Belebtschlammanlagen; es muss für das *Porous-Pot*-System in bestimmten Punkten angepasst werden.

### *Vorbereitung des Inokulums*

34. Das Prüfsystem zu Testbeginn entweder mit Belebtschlamm oder mit einem Inokulum animpfen, das eine geringe Konzentration an Mikroorganismen enthält. Das Inokulum bis zu seiner Verwendung (innerhalb von 24 Stunden) bei Raumtemperatur unter aeroben Bedingungen aufbewahren. Im ersten Fall (Verwendung von Belebtschlamm) aus dem Belüftungsbecken einer ordnungsgemäß betriebenen biologischen Kläranlage oder einer Laborkläranlage, die vorwiegend mit Haushaltsabwasser betrieben wird, eine Schlammprobe ziehen. Sollen nitrifizierende Bedingungen simuliert werden, den Schlamm aus einer nitrifizierenden Kläranlage beziehen. Die Konzentration der suspendierten Feststoffe bestimmen und den Schlamm bei Bedarf durch Absetzen eindicken, so dass dem Prüfsystem nur eine minimale Schlammmenge zugeführt werden muss. Die Anfangskonzentration der Trockensubstanz sollte ungefähr 2,5 g/l betragen.
35. Im zweiten Fall (Inokulum) 2 bis 10 ml/l Ablauf aus einer biologischen Kläranlage für Haushaltsabwasser verwenden. Um möglichst viele unterschiedliche Bakterienarten zu erhalten, kann es sinnvoll sein, auch Inokula aus diversen anderen Quellen wie Oberflächenwasser zuzuführen. In diesem Fall wird sich der Belebtschlamm im Prüfsystem entwickeln und vermehren.

### *Zudosierung des organischen Mediums*

36. Zulauf- und Ablaufbehälter und Schlauchleitungen aus den Zulauf- und zu den Ablaufgefäßen vor und während des Tests gründlich reinigen, um Mikrobenbewuchs zu entfernen. Die Prüfsysteme in einem temperaturkontrollierten Raum (übliche Temperaturspanne: 20-25° C) montieren oder wasserummantelte Testgefäße verwenden. Eine ausreichende Menge des benötigten organischen Mediums (Nummern 27-29) zubereiten. Zunächst Belüftungs- und Absetzungsgefäß (Separator) mit organischem Medium füllen und Inokulum zusetzen (Nummern 34, 35). Die Belüftung so einstellen, dass der Schlamm unter aeroben Bedingungen dauerhaft suspendiert ist; anschließend Zulaufdosisierung und Schlammrückführung einleiten. Organisches Medium aus den Vorrats- in die Belüftungsgefäße (Nummern 20, 21) der Prüf- und der Kontrollanlage zudosieren, und die jeweiligen Abläufe in entsprechenden Sammelgefäßen auffangen. Um die normale hydraulische Verweilzeit von 6 Std. zu erreichen, organisches Medium in einem Volumen von 0,5 l/Std. zupumpen. Zur Bestätigung durch Messung des Volumenrückgangs in den Vorratsgefäßen die zudosierte Tagesmenge an organischem Medium ermitteln. Zur Bestimmung der Effekte der intermittenten Freisetzung von chemischen Substanzen und der Stoßbelastung (*shock loading*) des Systems mit diesen Substanzen wären andere Dosisierungsmodi erforderlich.
37. Soll das vorbereitete organische Medium für länger als einen Tag verwendet werden,

muss es auf ungefähr 4 °C gekühlt oder auf andere Weise haltbar gemacht werden, um Mikrowachstum und biologischen Abbau außerhalb der Prüfanlagen zu vermeiden (Nummer 29). Werden synthetische Abwässer verwendet, kann eine konzentrierte Stammlösung (z. B. das Zehnfache der normalen Konzentration; Nummer 28) vorbereitet und bei etwa 4 °C gelagert werden. Diese Stammlösung kann vor ihrer Verwendung mit einer entsprechenden Menge Leitungswasser gründlich durchgemischt oder - alternativ – direkt zugepumpt werden, während die entsprechende Menge Leitungswasser separat zugepumpt wird.

#### *Zudosierung der Prüfsubstanz*

38. Eine geeignete Menge Stammlösung der Prüfsubstanz (Nummer 31) in das Vorratsgefäß des Zulaufs geben oder mittels einer separaten Dosierpumpe direkt in das Belüftungsgefäß pumpen. Die normale mittlere Testkonzentration im Zulauf sollte 10 bis 20 mg/l DOC betragen, wobei die Höchstkonzentration von 50 mg/l nicht überschritten werden sollte. Ist die Wasserlöslichkeit der Prüfsubstanz gering oder ist mit toxischen Effekten zu rechnen, ist die Konzentration auf 5 mg/l DOC oder auch weniger zu reduzieren, allerdings nur, wenn eine geeignete spezifische Analyseverfahren verfügbar ist und angewendet wird (schlecht wasserlösliche dispergierte Prüfsubstanzen können nach besonderen Dosiermethoden zugesetzt werden; siehe Anlage 5).
39. Die Prüfsubstanz zusetzen, sobald sich das System stabilisiert und der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) im organischen Medium weitgehend (um etwa 80 %) abgenommen hat. Es muss sichergestellt werden, dass alle Anlagen mit gleicher Wirksamkeit funktionieren, bevor die Prüfsubstanz zugesetzt wird; ist dies nicht der Fall, ist es in der Regel sinnvoll, die einzelnen Schlämme zu mischen und die einzelnen Anlagen erneut mit identischen Schlammengen zu beschicken. Wird ein Inokulum aus (etwa) 2,5 g/l (Trockengewicht) Belebtschlamm verwendet, so kann die Prüfsubstanz ab Testbeginn zugesetzt werden, denn die direkte Zugabe steigender Mengen von Testbeginn an hat den Vorteil, dass der Belebtschlamm möglicherweise besser an die Prüfsubstanz adaptiert wird. Wie immer die Prüfsubstanz zugegeben wird, empfiehlt es sich, die Dosierrate und/oder die Mengen in den Vorratsgefäßen regelmäßig zu messen.

#### *Handhabung von Belebtschlamm*

40. Je nach Qualität und Konzentration des organischen Mediums, Betriebsbedingungen, Art der vorhandenen Mikroorganismen und Einfluss der Prüfsubstanz und unabhängig vom verwendeten Inokulum stabilisiert sich die Konzentration der Belebtschlamm-Feststoffe während der Prüfung in der Regel im Bereich von 1 bis 3 g/l (Trockengewicht).
41. Entweder die in den Belüftungsgefäßen suspendierten Feststoffe mindestens wöchentlich bestimmen, wobei der Überschussschlamm verworfen wird, um die Konzentration zwischen 1 und 3 g/l (Trockengewicht) zu halten, oder das mittlere Schlammalter auf einem konstanten Wert (gewöhnlich innerhalb einer Bandbreite von 6 bis 10 Tagen) halten. Wird beispielsweise eine Schlammverweilzeit (*sludge retention time*, SRT) von 8 Tagen gewählt, sollte täglich 1/8 der im Belüftungsgefäß befindlichen Belebtschlammmenge abgezogen und verworfen werden. Dieser

Vorgang ist täglich oder, vorzugsweise, mithilfe einer intermittent arbeitenden automatischen Pumpe zu wiederholen. Das Halten der Konzentration suspendierter Feststoffe auf einem konstanten Wert oder innerhalb einer engen Bandbreite garantiert keine konstante Schlammverweilzeit; letztere ist die Betriebsvariable, die den Wert der Prüfsubstanzkonzentration im Ablauf bestimmt.

42. Während der gesamten Prüfungsdauer zumindest täglich den an den Wänden des Belüftungs- und des Absetzungsgefäßes (Separator) anhaftenden Schlamm entfernen und resuspendieren. Alle Röhren und Schlauchleitungen regelmäßig kontrollieren und reinigen, um einen Bewuchs mit Biofilm zu vermeiden. Abgesetzten Schlamm aus dem Absetzungsgefäß (Separator) in das Belüftungsgefäß zurückführen, vorzugsweise durch intermittentes Pumpen. Beim *Porous-Pot*-System gibt es keine Schlammrückführung; es ist jedoch sicherzustellen, dass saubere Innentöpfe eingesetzt werden, bevor das Gefäßvolumen signifikant ansteigt (Nummer 21).
43. Bei *Husmann*-Anlagen kann es vorkommen, dass sich der Schlamm schlecht absetzt und verlorengeht. Diese Mängel können in Prüf- und Kontrollanlagen mit einer oder mehreren der nachstehend angeführten Maßnahmen zeitgleich behoben werden:
- Regelmäßige, z. B. wöchentliche Zuführung von frischem Schlamm oder Flockungsmittel (z. B. je Gefäß 2 ml einer 50 g/l-FeCl<sub>3</sub>-Lösung), wobei jedoch sicherzustellen ist, dass es nicht zu einer Reaktion oder Präzipitation der Prüfsubstanz mit FeCl<sub>3</sub> kommt;
  - Ersetzung der Druckluftpumpe durch eine Peristaltikpumpe, um einen dem zuzuführenden Zulauf in etwa entsprechenden Schlammrücklauf und die Entwicklung eines anaeroben Milieus im abgesetzten Schlamm zu ermöglichen (die Geometrie der Druckluftpumpe begrenzt den Mindestdurchfluss des Rücklaufschlammes auf ungefähr das 12-fache der Zulaufmenge);
  - intermittentes Zupumpen von Schlamm aus dem Absetzungsgefäß (Separator) in das Belüftungsgefäß (z. B. für 5 Minuten alle 2,5 Std, um statt 1 Liter/Std. 1,5 Liter/Std. zurückzuführen);
  - Verwendung eines nichttoxischen schwach konzentrierten Antischaummittels (z. B. Silikonöl) zur Vermeidung von Verlusten durch Schaumbildung;
  - kurze Luftchockstöße durch den Schlamm im Absetzungsgefäß (Separator) (z. B. stündlich 10 Sekunden);
  - Intervалldosierung des organischen Medium in das Belüftungsgefäß (z. B. stündlich für jeweils 3 bis 10 Minuten).

#### *Probenahme und Analytik*

44. Konzentration an gelöstem Sauerstoff, Temperatur und pH-Wert des Belebtschlammes in den Belüftungsgefäßen in regelmäßigen Zeitabständen messen. Dabei ist sicherzustellen, dass stets ausreichend Sauerstoff vorhanden ist (> 2 mg/l) und die Temperatur innerhalb der erforderlichen Spanne (normalerweise zwischen 20 und 25 °C) liegt. Durch Zudosierung von kleinen Mengen einer anorganischen Base oder Säure ins Belüftungsgefäß oder in den Zulauf oder durch Erhöhung der Pufferkapazität des organischen Mediums (siehe Nummer 27) den pH-Wert auf  $7,5 \pm 0,5$  konstant halten. Kommt es zur Nitrifikation, entsteht Säure, d. h. bei Oxidation

von 1 mg N wird das Äquivalent von ungefähr 7 mg  $\text{CO}_3^{2-}$  erzeugt. Die Häufigkeit der Messung richtet sich nach dem Messparameter und der Systemstabilität und kann zwischen täglich und wöchentlich variieren.

45. Den DOC- bzw. den CSB-Wert in den Kontroll- und Prüfgefäßzuläufen messen. Die Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf der Prüfanlage durch spezifische Analyse messen oder anhand der Konzentration in der Stammlösung (Nummer 31), der verwendeten Menge und der der Prüfanlage zudosierten Abwassermenge schätzen. Es empfiehlt sich, die Konzentration der Prüfsubstanz zu berechnen, um die Streuung der Konzentrationsdaten zu verringern.
46. Aus (z. B. über 24 Stunden) gesammeltem Ablauf geeignete Proben ziehen und durch eine Membran einer Porengröße von  $0,45 \mu\text{m}$  filtern oder bei  $40\,000 \text{ m/s}^2$  für ungefähr 15 Min. zentrifugieren. Erweist sich das Filtern als schwierig, sollte zentrifugiert werden. Der DOC- bzw. der CSB-Wert sollte mindestens doppelt bestimmt werden, um die vollständige Bioabbaubarkeit zu ermitteln; die primäre Bioabbaubarkeit erforderlichenfalls durch eine prüfsubstanzspezifische Analyse messen.
47. Die Verwendung des CSB-Wertes kann bei geringen Konzentrationen zu analytischen Problemen führen und wird daher nur empfohlen, wenn eine ausreichend hohe Prüfkonzentration (etwa  $30 \text{ mg/l}$ ) verwendet wird. Bei stark adsorbierenden chemischen Substanzen sollte nach einem prüfsubstanzspezifischen Analyseverfahren auch die Menge der adsorbierten chemischen Substanz im Schlamm gemessen werden.
48. Die Probenahmehäufigkeit richtet sich nach der voraussichtlichen Prüfungsdauer. Empfohlen werden Probenahmen dreimal wöchentlich. Sobald die Anlagen ordnungsgemäß funktionieren, sollten nach der Beschickung mit Prüfsubstanz bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustands (*steady state*) 1 bis maximal 6 Wochen vorgesehen werden. In der Plateau-Phase (Nummer 59), die in der Regel 3 Wochen anhält, sollten wenn möglich mindestens 15 gültige Werte ermittelt werden, um das Prüfungsergebnis auswerten zu können. Die Prüfung kann abgeschlossen werden, wenn ein ausreichender Eliminationsgrad erreicht ist (z. B.  $> 90 \%$ ) und die genannten 15 Werte aus Analysen, die drei Wochen lang an jedem Wochentag durchgeführt wurden, vorliegen. Faustregel: Nach Zugabe der Prüfsubstanz sollte eine Prüfungsdauer von 12 Wochen nicht überschritten werden.
49. Nitrifiziert der Schlamm und sollen die Auswirkungen der Prüfsubstanz auf die Nitrifikation untersucht werden, sind Proben aus dem Ablauf der Prüf- und der Kontrollanlage mindestens einmal wöchentlich auf Ammonium und/oder Nitrit sowie Nitrat zu untersuchen.
50. Alle Analysen sollten zügig durchgeführt werden; dies gilt vor allem für Stickstoffbestimmungen. Müssen Analysen aufgeschoben werden, sind die Proben bei etwa  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  in randvollen, dicht verschlossenen Flaschen dunkel zu lagern. Müssen Proben für länger als 48 Stunden gelagert werden, sind sie durch Tiefgefrieren, Ansäuern (z. B. mit  $10 \text{ ml/l}$  einer  $400 \text{ g/l}$ -Lösung Schwefelsäure) oder Zugabe einer geeigneten toxischen Substanz (z. B.  $20 \text{ ml/l}$  einer  $10 \text{ g/l}$ -Lösung Quecksilber-(II)-Chlorid) haltbar zu machen. Dabei ist sicherzustellen, dass die angewandte

Konservierungsmethode die Analyseergebnisse nicht beeinträchtigt.

### *Koppeln von Prüfanlagen*

51. Bei Anlagenkopplung (Anlage 3) täglich dieselbe Menge Belebtschlamm (150 ml - 1500 ml für Belüftungsgefäße eines Fassungsvermögens von 3 Litern Liquorkultur) zwischen den Belüftungsgefäßen der Prüf- und der Kontrollanlage austauschen. Lagert sich die Prüfsubstanz stark an den Schlamm an, nur den Überstand der Absetzungsgefäße (Separatoren) austauschen. In beiden Fällen wird Berechnung der Prüfungsergebnisse einen Berichtigungsfaktor anwenden (Nummer 55).

## **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

### **Auswertung der Ergebnisse**

52. Den Prozentsatz der Elimination der Prüfsubstanz, basierend auf der DOC- bzw. der CSB-Messung, in den vorgegebenen Zeitabständen nach folgender Gleichung berechnen:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

Dabei sind

$D_t$  = der DOC- bzw. CSB-Eliminationsgrad (in %) zum Zeitpunkt t

$C_s$  = der DOC- bzw. CSB-Wert der Prüfsubstanz im Zulauf, vorzugsweise anhand der Stammlösung geschätzt (mg/l)

$E$  = der gemessene DOC- oder CSB-Wert im Ablauf der Prüfanlage zum Zeitpunkt t (mg/l)

$E_o$  = der gemessene DOC- oder CSB-Wert im Ablauf der Kontrollanlage zum Zeitpunkt t (mg/l)

53. Der Grad der Elimination des organischen Mediums in der Kontrollanlage, basierend auf der DOC- bzw. der CSB-Messung, ist eine nützliche Größe für die Beurteilung der Bioabbauaktivität des Belebtschlammes während der Prüfung. Die prozentuale Elimination nach folgender Gleichung berechnen:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

Dabei sind:

$D_B$  = der DOC- bzw. CSB-Eliminationsgrad (in %) des organischen Mediums in der Kontrollanlage zum Zeitpunkt t

$C_M$  = der DOC- bzw. CSB-Wert des organischen Mediums im Zulauf der Kontrollanlage (mg/l)

Wahlweise kann der Prozentsatz der Elimination des durch das organische Medium PLUS die Prüfsubstanz bedingten DOC- bzw. CSB-Wertes nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

Dabei sind:

$D_T$  = der Eliminationsgrad des DOC bzw. des CSB (in %) im Gesamtzulauf (organisches Medium PLUS Prüfsubstanz) der Prüfanlage

$C_T$  = der DOC bzw. CSB im Gesamtzulauf (organisches Medium PLUS Prüfsubstanz) der Prüfanlage oder anhand von Stammlösungen berechneter DOC bzw. CSB (mg/l)

54. Die Abnahme der Prüfsubstanz, soweit nach einer spezifischen Analyseverfahren gemessen, in den vorgegebenen Zeitabständen nach folgender Gleichung berechnen:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

Dabei sind:

$D_{ST}$  = der Primäreliminationsgrad (in %) der Prüfsubstanz zum Zeitpunkt t

$S_i$  = die gemessene oder geschätzte Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf der Prüfanlage (mg/l)

$S_e$  = die gemessene Konzentration der Prüfsubstanz im Ablauf der Prüfanlage zum Zeitpunkt t (mg/l)

55. Bei gekoppelten Anlagen die durch den Schlammaustausch bedingte Verdünnung der Prüfsubstanz im Belüftungsgefäß durch einen Berichtigungsfaktor kompensieren (siehe Anlage 3). Bei einer mittleren hydraulischen Verweilzeit von 6 Stunden und einem Austausch der Hälfte der Belebtschlammmenge im Belüftungsgefäß müssen die täglich berechneten Eliminationswerte ( $D_t$ , Nummer 52) berichtigt werden, um anhand der nachstehenden Gleichung den realen Eliminationsgrad „ $D_{tc}$ “ der Prüfsubstanz zu ermitteln:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

### Angabe der Prüfergebnisse

56. Die prozentuale Elimination  $D_t$  (oder  $D_{tc}$ ) und  $D_{st}$ , soweit dieser Wert vorliegt, gegen die Zeit auftragen (siehe Anlage 2). Aus der Eliminationskurve der Prüfsubstanz (*per se* oder als DOC-Wert) lassen sich bestimmte Schlüsse über den Abnahmeprozess ziehen.

## *Adsorption*

57. Manifestiert sich bei der Prüfsubstanz bereits zu Beginn des Tests eine starke DOC-Elimination, so wird die Prüfsubstanz wahrscheinlich durch Adsorption an die Belebtschlammfeststoffe eliminiert. Dies kann durch Bestimmung der adsorbierten Prüfsubstanz anhand eines substanzspezifischen Analysenverfahrens nachgewiesen werden. Die DOC-Elimination adsorptionsfähiger chemischer Substanzen bleibt erfahrungsgemäß nicht während der gesamten Prüfung hoch; sie ist eher zu Beginn der Prüfung hoch und fällt dann allmählich auf ein stabiles Niveau. Könnte die adsorptionsfähige Prüfsubstanz jedoch auf die eine oder andere Weise eine Akklimatisation der Mikrobenpopulation herbeiführen, würde die DOC-Elimination der Prüfsubstanz anschließend zunehmen und einen hohen Plateauwert erreichen.

## *Latenzphase (Lag-Phase)*

58. Wie bei statischen Screeningtests durchlaufen viele Prüfsubstanzen eine Latenzphase, bevor sie vollständig biologisch abgebaut werden. In dieser *Lag*-Phase akklimatisieren bzw. adaptieren sich die Zersetzungsbakterien, ohne dass die Prüfsubstanz in nennenswertem Maße abnimmt; erst nach dieser Phase setzt das Bakterienwachstum ein. Die Phase endet und die Abbauphase gilt als begonnen, wenn etwa 10 % der anfänglichen Menge Prüfsubstanz abgebaut sind (nach der Adsorption, falls es dazu kommt). Die *Lag*-Phase ist oft sehr variabel und schwer reproduzierbar.

## *Plateauphase*

59. Die Plateauphase einer Eliminationskurve im kontinuierlichen Test ist definiert als die Phase, in der maximale Zersetzung stattfindet. Sie sollte mindestens 3 Wochen dauern, in denen etwa 15 gültige Messwerte ermittelt werden.

## *Mittlerer Eliminationsgrad der Prüfsubstanz*

60. Diesen Mittelwert anhand der Eliminationswerte ( $D_t$ ) der Prüfsubstanz in der Plateauphase berechnen. Auf die nächste ganze Zahl (1 %) gerundet, entspricht dieser gerundete Wert dem Eliminationsgrad der Prüfsubstanz. Ferner wird empfohlen, das 95 %-Konfidenzniveau für den Mittelwert zu berechnen.

## *Elimination des organischen Mediums*

61. Die prozentuale Elimination des organischen Mediums in der Kontrollanlage ( $D_B$ ), basierend auf dem DOC- bzw. CSB-Wert, gegen die Zeit auftragen. Dabei ist der mittlere Eliminationsgrad auf dieselbe Weise anzugeben wie für die Prüfsubstanz (Nummer 60).

## *Hinweis auf den biologischen Abbau*

62. Adsorbiert die Prüfsubstanz nicht signifikant an den Belebtschlamm und hat die Eliminationskurve die typische Form einer Bioabbaukurve mit Latenz-, Abbau- und Plateauphasen (Nummern 58, 59), so kann die gemessene Elimination mit Sicherheit dem biologischen Abbau zugeschrieben werden. War die Abnahme im Anfangsstadium hoch, kann der Simulationstest nicht zwischen biologischen und

abiotischen Eliminationsprozessen differenzieren. In derartigen Fällen und in anderen Fällen, in denen Zweifel am biologischen Abbau bestehen (z. B. wenn die Prüfsubstanz ausgasst (*stripping*)), die Adsorption der Prüfsubstanzen untersuchen, oder anhand von Parametern, die biologische Prozesse genau angeben, zusätzliche statische Bioabbaubarkeitstests durchführen. Zu derartigen Tests zählen die Sauerstoffaufnahmemethoden (Kapitel C.4 (D, E, F) dieses Anhangs (6)) oder Kohlendioxid-Entwicklungstests (Kapitel C.4 C dieses Anhangs (6)) oder die ISO-*Headspace*-Methode (18), bei der ein zuvor exponiertes Inokulum aus dem Simulationstest verwendet wird. Wurden sowohl die DOC-Abnahme als auch die Prüfsubstanzabnahme gemessen, zeigen große Unterschiede (d. h. wenn erstere geringer ist als letztere) zwischen den Abnahmeprozentswerten die Präsenz intermediärer organischer Produkte in den Abläufen an, die möglicherweise schwerer abzubauen sind als die Ausgangssubstanz.

### *Gültigkeit der Prüfergebnisse*

63. Die Bestimmung des Eliminationsgrades des organischen Mediums (Nummer 53) in der Kontrollanlage liefert Informationen über das normale Abbauverhalten des Inokulums. Der Test kann als gültig angesehen werden, wenn der Grad der DOC- bzw. der CSB-Elimination in der (den) Kontrollanlage(n) nach zwei Wochen > 80 % beträgt und nichts Ungewöhnliches festgestellt wurde.
64. Wurde eine leicht biologisch abbaubare (Referenz-)Substanz verwendet, sollte der Abbaubarkeitsgrad (D<sub>t</sub>, Nummer 52) > 90 % betragen.
65. Wurde der Test unter nitrifizierenden Bedingungen durchgeführt, sollte die mittlere Konzentration in den Abläufen < 1 mg/l Ammonium-N und < 2 mg/l Nitrit-N betragen.
66. Sind diese Kriterien (Nummern 63-65) nicht erfüllt, müssen der Test mit einem Inokulum aus anderer Quelle wiederholt, eine Referenzsubstanz getestet und alle Testverfahren überprüft werden.

### **Prüfbericht**

67. Der Prüfbericht muss Folgendes umfassen:

#### *Prüfsubstanz:*

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

#### *Prüfbedingungen:*

- Art des Prüfsystems; etwaige Änderungen bei Prüfungen nicht löslicher und flüchtiger chemischer Substanzen;
- Art des organischen Mediums;
- Anteil (und Art) der Industrieabwässer im kommunalen Abwasser, soweit bekannt;
- Inokulum, Art und Probenahmestelle(n), Konzentration und etwaige Vorbehandlung;



- Prüfsubstanz-Stammlösung: DOC- und TOC-Gehalt; bei Suspension: Art der Aufbereitung; verwendete Testkonzentration; falls außerhalb der Bandbreite von 10 - 20 mg/l DOC: Begründung; Zugabemethode; Datum der ersten Zugabe; etwaige Änderungen;
- mittleres Schlammalter und mittlere hydraulische Verweilzeit; Methode des Überschussschlammabzugs; Methoden zur Verminderung der Bildung von Blähschlamm, von Schlammverlusten usw.;
- angewandte Analysetechniken;
- Testtemperatur;
- Eigenschaften wie Blähschlammbildung, Schlammvolumenindex (*Sludge Volume Index*, SVI), suspendierte Stoffe im Ablauf (*Mixed Liquor Suspended Solids*, MLSS);
- etwaige Abweichungen von Standardverfahren und etwaige Umstände, die die Testergebnisse möglicherweise beeinträchtigt haben.

*Prüfergebnisse:*

- alle Messdaten (DOC, CSB, spezifische Analysen, pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffkonzentration, suspendierte Feststoffe, N-Chemikalien, soweit relevant);
- alle Berechnungswerte für  $D_t$  (oder  $D_{tc}$ ),  $D_B$ ,  $D_{St}$  in tabellarischer Form und als Eliminationskurven;
- Aussagen zu Latenz- und Plateau-Phasen, Prüfungsdauer, Eliminationsgrad der Prüfsubstanz und des organischen Mediums in der Kontrollanlage sowie statistische Informationen und Angaben zur Bioabbaubarkeit und Gültigkeit des Tests;
- Diskussion der Ergebnisse.

## LITERATUR

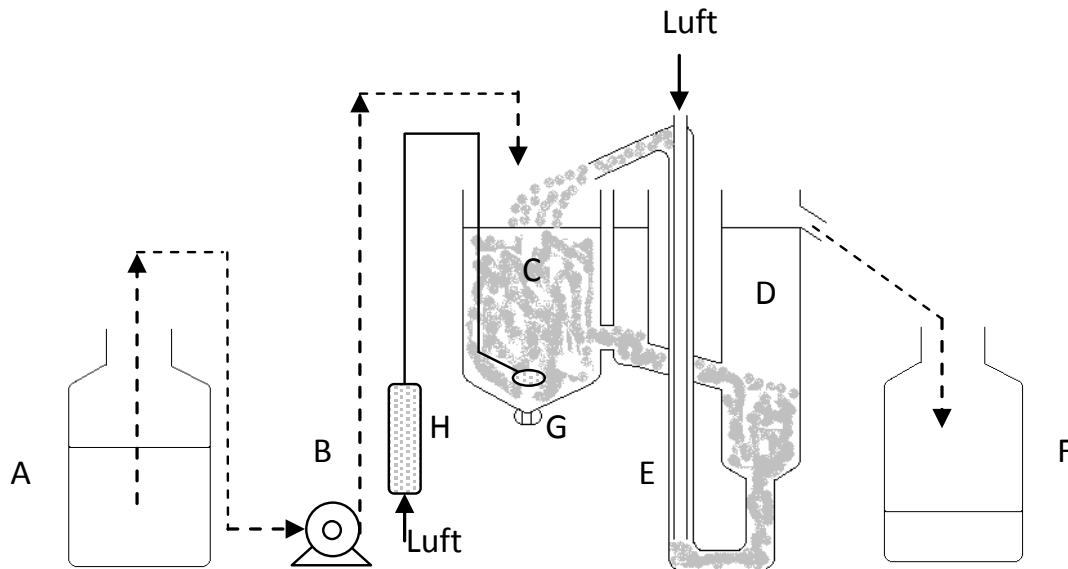
- (1) Swisher RD (1987). „*Surfactant Biodegradation*“, 2. Ausgabe. Marcel Dekker Inc. New York, S. 1085 ff.
- (2) Deutsche Bundesregierung (1962). Verordnung über die Abbaubarkeit von Detergenzien in Wasch- und Reinigungsmitteln. Bundesgesetzblatt, Teil I, Nr. 49: 698-706.
- (3) Painter HA and King EF (1978a). *WRc porous-pot method for assessing biodegradability*. Technischer Bericht Nr. 70, Water Research Centre, Medmenham, Vereinigtes Königreich.
- (4) Painter HA and King EF (1978b). *The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants*. Wat. Res. 12: 909-915.
- (5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.
- (6) Kapitel C.4 dieses Anhangs, Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit.
- (7) Kapitel C.12 dieses Anhangs, Biologische Abbaubarkeit - Modifizierter SCAS-Test.
- (8) Kapitel C.19 dieses Anhangs, Schätzung des Adsorptionskoeffizienten ( $K_{OC}$ ) im Boden und in Klärschlamm mittels der Hochdruck-Flüssigchromatografie (HPLC).
- (9) Gerike P and Fischer WK (1979). *A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests*. Ecotox. Env. Saf. 3: 157-173.
- (10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II *Additional results and conclusions*. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.
- (11) Painter HA and Bealing D (1989). *Experience and data from the OECD activated sludge simulation test*. S. 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (12) ISO 11733 (1995; überarbeitet 2004). Bestimmung der Elimination und der biologischen Abbaubarkeit organischer Verbindungen in einem wässrigen Medium - Belebtschlamm-Simulationstest.
- (13) Birch RR (1982). *The biodegradability of alcohol ethoxylates*. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

- (14) Birch RR (1984). *Biodegradation of nonionic surfactants*. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.
- (15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). *Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test*. Wat.Res. 14: 753-758.
- (16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
- (17) Her Majesty's Stationery Office (1982). *Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials*. S. 91-98 ISBN 011 751661 9.
- (18) ISO 14593 (1998). Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen im wässrigen Medium - Verfahren mittels Bestimmung des anorganischen Kohlenstoffs in geschlossenen Flaschen.

## ANLAGE 1

**Abbildung 1:** Apparatur zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit

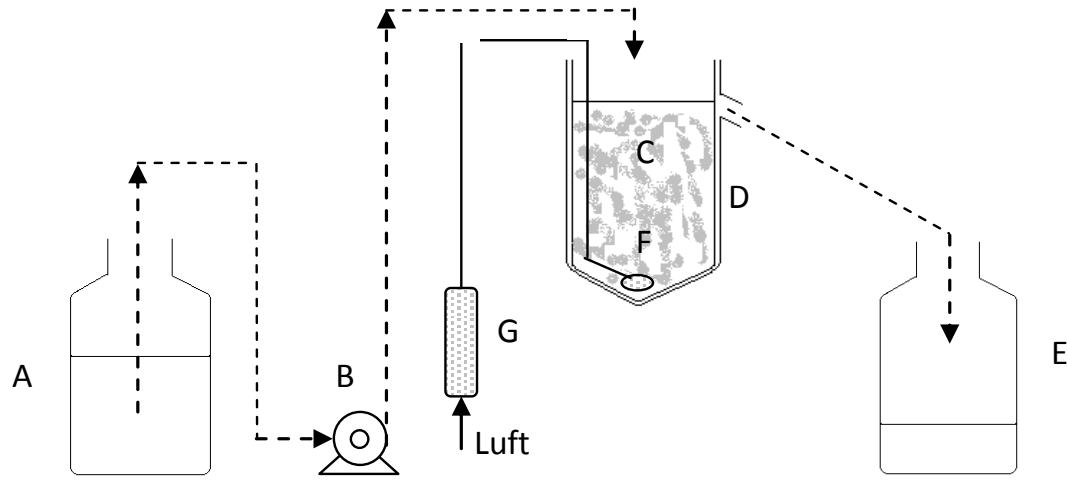
*Husmann-Anlage*



- |                                  |                     |
|----------------------------------|---------------------|
| A. Vorratsgefäß                  | E. Druckluftpumpe   |
| B. Dosierpumpe                   | F. Sammelgefäß      |
| C. Belüftungsgefäß (3 l-Volumen) | G. Fritte           |
| D. Absetzungsgefäß               | H. Luftmengenmesser |

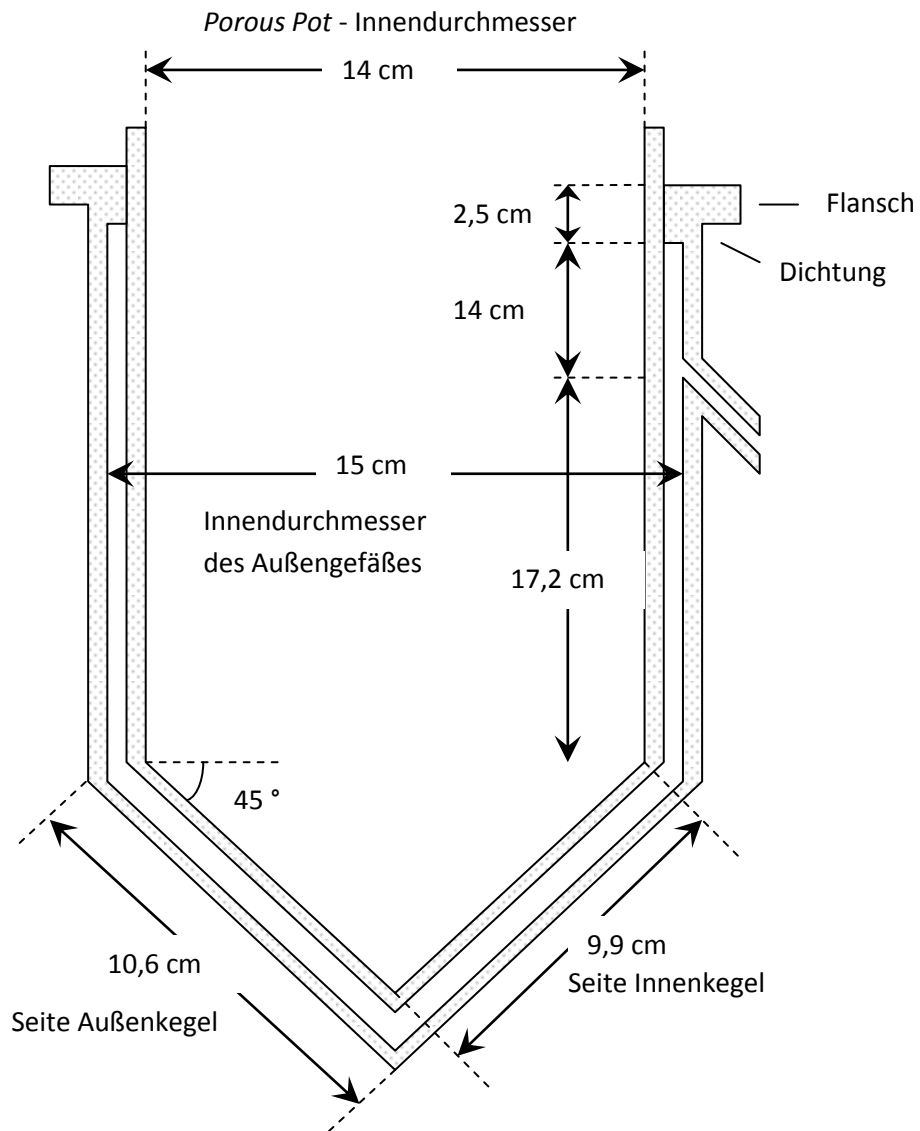
**Abbildung 2:** Apparatur zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit

„Porous-Pot“-Anlage



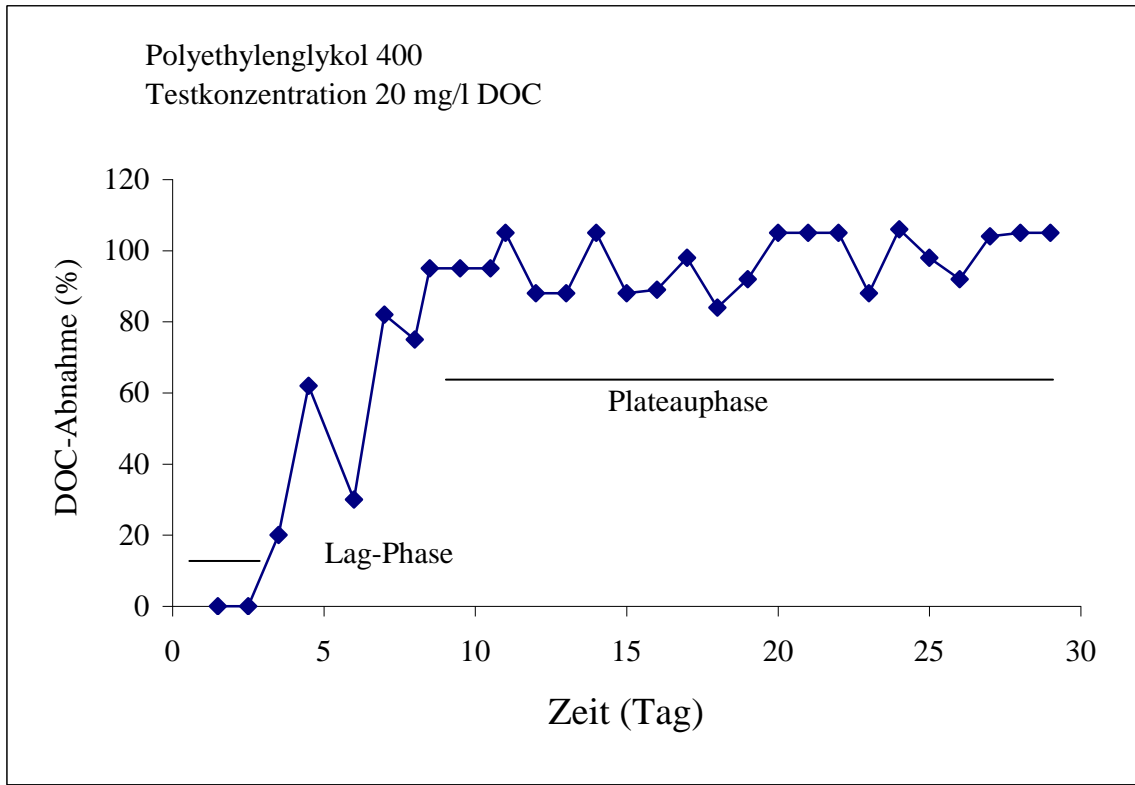
- |                               |                     |
|-------------------------------|---------------------|
| A. Vorratsgefäß               | E. Sammelgefäß      |
| B. Dosierpumpe                | F. Diffusor         |
| C. Poröses Belüftungsgefäß    | G. Luftmengenmesser |
| D. Undurchlässiges Außengefäß |                     |

**Abbildung 3:** Einzelheiten des 3-Liter-„Porous-Pot“-Belüftungsgefäßes



## ANLAGE 2

### BEISPIEL EINER ELIMINATIONSKURVE



## ANLAGE 3

### [ZUR INFORMATION]

#### KOPPELN VON PRÜFANLAGEN

Um die Mikrobenpopulationen in Schlämmen in einer Prüfanlage, die mit Abwasser PLUS Prüfsubstanz beschickt wird, und in einer Kontrollanlage, die nur mit Abwasser beaufschlagt wird, zu egalisieren, wurde der Schlamm täglich ausgetauscht (1). Der Vorgang wurde als „koppeln“ bezeichnet und die Methode ist als Anlagenkopplung bekannt. Die Kopplung wurde ursprünglich mit *Husmann*-Belebtschlammanlagen, anschließend aber auch mit *Porous-Pot*-Anlagen durchgeführt (2)(3). Es wurden keine signifikanten Ergebnisunterschiede zwischen nicht gekoppelten und gekoppelten Anlagen, ob *Husmann*- oder *Porous-Pot*-Anlagen, festgestellt, so dass der Zeit- und Arbeitsaufwand für das Koppeln der Anlagen mit keinerlei Vorteil verbunden ist.

Beim Schlammaustausch kann der Eindruck einer beträchtlichen Prüfsubstanzabnahme entstehen, da ein Teil der Substanz übertragen wird und die Prüfsubstanzkonzentrationen in den Abläufen der Prüf- und der Kontrollanlagen mehr oder weniger gleich sind. Folglich müssen Berichtigungsfaktoren angewendet werden, die von der ausgetauschten Fraktion und der mittleren hydraulischen Verweilzeit abhängen. Weitere Einzelheiten zur Berechnung wurden veröffentlicht (1).

Der berichtigte DOC- bzw. CSB-Eliminationsgrad wird nach der folgenden allgemeingültigen Formel berechnet:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r / 12) / (1 - a \cdot r / 12) \%$$

Dabei sind:

- $D_{tc}$  = der berichtigte DOC- bzw. CSB-Eliminationsgrad (in %)
- $D_t$  = die bestimmte DOC- bzw. CSB-Abnahme Eliminationsgrad (in %)
- $a$  = die ausgetauschte Fraktion des Volumens der Belebtschlammanlagen
- $r$  = die mittlere hydraulische Verweilzeit (in Std.)

Wird beispielsweise die Hälfte des Volumens des Belüftungsgefäßes ausgetauscht ( $a = 0,5$ ) und beträgt die mittlere hydraulische Verweilzeit 6 Stunden, so ist die Korrekturformel

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$



## LITERATUR

- (1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). *Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test.* Wat. Res. 9: 1131-1135.
- (2) Painter HA, Bealing DJ (1989). *Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test.* S. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (3) Painter HA, King EF (1978). *Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability.* Technischer Bericht TR70, Water Research Centre, Stevenage, Vereinigtes Königreich.

## ANLAGE 4

### **BEURTEILUNG DER BELEBTSCHLAMM-INHIBITION**

#### **Hemmung durch Prüfsubstanzen**

1. Es kann vorkommen, dass eine chemische Substanz (oder ein Abwasser) im Simulationstest nicht abgebaut wird bzw. nicht abnimmt und sogar eine hemmende (inhibierende) Wirkung auf die Schlammmikroorganismen entfaltet. Andere chemische Substanzen werden in niedrigen Konzentrationen biologisch abgebaut, wirken jedoch in höheren Konzentrationen inhibierend (Hormesis). Inhibitionseffekte wurden möglicherweise in einem früheren Stadium festgestellt oder lassen sich im Toxizitätstest bestimmen, bei dem ein Inokulum verwendet wird, das dem im Simulationstest verwendeten Inokulum ähnlich oder identisch ist (1). Zu derartigen Methoden zählen die Prüfung der Atmungshemmung (Kapitel C.11 dieses Anhangs (2) und ISO 8192(3)) oder die Bestimmung der Hemmwirkung der Wasserbestandteile auf das Wachstum der Belebtschlamm-Mikroorganismen (ISO 15522 (4)).
2. Im Simulationstest manifestiert sich eine Hemmung dadurch, dass die Differenz zwischen dem DOC-Gehalt (bzw. dem CSB) des Prüfgefäßablaufs und dem des Kontrollgefäßablaufs größer ist als der mit der Prüfsubstanz zugeführte DOC. Anders ausgedrückt, die prozentuale Abnahme des DOC (und des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB), des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB), und/oder von  $\text{NH}_4^+$ ) des organischen Kulturmediums ist geringer, wenn bei Prüfsubstanz zugeführt wird. In diesem Fall sollte der Test mit einer geringeren Prüfsubstanzkonzentration so lange wiederholt werden, bis ein Niveau erreicht ist, bei dem kein Hemmungseffekt mehr auftritt, wobei die Konzentration u.U. so weit verringert werden sollte, bis die Prüfsubstanz biologisch abgebaut ist. Hat die Prüfsubstanz (oder das Abwasser) jedoch in allen getesteten Konzentrationen eine nachteilige Wirkung auf den Prozess, so deutet dies darauf hin, dass die chemische Substanz nur schwer und möglicherweise überhaupt nicht biologisch abbaubar ist; es könnte jedoch sinnvoll sein, den Test mit Belebtschlamm aus einer anderen Quelle zu wiederholen und/oder den Schlamm schrittweise zu akklimatisieren.
3. Umgekehrt sollte die Konzentration der Prüfsubstanz erhöht werden, wenn diese bereits im ersten Simulationsversuch biologisch abgebaut wird und ermittelt werden muss, ob die chemische Substanz einen Inhibitionseffekt entfalten könnte.
4. Bei der Bestimmung von Hemmungsgraden sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass sich Belebtschlammpopulationen verändern können und dass die Mikroorganismen mit der Zeit möglicherweise eine Toleranz gegenüber hemmenden Substanzen entwickeln.
5. Berechnung des Hemmungsgrades:

Die gesamten prozentualen Abnahmen ( $R_o$ ) von BSB, DOC, CSB usw. können für die Prüf- und die Kontrollanlage nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$R_o = 100 (I - E) / I \%$$

Dabei sind:

I = die Zulaufkonzentration von BSB, DOC, CSB usw. in Prüf- oder Kontrollgefäßen (mg/l)

E = die entsprechende Ablaufkonzentrationen (mg/l).

I und E müssen aufgrund des auf die Prüfsubstanz in den Prüfanlagen zurückzuführenden DOC korrigiert werden, um korrekt berechnete Hemmungsprozentsätze zu gewährleisten.

Der auf die Prüfsubstanz zurückzuführende Hemmungsgrad kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{Hemmungsprozentsatz} = 100 (R_c - R_t) / R_c$$

Dabei sind:

$R_c$  = die prozentuale Abnahme in den Kontrollgefäßen

$R_t$  = die prozentuale Abnahme in den Prüfgefäßen

## LITERATUR

- (1) Reynolds L *et al.* (1987). *Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability*. Chemosphere 16: 2259.
- (2) Kapitel C.11 dieses Anhangs, Biologische Abbaubarkeit — Belebtschlamm: Prüfung der Atmungshemmung.
- (3) ISO 8192 (2007) Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Belebtschlamm nach Kohlenstoff- und Ammonium-Oxidation.
- (4) ISO 15522 (1999) Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmwirkung der Wasserbestandteile auf das Wachstum der Belebtschlamm-Mikroorganismen.

## ANLAGE 5

### **SCHWER WASSERLÖSLICHE PRÜFSUBSTANZEN – FLÜCHTIGE CHEMISCHE SUBSTANZEN**

#### **Schwer wasserlösliche chemische Substanzen**

Es wurden offensichtlich nur wenige Berichte über die Verwendung schwer wasserlöslicher oder nicht wasserlöslicher chemischer Substanzen in Tests zur Simulation der Abwasserbehandlung veröffentlicht (1)(2)(3).

Es existiert keine einfache Methode zur Dispergierung der Prüfsubstanz, die für alle nicht wasserlöslichen chemischen Substanzen geeignet wäre. Zwei der vier in ISO 10634 (4) beschriebenen Verfahren scheinen sich zur Dispergierung von Prüfsubstanzen für die Simulationstestung zu eignen; sie sehen den Einsatz von Emulgatoren und/oder Ultraschallenergie vor. Die resultierende Dispersion sollte mindestens 24 Stunden lang stabil sein. Hinreichend stabilisierte Dispersionen in einem konstant gerührten Behälter (Nummer 38) werden anschließend, separat vom Haushalts- oder synthetischen Abwasser, in das Belüftungsgefäß dosiert.

Soweit die Dispersionen stabil sind, wird untersucht, wie die Prüfsubstanz in dispergierter Form bestimmt werden kann. Da der DOC-Gehalt in diesem Fall wahrscheinlich ungeeignet ist, sollte eine spezifische Analysemethode für die Prüfsubstanz entwickelt werden, die sich für Abflüsse, Feststoffe in Abflüssen und Belebtschlämme gleichermaßen eignet. Danach sollte der Verbleib der Prüfsubstanz im simulierten Belebtschlammprozess (Flüssig- und Festphasen) bestimmt werden. Auf diese Weise wird eine „Massenbilanz“ erstellt, anhand deren festgestellt werden könnte, ob die Prüfsubstanz biologisch abgebaut wurde. Dies würde jedoch nur die primäre Bioabbaubarkeit betreffen. Vollständige Bioabbaubarkeit sollte in einem respirometrischen Test auf leichte biologische Abbaubarkeit (Kapitel C.4 dieses Anhangs (5) C, F oder D) nachgewiesen werden, bei dem als Inokulum Schlamm eingesetzt wird, der der Prüfsubstanz im Simulationstest ausgesetzt war.

#### **Flüchtige chemische Substanzen**

Die Verwendung flüchtiger chemischer Substanzen in Tests zur Simulation der Abwasserbehandlung ist umstritten und problematisch. Wie schon bei schwer wasserlöslichen Prüfsubstanzen scheint es kaum veröffentlichte Berichte über Simulationstests zu geben, bei denen flüchtige chemische Substanzen zum Einsatz kamen. Ein konventionelles Rührwerk wird durch Abdichten der Belüftungs- und Absetzgefäße, Messung und Kontrollmessung des Luftflusses mittels Luftflussmessern und Passieren des austretenden Gases durch Filter zum Auffangen flüchtiger organischer Stoffe umgerüstet. In einigen Fällen wird eine Vakuumpumpe verwendet, um das austretende Gas durch eine Kühlfalle oder ein *Purge-&Trap*-System für gaschromatographische Analysen mit Tenax- und Silikagel-Filtern zu führen. Die im Filter festgehaltene Prüfsubstanz kann analysiert werden.

Der Test wird in zwei Phasen durchgeführt. Die Anlagen werden zunächst ohne Schlamm betrieben; synthetisches Abwasser PLUS Prüfsubstanz werden jedoch in das

Belüftungsgefäß gepumpt. Es werden Zulauf- und Ablaufproben sowie Proben des austretenden Gases gezogen und einige Tage lang auf Präsenz von Prüfsubstanz analysiert. Aus den so erhobenen Daten kann der Prozentsatz ( $R_{vs}$ ) der aus dem System gelöst und entfernten (gestrippten) Prüfsubstanz errechnet werden.

Anschließend wird unter denselben Betriebsbedingungen wie bei der *Stripping*-Studie der normale biologische Test (mit Schlamm) durchgeführt. DOC bzw. CSB werden ebenfalls gemessen, um sicherzustellen, dass die Anlagen ordnungsgemäß funktionieren. In der ersten Testphase wird die Prüfsubstanz im Zulauf, im Ablauf und in austretenden Gas sporadisch analysiert; nach der Akklimatisation werden diese Analysen häufiger durchgeführt. Auch hier können anhand der Daten im Gleichgewichtszustand (*steady state*) die aus allen (physikalischen und biologischen) Abbauprozessen resultierende prozentuale Abnahme der Prüfsubstanz in der Flüssigphase ( $R_T$ ) sowie der aus dem System gestrippte Anteil ( $R_V$ ) berechnet werden.

Berechnung:

(a) Beim nicht biologischen Test kann der Prozentsatz ( $R_{VP}$ ) der aus dem System gestrippten Prüfsubstanz nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\% R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

Dabei sind:

- $R_{VP}$  = die prozentuale Abnahme der Prüfsubstanz aufgrund von Verflüchtigung,
- $S_{VP}$  = die im Filter aufgefangene Prüfsubstanz, angegeben als äquivalente Konzentration in der Flüssigphase (mg/l),
- $S_{IP}$  = die Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf (mg/l).

(b) Beim biologischen Test kann der Prozentsatz ( $R_V$ ) der aus dem System gestrippten Prüfsubstanz nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\% R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

Dabei sind:

- $R_V$  = die prozentuale Abnahme der Prüfsubstanz aufgrund von Verflüchtigung im biologischen Test,
- $S_V$  = die im biologischen Test im Filter aufgefangene Prüfsubstanz, angegeben als äquivalente Konzentration im flüssigen Zulauf (mg/l),
- $S_I$  = die Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf (mg/l).

(c) Beim biologischen Test kann die aus allen Abbauprozessen resultierende prozentuale Abnahme der Prüfsubstanz ( $R_T$ ) nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$R_T \% = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

Dabei ist:

$S_E$  = die Konzentration der Prüfsubstanz im (flüssigen) Ablauf (mg/l).

(d) Die prozentuale Abnahme der Prüfsubstanz aufgrund des biologischen Abbaus PLUS Adsorption ( $R_{BA}$ ) kann somit nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$\% R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Es sollten separate Tests durchgeführt werden, um zu bestimmen, ob die Prüfsubstanz adsorbiert wurde; wenn ja, kann eine weitere Korrektur vorgenommen werden.

(e) Ein Vergleich zwischen dem Anteil der Prüfsubstanz, der aus dem biologischen Prüfsystem gestrippt wurde ( $R_V$ ), und dem Anteil, der aus dem nicht biologischen Prüfsystem gestrippt wurde ( $R_{VP}$ ), ergibt den Gesamteffekt der biologischen Behandlung auf die Emission der Prüfsubstanz in die Atmosphäre.

Beispiel: Benzol

Schlammverweilzeit = 4 Tage

Synthetisches Abwasser; Verweilzeit = 8 Stunden

$$S_{IP} = S_I = 150 \text{ mg/l}$$

$$S_{VP} = 150 \text{ mg/l} \quad (S_{EP} = 0)$$

$$S_V = 22,5 \text{ mg/l}$$

$$S_E = 50 \text{ } \mu\text{g/l}$$

Daher:  $R_{VP} = 100\%$ ,  $R_V = 15\%$

$$R_T = 100\% \text{ und } R_{BA} = 85\%.$$

Es wurde davon ausgegangen, dass sich Benzol nicht an den Schlamm anlagert.

## LITERATUR

- (1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). *Biological degradation of tertiary butyl alcohol*. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.
- (2) Pitter P, Chudoba J (1990). *Biodegradability of organic substances in the aquatic environment*. CRC Press. Boston, USA.

- (3) Stover EL, Kincannon DF (1983). *Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters*. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
- (4) ISO 10634 (1995) Wasserbeschaffenheit - Anleitung für die Vorbereitung und Behandlung von in Wasser schwer löslichen organischen Verbindungen für die nachfolgende Bestimmung ihrer biologischen Abbaubarkeit in einem wässrigen Medium.
- (5) Kapitel C.4 dieses Anhangs, Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit.

## ANLAGE 6

### **AUSWIRKUNGEN DER SCHLAMMVERWEILZEIT AUF DIE BEHANDLUNGSFÄHIGKEIT CHEMISCHER SUBSTANZEN**

#### **EINLEITUNG**

1. Die im Haupttext beschriebene Methode dient der Feststellung, ob die getesteten Substanzen (in der Regel Stoffe, die bekanntermaßen inhärent, aber nicht leicht biologisch abbaubar sind) innerhalb der für Kläranlagen geltenden Grenzen biologisch abgebaut werden können. Die Ergebnisse werden als prozentuale Abnahme und prozentualer biologischer Abbau angegeben. Die Betriebsbedingungen der Belebtschlammanlagen und die Wahl des Zulaufs lassen relativ breit gefächerte Prüfsubstanzkonzentrationen im Ablauf zu. Tests werden nur an Schlammfeststoffen in einer einzigen nominalen Konzentration oder bei einer einzigen nominalen Schlammverweilzeit (*sludge retention time*, SRT) durchgeführt, und die beschriebenen Verfahren für den Überschussschlammabzug können dazu führen, dass der SRT-Wert während des Tests sowohl von einem Tag zum anderen als auch während eines Tages beträchtlich variiert.
2. Bei dieser Variante (1)(2) wird die Schlammverweilzeit (wie dies auch bei Anlagen größeren Maßstabs der Fall ist) während jedes 24-Stunden-Zeitraums innerhalb sehr viel engerer Grenzen kontrolliert, wodurch sich eine konstantere Konzentration in den Abläufen ergibt. Es wird die Verwendung von Haushaltsabwasser empfohlen, da diese Abwasserart konsistentere und höhere Abnahmeprozentwerte ergibt. Darüber hinaus werden die Effekte verschiedener SRT-Werte untersucht, und in einer weiterreichenden Studie können die Effekte verschiedener Temperaturen auf die Ablaufkonzentration bestimmt werden.
3. Es besteht bisher kein allgemeines Einvernehmen darüber, welche kinetischen Modelle zugrundeliegen, wenn chemische Stoffe unter Abwasserbehandlungsbedingungen biologisch abgebaut werden. Auf die erhobenen Daten wurde das Monod-Modell (zur Vorhersage der Wachstumsgeschwindigkeit von Bakterien in Abhängigkeit von der Konzentration der Substrate) gewählt (1)(2), da die Methode nur zur Anwendung auf in großen Mengen produzierte chemische Substanzen bestimmt war, die in Abwasser in Konzentrationen von über 1 mg/l vorkommen. Die Gültigkeit des vereinfachten Modells und die aufgestellten Annahmen wurden anhand einer Reihe von Alkoholethoxylaten von unterschiedlicher primärer Bioabbaubarkeit bestimmt (2)(3).

Anmerkung. Da sich diese Variante eng an den Wortlaut der vorliegenden Prüfmethode (C.10-A) anlehnt, werden im Folgenden nur die Punkte beschrieben, bei denen Abweichungen bestehen.

#### **PRINZIP DER PRÜFMETHODE**

4. *Porous-Pot*-Belebtschlammanlagen, die zur Erleichterung des (fast) kontinuierlichen



Abzugs von Kultursuspension konzipiert wurden und eine sehr präzise Kontrolle der Schlammverweilzeit (SRT, oder  $\theta_s$ ) gestatten, werden mit verschiedenen Schlammverweilzeiten und – fakultativ – bei verschiedenen Temperaturen als nicht gekoppelte Anlagen betrieben. Die Verweilzeit beträgt in der Regel 2 bis 10 Tage, und die Temperaturen liegen zwischen 5 und 20°C. (Vorzugsweise häusliches) Abwasser und eine Lösung der Prüfsubstanz werden in Anteilen, die die erforderliche Schlammverweilzeit (3 bis 6 Stunden) und die erforderliche Prüfsubstanzkonzentration im Zulauf gewährleisten, separat in die Anlagen zudosiert. Zu Vergleichszwecken werden zeitgleich Kontrollanlagen ohne Prüfsubstanz betrieben.

5. Es können andere Apparaturtypen verwendet werden, doch muss in diesem Fall unbedingt sichergestellt werden, dass eine gute Kontrolle der Schlammverweilzeit gewährleistet ist. So muss bei der Verwendung von Anlagen mit Klärkassen möglicherweise in Kauf genommen werden, dass Feststoffe über den Anlagenablauf verloren gehen. Ferner sollten besondere Vorkehrungen getroffen werden, um Fehler aufgrund von Schwankungen der Schlammmenge im Klärkasten zu vermeiden.
6. Die Anlagen werden unter allen gewählten Testbedingungen betrieben, und sobald Stabilität erreicht wurde, werden über einen Zeitraum von ungefähr drei Wochen die durchschnittlichen *Steady-State*-Konzentrationen der Prüfsubstanz in den Abläufen und – fakultativ – die DOC-Werte bestimmt. Zusätzlich zur Bestimmung der prozentualen Abnahme der Prüfsubstanz und der fakultativen Bestimmung des DOC-Wertes wird das Verhältnis zwischen Betriebsbedingungen und Prüfsubstanzkonzentration im Ablauf grafisch dargestellt. Auf diese Weise können kinetische Konstanten berechnet und die Bedingungen vorausgesagt werden, unter denen die Prüfsubstanz behandelt werden kann.

#### **ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ**

7. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummern 12 und 13.

#### **NEGATIVE/POSITIVE TESTERGEBNISSE (PASS/FAIL)**

8. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummern 14 und 15.

#### **REFERENZSUBSTANZ**

9. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummer 16.

#### **REPRODUZIERBARKEIT VON TESTERGEBNISSEN**

10. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummern 17 und 18.

## BESCHREIBUNG DER METHODE

### Apparatur

11. Als Anlage ist das modifizierte *Porous-Pot*-System geeignet (siehe Anlage 6.1). Das System besteht aus einem Innengefäß (oder Einsatz) aus porösem Polypropylen mit einer Dicke von 3,2 mm und einer Porengröße von ungefähr 90 µm; das Anschlussstück ist stumpfgeschweißt (dadurch wird die Anlage robuster als das unter Nummer 21 dieses Kapitels C.10 A beschriebene System). Das Innengefäß wird in ein größeres Außengefäß aus undurchlässigem Polyethylen eingesetzt, welches aus zwei Teilen besteht – einer runden Basisplatte mit ausgestanzten Lochöffnungen für zwei Luftleitungen und eine Schlammabzugleitung und einem aufschraubbaren Zylinder mit einem derart angeordneten Ausfluss, dass das Volumen im Topf stets auf 3 Liter gehalten werden kann. Eine der Luftleitungen ist mit einem Lüftungsstein versehen, die andere ist an einem Ende offen und im Topf im rechten Winkel zum Stein angeordnet. Das System erzeugt genügend Turbulenz, um den Inhalt des Topfes vollständig durchzumischen und Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff von über 2 mg/l zu gewährleisten.
12. Die Anlagen in angemessener Zahl entweder im Wasserbad oder in konstant temperierten Räumen unter kontrollierten Temperaturbedingungen zwischen 5 und 20°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) betreiben. Um die Prüfsubstanzlösung und den abgesetzten Schlamm in den vorgeschriebenen Raten (0-1,0 ml/Min bzw. 0-25 ml/Min) in die Belüftungsgefäße zu dosieren, sind Pumpen erforderlich; eine dritte Pumpe zieht den Überschussschlamm aus den Belüftungsgefäßen ab. Die erforderliche sehr langsame Fließgeschwindigkeit des Überschussschlammes wird erreicht, indem eine Pumpe auf höhere Geschwindigkeit eingestellt und mithilfe einer Zeitschaltuhr intermittent, d. h. 10 Sekunden pro Minute, betrieben wird, wobei eine Pumpenleistung von 3 ml/Min eine Abzugrate von 0,5 ml/Min ergibt.

### *Filtrationsgerät oder Zentrifuge*

13. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummer 23.

### *Analysegerät*

14. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummer 24.

### *Wasser*

15. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummern 25 and 26.

### *Organisches Medium*

16. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummer 27.

### *Synthetisches Abwasser*

17. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummer 28.

### *Haushaltsabwasser*

18. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummer 29.

### *Belebtschlamm*

19. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummer 30.

### *Stammlösungen der Prüfsubstanz*

20. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummern 31 und 32.

## **PRÜFVERFAHREN**

### *Aufbereitung des Inokulums*

21. Es gelten nur die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummer 34. – Es ist Belebtschlamm zu verwenden (ungefähr 2,5 g/l).

### *Anzahl Prüfanlagen*

22. Für einen einfachen Test, d. h. einen Test zur Messung der prozentualen Abnahme, ist nur eine einzige Schlammverweilzeit (SRT) erforderlich; um jedoch die zur Berechnung vorläufiger kinetischer Konstanten erforderlichen Daten erheben zu können, werden 4 oder 5 SRT-Werte benötigt. In der Regel werden Verweilzeiten zwischen 2 und 10 Tagen gewählt. In der Praxis bietet es sich an, einen Test mit 4 oder 5 Verweilzeiten gleichzeitig bei ein und derselben Temperatur durchzuführen; bei ausgedehnten Studien werden dieselben SRT-Werte (oder u. U. eine unterschiedliche Wertespanne) und andere Temperaturen (5 bis 20°C) verwendet. Zur Bestimmung der primären Bioabbaubarkeit (Hauptverwendungszweck) wird in der Regel nur eine Anlage je Bedingungsszenario benötigt. Zur Bestimmung der vollständigen Bioabbaubarkeit ist jedoch für jedes Bedingungsszenario eine Kontrollanlage erforderlich, die mit Abwasser, jedoch nicht mit Prüfsubstanz beschickt wird. Kann davon ausgegangen werden, dass im verwendeten Abwasser Prüfsubstanz präsent ist, müssten auch bei der Bestimmung der primären Bioabbaubarkeit Kontrollanlagen verwendet und die Berechnungen entsprechend korrigiert werden.

### *Zudosierung des organischen Mediums und der Prüfsubstanz*

23. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummern 36 bis 39; es wird jedoch darauf hingewiesen, dass die Prüfsubstanzlösung separat zudosiert wird und dass verschiedene Schlammabzugsraten verwendet werden. Die Fließgeschwindigkeiten der Zuläufe, der Abläufe und des abgezogenen Überschussschlamm häufig, z. B. zweimal täglich, überprüfen und bei Bedarf auf  $\pm 10\%$  justieren. Treten bei Verwendung von Haushaltsabwasser Probleme mit den Analysemethoden auf, sollte der Test mit synthetischem Abwasser durchgeführt werden, wobei jedoch sicherzustellen ist, dass unterschiedliche Medien vergleichbare kinetische Daten liefern.

### *Handhabung von Belebtschlammanlagen*

24. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummern 40 bis 43, die Schlammverweilzeit (SRT) sollte jedoch nur durch „konstanten“ Schlammabzug reguliert werden.

### *Probnahme und Analyse*

25. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummern 44 bis 50, außer dass die Konzentration der Prüfsubstanz bestimmt werden *muss* und der DOC-Wert bestimmt werden *kann*; CSB-Werte sollten nicht verwendet werden.

## **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

### **Auswertung der Ergebnisse**

26. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummern 52 bis 54.

### **Darstellung der Prüfergebnisse**

27. Es gelten die Bestimmungen von Kapitel C.10 A Nummern 56 bis 62.

### **Berechnung kinetischer Konstanten**

28. Es ist realistischer, die mittlere *Steady-State*-Konzentration der Prüfsubstanz im Ablauf anzugeben und zu beschreiben, wie sich diese unter unterschiedlichen Anlagenbetriebsbedingungen verändert, als die prozentuale primäre Biobaubarkeit anzuführen. Dies kann mithilfe von Gleichung (6) in Anlage 6.2 erfolgen, mit der Werte für  $K_S$ ,  $\mu_m$  und  $\theta_{SC}$ , die kritische Schlammverweilzeit, berechnet werden können.

(Alternativ können mit einem einfachen Rechnerprogramm Näherungswerte für  $K_S$  und  $\mu_m$  bestimmt werden, um die mithilfe von Gleichung 2 (Anlage 6.2) errechnete theoretische Kurve den erzielten Testwerten anzupassen. Auch wenn keine der Lösungen die einzige richtige sein wird, lässt sich dennoch ein verhältnismäßig akkurater Näherungswert für  $K_S$  und  $\mu_m$  bestimmen.)

### **Variabilität von Ergebnissen**

29. Es ist durchaus gängig, dass für kinetische Parameter bestimmter chemischer Substanzen unterschiedliche Werte erzielt werden. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl die Bedingungen, unter denen sich der Schlamm vermehrt hat, als auch die Testbedingungen (wie unter Nummer 5 und für andere Tests beschrieben) großen Einfluss auf die Prüfergebnisse haben. Ein Aspekt dieser Variabilität wurde von *Grady et al* (4) erörtert, die vorschlugen, die Begriffe „existierend“ (*extant*) und „intrinsisch“ (*intrinsic*) auf die beiden die Grenzen des physiologischen Zustands einer Kultur repräsentierenden Extremzustände anzuwenden, die während eines kinetischen Versuchs erreicht werden können. Darf sich der Zustand während des Tests nicht verändern, so spiegeln die Werte der kinetischen Parameter die

Bedingungen des Milieus wider, aus dem die Mikroorganismen entnommen wurden; diese Werte gelten als „*existierend*“, d. h. gegenwärtig vorhanden. Am anderen Ende, d. h. wenn die Testbedingungen die vollständige Entwicklung des protein-synthetisierenden Systems und somit eine größtmögliche Wachstumsrate gestatten, gelten die erzielten kinetischen Parameter als „intrinsic“ und werden nur von der Art des Substrats und den Arten von Bakterien in der Kultur beeinflusst. Als Faustregel gilt, dass *Existenz*-Werte erzielt werden, wenn das Verhältnis von Substratkonzentration zu kompetenten (d. h. auf den Abbau spezialisierten) Mikroorganismen ( $S_0/X_0$ ) gering, z. B. auf 0,025, gehalten wird, während intrinsische Werte anfallen, wenn dieses Verhältnis größer ist und ein Wert von mindestens 20 vorliegt. In beiden Fällen sollte  $S_0$  dem relevanten Wert von  $K_s$  – der Halbsättigungskonstante – entsprechen oder darüber liegen.

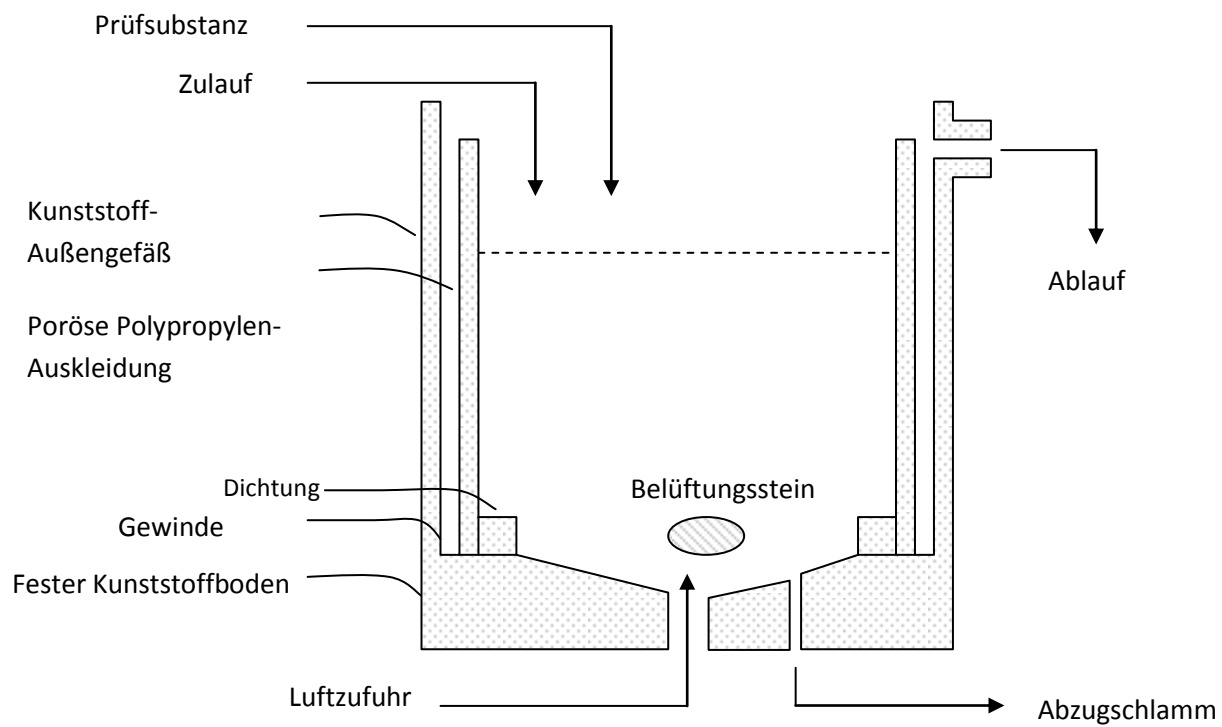
30. Die Variabilität und andere Aspekte der Bioabbaugeschwindigkeit waren Gegenstand eines kürzlich stattgefundenen SETAC-Workshops (5). Solche (bereits vorliegenden oder geplanten) Studien dürften einen genaueren Einblick in die in Kläranlagen ablaufenden kinetischen Prozesse geben und somit eine bessere Auswertung existierender Daten ermöglichen, aber auch Anregungen für eine zweckdienlichere Auslegung künftiger Prüfmethode geben.

## LITERATUR

- (1) Birch RR (1982). *The biodegradability of alcohol ethoxylates*. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.
- (2) Birch RR (1984). *Biodegradation of nonionic surfactants*. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.
- (3) Birch RR (1991). *Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment*. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.
- (4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). *Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology*. Wat. Res., 30 (3): 742-748.
- (5) *Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making* (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Herausgeber: Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6. September 1996. SETAC- Europe, Brüssel.

## Anlage 6.1

### **„POROUS POT“ MIT SRT-KONTROLLE**



## Anlage 6.2

### BERECHNUNG VON KINETISCHEN KONSTANTEN

1. In der Annahme, dass das mathematische Modell der Monod-Kinetik gilt, und ausgehend von einer Massenbilanz aus aktiven Feststoffen und Substrat im gesamten Belebtschlammssystem (1) können die folgenden Werte für den Gleichgewichtszustand (*steady state*) berechnet werden:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

oder

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

Dabei sind:

- $S_1$  = die Konzentration des Substrats im Ablauf, (mg/l)
- $K_s$  = die Halbsättigungskonstante, d. h. die Konzentration, bei der  $\mu = \mu_m/2$  (mg/l)
- $\mu$  = die spezifische Wachstumsrate ( $d^{-1}$ )
- $\mu_m$  = der Höchstwert von  $\mu_m$  ( $d^{-1}$ )
- $K_d$  = die spezifische Zerfallsrate aktiver Feststoffe ( $d^{-1}$ )
- $\theta_s$  = die mittlere Schlammverweilzeit, SRT (d)

Die Prüfung dieser Gleichung führt zu folgenden Schlussfolgerungen:

(i) Die Ablaufkonzentration ist unabhängig von der Zulaufkonzentration ( $S_0$ ); folglich verändert sich der Prozentsatz des biologischen Abbaus mit der Zulaufkonzentration  $S_0$ .

(ii) Der einzige  $S_1$  beeinflussende kontrollierbare Parameter der Anlage ist die Schlammverweilzeit  $\theta_s$ .

(iii) Jeder Zulaufkonzentration  $S_0$  entspricht eine kritische Schlammverweilzeit, so dass:

$$\frac{1}{\theta_{sc}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

Dabei ist:

- $\theta_{sc}$  = die kritische Schlammverweilzeit, unterhalb der kompetente (d. h. auf den Abbau spezialisierte) Mikroorganismen aus der Anlage ausgewaschen werden.

(iv) Da die anderen Parameter in Gleichung (2) die Wachstumskinetik betreffen, ist davon auszugehen, dass die Temperatur den Substratgehalt des Ablaufs und das kritische Schlammalter beeinflusst, d. h. die für einen bestimmten Behandlungsgrad erforderliche Schlammverweilzeit würde bei abnehmender Temperatur zunehmen.

2. Ausgehend von einer Massenbilanz von Feststoffen im *Porous-Pot*-System und in der Annahme, dass die Feststoffkonzentration im Anlagenablauf,  $X_2$ , im Vergleich zur Feststoffkonzentration im Belüftungsgefäß,  $X_1$ , gering ist, die Schlammverweilzeit wie folgt berechnen:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

und

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

Dabei sind:

- V = das Volumen des Belüftungsgefäßes (l)
- $X_1$  = die Feststoffkonzentration im Belüftungsgefäß (mg/l)
- $X_2$  = die Feststoffkonzentration im Ablauf (mg/l)
- $Q_0$  = die Zuflussrate (l/d)
- $Q_1$  = die Schlammabzugsrate (l/d)

Folglich kann die Schlammverweilzeit (jeder vorab eingestellte Wert) durch Kontrolle der Schlammabzugsrate,  $Q_1$ , kontrolliert werden.

### Schlussfolgerungen

3. Hauptzweck dieses Tests ist es demnach, die Vorhersage der Ablaufkonzentration und somit der Prüfsubstanzmengen in den Vorflutern zu ermöglichen.
4. Durch Auftragen von  $S_1$  gegen  $\theta_s$  lässt sich die kritische Schlammverweilzeit,  $\theta_{SC}$ , in manchen Fällen vorhersagen; siehe beispielsweise Kurve 3 in Abbildung 1. Ist dies nicht möglich, kann  $\theta_{SC}$  (zusammen mit Näherungswerten für  $\mu_m$  und  $K_s$ ) berechnet werden durch Auftragen von  $S_1$  gegen  $S_1 \cdot \theta_s$ .

Die Umstellung von Gleichung (1) ergibt

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

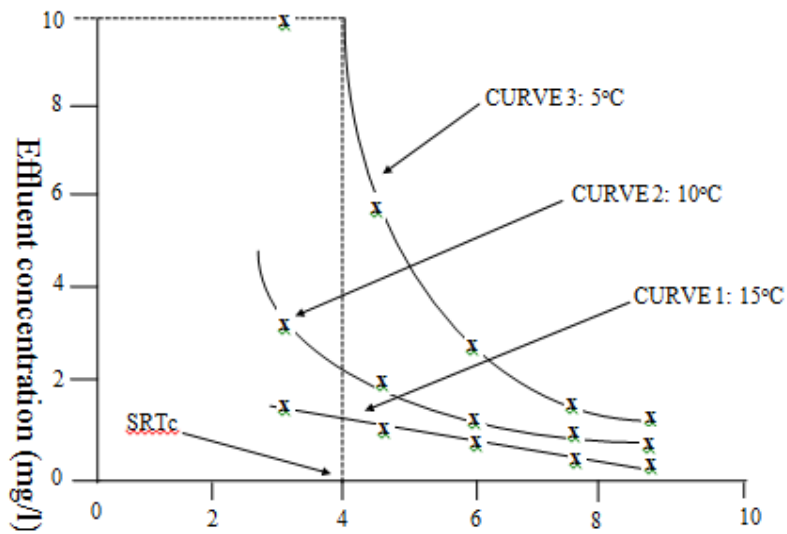
Ist  $K_d$  klein, wird  $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$  und [5] wird zu



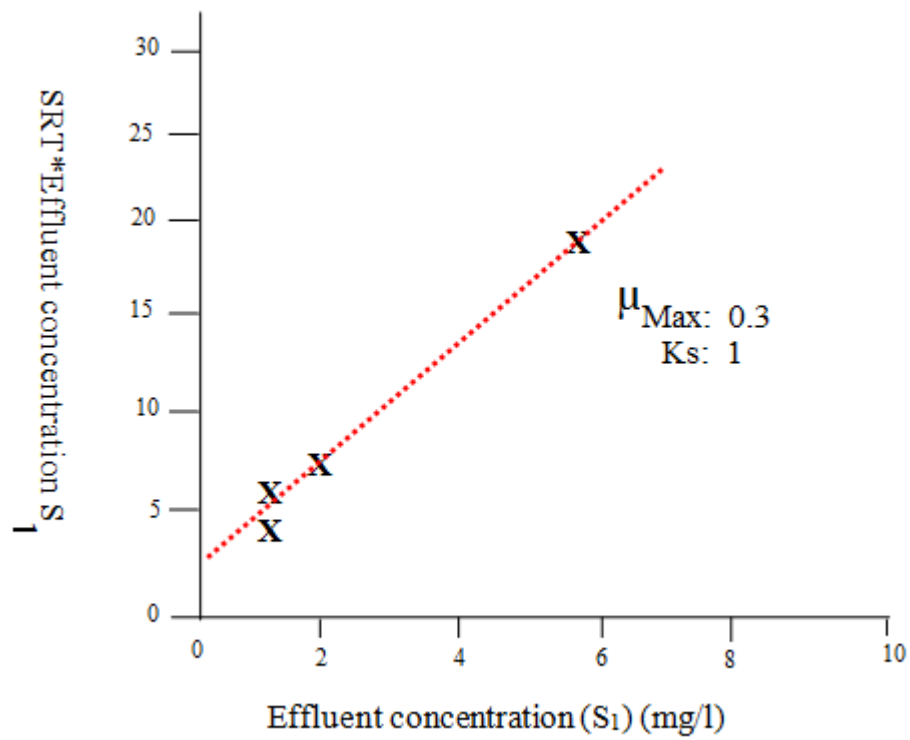
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

Die grafischen Punkte sollten demnach eine Gerade (siehe Abbildung 2) mit Steigung  $1/\mu_m$  und Schnittpunkt  $K_s/\mu_m$  ergeben; ferner gilt  $\theta_s \sim 1/\mu_m$ .

**Abbildung 1:** Drei Temperaturen; fünf Schlammverweilzeiten (SRT)



**Abbildung 2:** Regressionsgerade SRT - S1 vs S1 bei Temperatur T = 5 °C



Legende:

Ablaufkonzentration:

Kurve:

## ANLAGE 7

### TESTS BEI NIEDRIGEN ( $\mu\text{G/L}$ ) KONZENTRATIONSBEREICHEN

1. Zahlreiche chemische Substanzen sind im Wassermilieu, auch in Abwässern, normalerweise in sehr niedrigen Konzentrationen ( $\mu\text{g/l}$ ) vorhanden. In derart kleinen Mengen sind sie als primäre Vermehrungssubstrate eher nicht geeignet, sondern werden vielmehr als vermehrungsunfähige Sekundärsubstrate zur gleichen Zeit wie diverse natürlich vorkommende kohlenstoffhaltige Substanzen biologisch abgebaut. Das in Anlage 6 beschriebene Modell ist für den Abbau derartiger chemischer Stoffe folglich nicht geeignet. Viele andere Modelle könnten jedoch angewendet werden, und unter den in Abwasserbehandlungssystemen vorherrschenden Bedingungen in vielen Fällen zeitgleich. Zur Klärung dieser Frage ist jedoch noch größerer Forschungsaufwand erforderlich.
2. Bis dahin kann das im Haupttext beschriebene Verfahren (Kapitel C.10 A) angewendet werden, allerdings nur zur Bestimmung der primären Bioabbaubarkeit mittels angemessen geringer Konzentrationen ( $<100 \mu\text{g/l}$ ) und nach einem validierten Analyseverfahren. Die prozentuale biologische Abbaubarkeit kann berechnet werden (siehe Nummer 54 der Prüfmethode), sofern abiotische Prozesse (Adsorption, Flüchtigkeit usw.) berücksichtigt werden. Als Beispiel kann die Studie von *Nyholm et al.* (1)(2) angeführt werden, bei der die Prüfanlage im 4-Stunden-Takt mit Prüfsubstanz beschickt wurde (*Fill-and-Draw-Methode*). Für fünf chemische Stoffe, mit denen synthetisches Abwasser im Verhältnis 5 zu 100  $\mu\text{g/l}$  beimpft wurde, wurden Konstanten pseudo-erster Ordnung berichtet. (Für vollständige Bioabbaubarkeit können  $^{14}\text{C}$ -markierte Prüfsubstanzen verwendet werden. Da hierfür bislang keine allgemein anerkannten Verfahren vorliegen, geht eine Beschreibung dieser Methode über den Geltungsbereich der vorliegenden Prüfmethode hinaus, wengleich eine für ISO 14592 (3) vorgeschlagene Methode Leitlinien für die Verwendung  $^{14}\text{C}$ -markierter chemischer Stoffe enthält.)

### SCAS-Test

3. Später wurde ein einfacherer Zwei-Phasen-Test vorgeschlagen (4)(5)(6); auf die halbkontinuierliche Belebtschlamm-(SCAS)-Methode folgen kinetische Schnelltests an Proben aus den SCAS-Anlagen. Beim SCAS-System sind (im Gegensatz zur ursprünglichen C.12-Prüfmethode) die Überschussschlamm-Abzugsraten bekannt, und die Anlage wird mit modifiziertem synthetischen Abwasser (OECD) oder Haushaltsabwasser beschickt. Das synthetische Abwasser wurde (wegen veränderlichem pH-Wert und unzulänglicher Schlammsedimentation) durch Zugabe von Phosphatpuffer, Hefeextrakt, Eisen-(III)-Chlorid und Spurenelementsalzen modifiziert, und sein CSB wurde durch Erhöhung der Pepton- und Fleischextraktkonzentration auf etwa 750 mg/l angehoben. Die Anlagen wurden im 24-Stunden-Zyklus betrieben, d. h. Belüftung für 23 Stunden, Überschussschlammabzug, Sedimentation, Entfernung des Überstands (über den Ablauf) mit anschließender Zuführung von synthetischem Abwasser PLUS Prüfsubstanz in Höhe von bis zu 100  $\mu\text{g/l}$  (d. h. in ungefähr derselben Konzentration

wie beim Schnelltest). Einmal wöchentlich wurden 10 % des gesamten Schlammes durch frischen Schlamm ersetzt, um eine ausgewogene Mikrobenpopulation zu gewährleisten.

- Die anfängliche Konzentration der Prüfsubstanz und die Konzentration am Ende der Belüftungsphase werden gemessen, und der Test wird fortgesetzt, bis eine konstante Abnahme der Prüfsubstanz erreicht ist; dies kann eine Woche bis mehrere Monate dauern.

### Schnelltest

- Ein Schnelltest (z. B. ein 8-Stunden-Test) wird durchgeführt, um die Konstante der Abbaukinetik (pseudo-)erster Ordnung zu bestimmen, die über die Geschwindigkeit der Zersetzung der Prüfsubstanz in Belebtschlamm aus bekannten, jedoch unterschiedlichen Quellen und Werdegängen Aufschluss gibt. Während eines Akklimatisationsversuchs (Nummern 3, 4) werden insbesondere aus den SCAS-Reaktoren Schlammproben gezogen, und zwar am Ende einer Belüftungsphase, wenn die Konzentration des organischen Substrats gering ist. Zum Vergleich kann Schlamm auch aus einer parallel laufenden SCAS-Anlage entnommen werden, die nicht mit Prüfsubstanz beschickt wurde. Gemische aus Schlamm und Prüfsubstanz, die in zwei oder mehr Konzentrationen zwischen 1 µg/l und 50 µg/l zugeführt wird, werden ohne Zugabe von synthetischem Abwasser oder einem anderen organischen Substrat belüftet. Die Restprüfsubstanz in der Lösung wird während eines Zeitraums von maximal 24 Stunden je nach Abbaubarkeit der chemischen Substanz in regelmäßigen Zeitabständen, z. B. stündlich, bestimmt. Vor den entsprechenden Analysen werden die Proben zentrifugiert.

### Berechnungen

- Zur Berechnung der prozentualen Abnahme der Prüfsubstanz werden Daten aus den SCAS-Anlagen verwendet (Nummer 54). Außerdem kann mittels folgender Gleichung eine Konstante der Durchschnittsgeschwindigkeit,  $K_1$ , (normiert für die Konzentration suspendierter Feststoffe) berechnet werden:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS \text{ (l/g h)}$$

Dabei sind:

- t = der Belüftungszeitraum (23 Stunden)
- $C_e$  = die Konzentration am Ende des Belüftungszeitraums (µg/l)
- $C_i$  = die Konzentration zu Beginn des Belüftungszeitraums (µg/l)
- SS = die Konzentration von Belebtschlammfeststoffen (g/l)

- Beim Schnelltest wird die logarithmische Konzentration der Restprüfsubstanz (in %) gegenüber der Zeit grafisch dargestellt, und die Steigung des ersten Teils (10-50 % Zersetzung) der Kurve entspricht  $K_1$ , der Konstanten (pseudo-)erster Ordnung. Für die Konzentration der Schlammfeststoffe wird die Konstante durch Division der Steigung durch die Konzentration der Schlammfeststoffe normiert. Das mitgeteilte Ergebnis muss auch Einzelheiten über die anfänglichen Konzentrationen der Prüfsubstanz und suspendierter Feststoffe, über die Schlammverweilzeit, Eintrag und Quelle des

Schlamm und über eine (etwaige) Präexposition gegenüber der Prüfsubstanz enthalten.

### Variabilität der Ergebnisse

8. Die Variabilität und andere Aspekte der Bioabbaugeschwindigkeit waren Gegenstand eines kürzlich stattgefundenen SETAC-Workshops (7). Solche (bereits vorliegenden oder geplanten) Studien dürften einen genaueren Einblick in die in Kläranlagen ablaufenden kinetischen Prozesse geben und somit eine bessere Auswertung existierender Daten ermöglichen, aber auch Anregungen für eine zweckdienlichere Auslegung künftiger Prüfmethoden enthalten.

### LITERATUR

- (1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). *Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability*. Wat. Res. 26: 339-353.
- (2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). *Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption*. Wat. Res. 27: 1505-1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/ SC5/ WG4, N264) (1998). Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der aeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Verbindungen in geringen Konzentrationen.
- (4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). *Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations*. Chemosphere 33 (5): 851-864.
- (5) Berg UT and Nyholm N (1996). *Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations*. Chemosphere 33 (4): 711-735.
- (6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). *Activated sludge biodegradability simulation test*. Umweltprojekt, Nr. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Ministerium für Umwelt und Energie, Kopenhagen.
- (7) Biodegradation kinetics: *Generation and use of data for regulatory decision making* (1997). Workshop in Port Sunlight, VK. Verlag: Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4.-6. September 1996. SETAC- Europe, Brüssel.

## C.10-B: Biofilme

### EINLEITUNG

1. Simulationstests werden normalerweise an chemischen Substanzen vorgenommen, die sich im Screeningtest als nicht leicht abbaubar erwiesen haben (Kapitel C.4 (A-F) dieses Anhangs (9)), deren potenzielle (oder inhärente) biologische Abbaubarkeit jedoch im Test nachgewiesen wurde. In Ausnahmefällen werden Simulationstests auch an Substanzen vorgenommen, zu denen mehr Informationen benötigt werden (vor allem wenn sie in großen Mengen vorkommen), wobei in der Regel das Belebtschlammverfahren angewandt wird (C.10-A). In bestimmten Fällen sind jedoch spezifische Informationen über das Abbauverhalten einer chemischen Substanz bei biologischer Abwasserbehandlung (durch Biofilmreaktoren wie z. B. Tropfkörper, Tauchkörper, Fließbettreaktoren) erforderlich. Zu diesem Zweck wurden diverse Apparaturen entwickelt.
2. Gerike *et al.* (1) verwendeten große pilotmaßstäbliche Tropfkörper als gekoppelte Anlagen. Diese Filter nahmen viel Platz in Anspruch und erforderten verhältnismäßig große Mengen an Abwasser oder synthetischem Abwasser. Truesdale *et al.* (2) beschrieben kleinere Filter (eines Durchmessers von 6 Fuß x 6 Zoll), denen ein tensidfreies natürliches Abwasser zugeführt wurde; allerdings erforderten auch diese Filter immer noch große Wassermengen. Es dauerte 14 Wochen, bis sich ein „reifer“ Biofilm entwickelte, und bis zur Akklimatisierung waren nach der Beschickung mit dem Prüftensid noch weitere 4-8 Wochen erforderlich.
3. Baumann *et al.* (3) entwickelten einen viel kleineren Filter, bei dem Polyester-„Vlies“ verwendet wurde, das zuvor als inerte Aufwuchsfläche (*Substratum*) für den Biofilm in Belebtschlamm getränkt wurde. Die Prüfsubstanz wurde als die einzige C-Quelle verwendet, und die biologische Abbaubarkeit wurde durch Messung des gelösten organischen Kohlenstoffs (*dissolved organic carbon*, DOC) im Zu- und Ablauf und anhand des CO<sub>2</sub>-Gehalts des austretenden Gases bestimmt.
4. Gloyna *et al.* (4), die Erfinder des Drehrohrreaktors, verfolgten einen ganz anderen Ansatz. Auf der Innenfläche des Drehrohres wurde ein Biofilm gebildet, indem die betreffende Fläche über die Stirnseite des in einem kleinem Winkel zur Horizontalen angeordneten Rohres mit Zulaufwasser überströmt wurde. Der Reaktor wurde zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von Tensiden (5), aber auch zur Untersuchung der optimalen Dicke der Biofilmschicht und der Diffusion durch den Film (6) verwendet. Gloyna *et al.* entwickelten den Reaktor weiter, auch durch Modifizierung, um den CO<sub>2</sub>-Gehalt des austretenden Gases bestimmen zu können.
5. Der Drehrohrreaktor wurde vom *Standing Committee of Analysts* (Vereinigtes Königreich) als Standardmethode für die Bestimmung sowohl der biologischen Abbaubarkeit chemischer Substanzen (7) als auch der Reinigungsfähigkeit und Toxizität von Abwässern (8) anerkannt. Die hier beschriebene Methode hat den Vorteil, dass sie einfach, kompakt und reproduzierbar ist und relativ kleine Mengen an organischem Medium benötigt werden.

## **PRINZIP DER PRÜFMETHODE**

6. Die Innenfläche eines langsam rotierenden geneigten Rohres wird mit synthetischem Abwasser oder Haushaltsabwasser und Prüfsubstanz (dazugemischt oder separat) überströmt. Auf dieser Innenfläche bildet sich eine Schicht von Mikroorganismen, die denen auf Biofiltermedien vergleichbar sind. Die Prozessbedingungen des Reaktors werden so gewählt, dass eine angemessene Eliminierung der organischen Substanzen und, falls nötig, eine Ammonium-Oxidation erfolgt.
7. Ausfluss aus dem Rohrablauf wird gesammelt und abgesetzt und/oder gefiltert, bevor der DOC- und/oder der Prüfsubstanzgehalt nach einer spezifischen Methode analysiert wird. Zeitgleich werden zu Vergleichszwecken unter denselben Bedingungen Kontrollanlagen ohne Prüfsubstanz betrieben. Dabei wird angenommen, dass die Differenz zwischen den DOC-Konzentrationen im Ablauf der Prüf- und der Kontrollanlage durch die Prüfsubstanz und ihre organischen Stoffwechselprodukte bedingt ist. Zur Berechnung der Elimination der Prüfsubstanz wird diese Differenz mit der Konzentration der zugeführten Prüfsubstanz (als DOC) verglichen.
8. Der biologische Abbau lässt sich in der Regel durch sorgfältige Prüfung der Eliminations-Zeit-Kurve von der Bioadsorption differenzieren. Dies kann gewöhnlich durch einen Test auf leichte Bioabbaubarkeit (Sauerstoffaufnahme oder Kohlendioxidproduktion) bestätigt werden, bei dem ein akklimatisiertes Inokulum verwendet wird, das am Ende des Tests aus den mit der Prüfsubstanz beschickten Reaktoren entnommen wird.

## **ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ**

9. Reinheit, Wasserlöslichkeit und Flüchtigkeit sowie die Adsorptionsmerkmale der Prüfsubstanz sollten bekannt sein, um eine akkurate Ergebnisauswertung zu ermöglichen.
10. Normalerweise können flüchtige oder schwer lösliche chemische Substanzen nicht getestet werden, es sei denn, es werden besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen (siehe Kapitel C.10-A, Anlage 5). Die chemische Struktur oder zumindest die empirische Formel sollten ebenfalls bekannt sein, um theoretische Werte berechnen und/oder gemessene Parameterwerte, z. B. für den theoretischen Sauerstoffbedarf (ThOD) oder den DOC, überprüfen zu können.
11. Angaben zur Toxizität der Prüfsubstanz für Mikroorganismen (siehe Kapitel C.10-A, Anlage 4) können für die Wahl geeigneter Testkonzentrationen zweckdienlich und für die korrekte Auswertung niedriger Bioabbaubarkeitswerte ausschlaggebend sein.

## **NEGATIVE/POSITIVE TESTERGEBNISSE (PASS/FAIL)**

12. Ursprünglich musste die primäre Bioabbaubarkeit von Tensiden mindestens 80 % betragen, bevor die Substanz in den Verkehr gebracht werden konnte. Wird der Wert von 80 % nicht erreicht, kann der vorliegende Simulations-(Bestätigungs-)Test durchgeführt werden, und das Tensid darf nur in den Verkehr gebracht werden, wenn

über 90 % der betreffenden Substanz abgebaut wurden. Im Allgemeinen stellt sich die *Pass-/Fail-Frage* bei chemischen Substanzen nicht, und der Wert der prozentualen Abnahme kann zur approximativen Berechnung der wahrscheinlichen Umweltkonzentration einer chemischen Substanz verwendet werden, die zur Analyse der von chemischen Substanzen ausgehenden Gefahren erforderlich ist. Einige Untersuchungen reiner Chemikalien haben in mehr als drei Viertel aller Fälle eine prozentuale DOC-Abnahme von > 90 % und bei über 90 % der Substanzen, die sich in nennenswerten Maße als biologisch abbaubar erwiesen haben, von > 80 % ergeben.

## **REFERENZSUBSTANZEN**

13. Um sicherzustellen, dass das Testverfahren korrekt durchgeführt wird, ist es sinnvoll, gelegentlich Referenzsubstanzen zu testen, deren Verhalten bekannt ist. Zu derartigen Substanzen zählen Adipinsäure, 2-Phenylphenol, 1-Naphthol, Diphensäure und 1-Naphthoesäure.

## **REPRODUZIERBARKEIT VON TESTERGEBNISSEN**

14. Die relative Standardabweichung lag nach Feststellung eines britischen Labors bei den Tests selbst bei 3,5 % und zwischen Tests bei 5% (7).

## **BESCHREIBUNG DES PRÜFVERFAHRENS**

### **Apparatur**

#### *Drehrohrreaktoren*

15. Die Apparatur (siehe Anlage 8, Abbildungen 1 und 2) besteht aus einer Reihe von jeweils 30,5 cm langen Acrylrohren mit jeweils 5 cm Innendurchmesser, die innerhalb eines metallenen Stützkastens auf Gummirollen angeordnet sind. Jedes Rohr hat einen ca. 0,5 cm tiefen Flansch, damit es fest auf den Rädern aufsitzt, eine mit grober Stahlwolle aufgeraute Innenfläche und am Stirnende (Zuführende) einen 0,5 cm tiefen inneren Randabschluss, um ein Überlaufen der Flüssigkeit zu vermeiden. Die Rohre sind in einem Winkel von ungefähr einem Grad zur Horizontalen angeordnet, um, wenn das Testmedium dem sauberen Rohr zugeführt wird, die erforderliche Kontaktzeit zu gewährleisten. Die Gummirollen werden mithilfe eines Motors mit Geschwindigkeitssteuerung langsam gedreht. Da die Apparatur in einem Raum mit konstanten Temperaturbedingungen aufgestellt wird, ist Temperaturkontrolle gewährleistet.
16. Indem jeder Rohrreaktor in ein geringfügig größeres, gedeckeltes Rohr gesetzt und sichergestellt wird, dass die Anschlüsse gasdicht sind, könnte austretendes CO<sub>2</sub> in einer alkalischen Lösung aufgefangen und anschließend gemessen werden (6).
17. Für jedes Rohr wird in einem 20 l-Vorratsgefäß (A) (siehe Abbildung 2) ein 24-Stunden-Vorrat an organischem Medium, gegebenenfalls mit Prüfsubstanz versetzt, bereitgehalten. Bei Bedarf kann die Prüfsubstanz separat dosiert zugeführt werden.



Am unteren Ende jedes Vorratsgefäßes befindet sich ein Ausguss, der mit einem geeigneten Schlauch, z. B. aus Silikonkautschuk, über eine Peristaltikpumpe (B) an ein Glas- oder Acryl-Überführungsrohr angeschlossen ist, das an der Stirnseite des geeigneten Rohrreaktors 2-4 cm tief in das Rohr eingeführt wird (C). Der Abfluss wird am unteren Ende des Rohres in einem Sammelgefäß aufgefangen (D). Er wird vor der Analyse abgesetzt oder gefiltert.

#### *Filtrationsgerät - Zentrifuge*

18. Gerät zur Filtration von Proben mit Membranfiltern einer geeigneten Porenweite (Nennöffnungsdurchmesser 0,45 µm), die lösliche organische Substanzen adsorbieren bzw. ein Minimum an organischem Kohlenstoff freisetzen. Bei Verwendung von Kohlenstoff freisetzenden Filtern sind diese sorgfältig mit heißem Wasser zu waschen, um austretenden organischen Kohlenstoff zu entfernen. Alternativ kann eine Zentrifuge einer Kapazität von 40 000 m/s<sup>2</sup> verwendet werden.

19. Analysegerät zur Bestimmung folgender Größen:

- DOC/TOC (gesamter organischer Kohlenstoff) oder CSB (chemischer Sauerstoffbedarf);
- bestimmte chemische Substanz (mittels HPLC, GC usw.) , soweit erforderlich;
- pH-Wert, Temperatur, Azidität und Alkalinität;
- Ammonium, Nitrit und Nitrat, wenn die Tests unter nitrifizierenden Bedingungen durchgeführt werden.

#### *Wasser*

20. Leitungswasser (Trinkwasser) mit einem DOC-Gehalt von weniger als 3 mg/l.

21. Destilliertes oder deionisiertes Wasser mit einem DOC-Gehalt von weniger als 2 mg/l.

#### *Organisches Mmedium*

22. Als organisches Medium kommt synthetisches Abwasser, Haushaltsabwasser oder eine Mischung aus beiden Abwasserarten in Frage. Es hat sich gezeigt, dass die alleinige Verwendung von Haushaltsabwasser (in Belebtschlammanlagen) oft zu einer höheren prozentualen DOC-Abnahme führt und selbst den biologischen Abbau bestimmter chemischer Substanzen fördert, die bei Verwendung von synthetischem Abwasser (OECD) nicht abgebaut werden. Die Verwendung von Haushaltsabwasser wird demnach empfohlen. Bei jeder neuen Charge von organischem Medium wird die DOC- (oder die CSB-)Konzentration gemessen. Die Azidität oder Alkalinität des organischen Mediums sollte bekannt sein. Das Medium kann die Zugabe einer geeigneten Pufferlösung (Natriumhydrogencarbonat oder Kalium(di)hydrogenphosphat) erfordern, wenn die Azidität oder Alkalinität gering ist, um während des Tests einen pH-Wert von etwa  $7,5 \pm 0,5$  im Reaktor zu gewährleisten. Wieviel Pufferlösung zuzugeben ist und wann, muss auf Fallbasis entschieden werden.

#### *Synthetisches Abwasser*

23. In jedem Liter Leitungswasser wird Folgendes aufgelöst: 160 mg Pepton; 110 mg Fleischextrakt; 30 mg Harnstoff; 28 mg wasserfreies Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ ); 7 mg Natriumchlorid ( $NaCl$ ); 4 mg Calciumchlorid-Dihydrat ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ); 2 mg Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ ). Dieses synthetische Abwasser (OECD) hat Beispielcharakter und ergibt eine mittlere DOC-Konzentration im Zulauf von etwa 100 mg/l. Alternativ können andere Zusammensetzungen mit ähnlichen DOC-Konzentrationen verwendet werden, die realitätsnäher sind. Dieses synthetische Abwasser kann aus destilliertem Wasser in konzentrierter Form hergestellt und bis zu einer Woche bei ungefähr 1 °C gelagert werden. Bei Bedarf wird es mit Leitungswasser verdünnt. (Dieses Medium ist eher ungeeignet, weil die Stickstoffkonzentration sehr hoch und der Kohlenstoffgehalt relativ niedrig ist; es gibt jedoch keine besseren Empfehlungen, außer dass mehr Phosphat (als Puffer) sowie zusätzliches Pepton hinzugefügt werden könnten).

#### *Haushaltsabwasser*

24. Es sollte frisch abgesetztes Abwasser verwendet werden, das täglich von einem vorwiegend Haushaltsabwasser reinigenden Klärwerk bezogen wird. Es sollte aus der Ablaufrinne des Vorklärbeckens oder aus dem Beschickungswasser der Belebtschlammanlage gezogen werden und weitgehend frei von Grobstoffen sein. Das Abwasser kann nach mehrtägiger Lagerung bei 4 °C verwendet werden, sofern erwiesen ist, dass der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) (oder der chemische Sauerstoffbedarf, CSB) während der Lagerung nicht wesentlich (d. h. um weniger als 20 %) abgenommen hat. Um Störungen des Systems zu minimieren, sollte der DOC- (oder der CSB-)Wert jedes neuen Ansatzes vor dessen Verwendung auf einen geeigneten konstanten Wert eingestellt werden, z. B. durch Verdünnung mit Leitungswasser.

#### *Schmiermittel*

25. Zum Schmieren der Peristaltikpumpenrollen kann Glyzerin oder Olivenöl verwendet werden: Beide Schmiermittel sind für Silikonkautschukschläuche geeignet.

#### *Stammlösungen der Prüfsubstanz*

26. Für angemessen lösliche chemische Substanzen werden in geeigneten Konzentrationen (z. B. 1 bis 5 g/l) in entionisiertem Wasser oder in einer mineralischen Kulturlösung aus synthetischem Abwasser Stammlösungen angesetzt. Für nicht lösliche chemische Substanzen siehe Kapitel C.10-A, Anlage 5. Diese Methode ist für flüchtige Substanzen ohne Modifizierung der Drehrohrreaktoren (Nummer 16) nicht geeignet. Der DOC- und der TOC-Gehalt der Stammlösung werden bestimmt und die Messungen für jede neue Charge wiederholt. Bei einer Differenz zwischen DOC und TOC von mehr als 20 % wird die Wasserlöslichkeit der Prüfsubstanz überprüft. Der DOC oder die durch spezifische Analyse der Stammlösung gemessene Konzentration der Prüfsubstanz wird mit dem Nennwert verglichen, um festzustellen, ob die Wiederfindungsrate ausreicht (in der Regel kann mit > 90 % gerechnet werden). Vor allem bei Dispersionen ist festzustellen, ob der DOC-Wert als Analyseparameter verwendet werden kann oder nicht oder ob nur ein prüfsubstanzspezifisches Analyseverfahren angewendet werden kann. Bei Dispersionen müssen die Proben zentrifugiert werden. Bei jeder neuen Charge werden

der DOC-Wert, der CSB-Wert bzw. die Prüfsubstanz durch spezifische Analyse gemessen.

27. Der pH-Wert der Stammlösung wird bestimmt. Extremwerte zeigen an, dass die Zugabe der chemischen Substanz den pH-Wert des Belebtschlammes im Prüfsystem beeinflussen kann. In diesem Fall wird die Stammlösung mit kleinen Mengen anorganischer Säure oder Base Trägerstoff neutralisiert, um einen pH-Wert von  $7 \pm 0,5$  zu erhalten, wobei eine Ausfällung der Prüfsubstanz zu vermeiden ist.

## **PRÜFVERFAHREN**

### *Vorbereitung des organischen Mediums für die Zudosierung*

28. Alle Zulauf- und Ablaufgefäße und die Schlauchleitungen aus den Zulauf- und zu den Ablaufgefäßen sind vor und während des Tests gründlich zu säubern, um Mikrobenbewuchs zu entfernen.
29. Aus den Feststoffen oder aus der konzentrierten Stammlösung wird durch Verdünnen mit einer angemessenen Menge Leitungswasser täglich frisches synthetisches Abwasser (Nummer 23) vorbereitet. Die erforderliche Menge wird in einem Zylinder dosiert und in ein sauberes Vorratsgefäß gegeben. Bei Bedarf wird dem synthetischen Abwasser vor der Verdünnung auch die Stammlösung der Prüfsubstanz oder der Referenzsubstanz in vorgegebener Menge zugesetzt. Wenn dies praktischer oder zur Vermeidung von Prüfsubstanzverlusten notwendig ist, wird in einem separaten Gefäß eine verdünnte Lösung der Prüfsubstanz gesondert vorbereitet und dem geeigneten Rohrreaktor über eine andere Dosierpumpe zugeführt.
30. Alternativ (und vorzugsweise) wird abgesetztes Haushaltsabwasser (Nummer 24) verwendet, das möglichst täglich frisch bezogen wird.

### *Betrieb der Drehrohrreaktoren*

31. Zur Bewertung einer einzelnen Prüfsubstanz sind zwei identische Rohrreaktoren erforderlich, die in einem Raum mit konstanten Temperaturbedingungen von  $22 \pm 2$  °C montiert werden.
32. Die Peristaltikpumpen werden so eingestellt, dass stündlich  $250 \pm 25$  ml organisches Medium (ohne Prüfsubstanz) in die geeigneten Rohre dosiert werden, die bei  $18 \pm 2$  rpm rotieren. Die Pumpenrohre werden vor Beginn und regelmäßig während des Tests geschmiert (Nummer 25), um einen reibungslosen Prozessablauf und eine möglichst lange Lebensdauer der Rohrinstallation zu gewährleisten.
33. Der Neigungswinkel der Rohre zur Horizontalen wird so eingestellt, dass eine Verweilzeit des Zuflusses im sauberen Rohr von  $125 \pm 12,5$  Sekunden gewährleistet ist. Die Verweilzeit wird durch Versetzung des Zuflusses mit einem nichtbiologischen Markierungsstoff (z. B. NaCl, inerte Farbstoff) geschätzt: Dabei gilt die Zeit, bis die Höchstkonzentration im Abfluss erreicht ist, als mittlere Verweilzeit (ist Biofilm in maximaler Menge vorhanden, kann sich die Verweilzeit auf bis zu 30 Minuten erhöhen).

34. Diese Raten, Geschwindigkeiten und Zeiten haben sich für angemessene DOC- (bzw. CBS-)Abnahmeraten (> 80 %) und die Nitrifikation von Abflüssen bewährt. Die Fließgeschwindigkeit sollte geändert werden, wenn die Abnahme unzulänglich ist oder die Leistung einer bestimmten Kläranlage simuliert werden soll. In letzterem Fall sollte die Zudosierung des organischen Mediums so lange justiert werden, bis die Leistung des Reaktors der Kläranlagenleistung entspricht.

#### *Animpfung*

35. Bei Verwendung von synthetischem Abwasser reicht zur Anregung des Wachstums der Mikroorganismen möglicherweise eine aerogene Inokulation aus; andernfalls wird dem Zufluss drei Tage lang 1 ml/l abgesetztes Abwasser zugegeben.

#### *Messungen*

36. In regelmäßigen Abständen wird kontrolliert, ob die Dosiermengen und die Rotationsgeschwindigkeiten innerhalb der vorgegebenen Grenzen liegen. Darüber hinaus wird der pH-Wert des Abflusses gemessen, vor allem, wenn mit Nitrifikation gerechnet werden muss.

#### *Probenahme und Analyse*

37. Methode, Schema und Häufigkeit der Probenahmen richten sich nach der Zweckbestimmung des Tests. Es werden beispielsweise Momentproben (*snap/grab samples*) des Zu- und Ablaufs gezogen, oder die Proben werden über einen längeren, z. B. drei- bis sechsständigen, Zeitraum entnommen. In der ersten Phase (in der noch keine Prüfsubstanz zugegeben wurde) werden zweimal wöchentlich Proben gezogen. Diese werden entweder durch eine Membran gefiltert oder bei etwa 40 000 m/sec<sup>2</sup> für ungefähr 15 Minuten zentrifugiert (Nummer 18). Möglicherweise müssen die Proben vor der Membranfiltration sedimentiert und/oder grob gefiltert werden. Der DOC-Wert (bzw. der CSB-Wert) wird mindestens doppelt bestimmt, ebenso wie erforderlichenfalls der BSB-, Ammonium- und Nitrit-/Nitratwert.
38. Alle Analysen sollten nach dem Ziehen und Vorbereiten der Proben so bald wie möglich durchgeführt werden. Müssen Analysen zeitlich verschoben werden, sind die Proben in randvollen, fest verschlossenen Flaschen bei ungefähr 4°C dunkel zu lagern. Müssen die Proben für länger als 48 Stunden gelagert werden, sollten sie durch Tiefgefrieren, Ansäuern oder Zugabe einer geeigneten toxischen Substanz (z. B. 20 ml/l einer 10 g/l-Lösung Quecksilber(II)-Chlorid) haltbar gemacht werden. Dabei ist sicherzustellen, dass die Konservierungsmethode die Analyseergebnisse nicht beeinträchtigt.

#### *Vorlaufphase (Running-in period)*

39. In dieser Phase, die in der Regel etwa zwei Wochen dauert, sechs Wochen jedoch nicht überschreiten sollte, entwickelt sich auf der Grenzfläche ein Biofilm optimaler Dicke. Der DOC- (bzw. der CSB-)Wert nimmt weiter ab (Nummer 44) und erreicht einen Plateauwert. Ist in beiden Rohren ein vergleichbarer Plateauwert erreicht, wird ein Rohr ausgewählt, das für die restliche Prüfungsdauer, während der die Leistungen beider Rohre konsistent bleiben sollten, als Kontrollanlage fungiert.

### *Zugabe der Prüfsubstanz*

40. In dieser Phase wird der zweite Reaktor in vorgegebener Konzentration (in der Regel 10-20 mg C/l) mit Prüfsubstanz beschickt. Der Kontrollanlage wird weiterhin nur organisches Medium zugeführt.

### *Akklimatisierungsphase*

41. Der DOC-Wert (bzw. der CSB-Wert) wird weiterhin zweimal wöchentlich bestimmt; wenn die primäre Bioabbaubarkeit bestimmt werden muss, wird durch spezifische Analyse auch die Prüfsubstanzkonzentration gemessen. Zur Akklimatisierung sollten nach Erstzugabe der Prüfsubstanz eine bis sechs Wochen (unter besonderen Umständen auch länger) eingeplant werden. Sobald die prozentuale Abnahme (Nummern 43-45) ihren Höchststand erreicht hat, werden während der Plateauphase über einen Zeitraum von ungefähr drei Wochen 12-15 gültige Werte ermittelt, um die mittlere Abnahmerate zu bestimmen. Der Test gilt als abgeschlossen, wenn ein ausreichend hoher Eliminationsgrad erreicht ist. Der Test sollte nach Erstzugabe der Prüfsubstanz nicht länger als zwölf Wochen dauern.

### *Bewuchsablösungen (Sloughing)*

42. In relativ regelmäßigen Zeitabständen lösen sich plötzlich ganze Teile überschüssigen Films von den Rohren ab (*Sloughing*). Um sicherzustellen, dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht beeinträchtigt wird, sollten die Tests mindestens zwei vollständige Wachstums- und *Sloughing*-Zyklen erfassen.

## **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

### **Auswertung der Ergebnisse**

43. Die prozentuale Abnahme (Elimination) der Prüfsubstanz, basierend auf der DOC- bzw. der CSB-Messung, wird in den vorgegebenen Zeitabständen nach folgender Gleichung berechnet:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_o)] / C_s \%$$

Dabei sind

- $D_t$  = der Prozentsatz der Abnahme des DOC- bzw. des CSB-Wertes zum Zeitpunkt t  
 $C_s$  = die DOC- bzw. CSB-Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf, vorzugsweise anhand der Stammlösung geschätzt (mg/l)  
 $E$  = der gemessene DOC- oder CSB-Wert im Ablauf der Prüfanlage zum Zeitpunkt t (mg/l)  
 $E_o$  = der gemessene DOC- oder CSB-Wert im Ablauf der Kontrollanlage zum Zeitpunkt t (mg/l)

Die Berechnung sollte für die Referenzsubstanz, sofern getestet, wiederholt werden.

### **Leistung des Kontrollreaktors**

44. Der Grad der Elimination des organischen Mediums in den Kontrollreaktoren, bezogen auf den DOC- bzw. den CSB-Wert, ist eine nützliche Größe für die Bestimmung der biologischen Abbauaktivität des Biofilms während der Prüfung. Die prozentuale Elimination wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$D_B = 100 (1 - E_o/C_m) \%$$

Dabei ist:

- $C_m$  = DOC- bzw. CSB-Wert des organischen Mediums im Zulauf der Kontrollanlage (mg/l)

45. Die Abnahme ( $D_{ST}$ ) der Prüfsubstanz wird, soweit nach einer spezifischen Analyseverfahren gemessen, in den vorgegebenen Zeitabständen nach folgender Gleichung berechnet:

$$DST = 100 (1 - S_e / S_i) \%$$

Dabei sind:

$S_i$  = die gemessene oder vorzugsweise geschätzte Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf der Prüfanlage (mg/l)

$S_e$  = die gemessene Konzentration der Prüfsubstanz im Ablauf der Prüfanlage zum Zeitpunkt  $t$  (mg/l)

Ergibt die Analysemethode bei unverändertem Abwasser einen positiven Wert ( $S_c$  mg/l), wird die prozentuale Abnahme ( $D_{SC}$ ) nach folgender Gleichung berechnet:

$$DSC = 100 (S_i - S_e + S_c) / (S_i + S_c) \%$$

### Darstellung der Prüfergebnisse

46. Die prozentuale Elimination  $D_t$  und  $D_{ST}$  (oder  $D_{sc}$ ), soweit dieser Wert vorliegt, wird gegen die Zeit aufgetragen (siehe Kapitel C.10-A, Anlage 2). Die (auf die nächste ganze Zahl gerundete) mittlere Abweichung und die Standardabweichung der in der Plateauphase ermittelten 12-15 Werte für  $D_T$  (und für  $D_{ST}$ , falls dieser Wert vorliegt) entsprechen der prozentualen Abnahme der Prüfsubstanz. Vom Verlauf der Eliminationskurve lassen sich bestimmte Schlüsse über die Abnahmeprozesse ziehen.

### Adsorption

47. Manifestiert sich zu Prüfungsbeginn bei der Prüfsubstanz eine starke DOC-Elimination, wird die Prüfsubstanz wahrscheinlich durch Anlagerung (Adsorption) an den Biofilm eliminiert. Dieser Vorgang kann möglicherweise durch Bestimmung der Prüfsubstanz nachgewiesen werden, die an Feststoffen, die sich vom Film abgelöst haben, angelagert ist. Die DOC-Elimination adsorptionsfähiger chemischer Substanzen bleibt erfahrungsgemäß nicht während der gesamten Prüfung hoch; in der Regel ist sie zu Beginn der Prüfung hoch und fällt dann allmählich auf ein stabiles Niveau. Könnte die adsorptionsfähige Prüfsubstanz jedoch auf die eine oder andere Weise eine Akklimatisation der Mikrobenpopulation herbeiführen, würde die DOC-Elimination der Prüfsubstanz in der Folge ansteigen und einen hohen Plateauwert erreichen.

### Latenzphase (Lag-Phase)

48. Wie bei statischen Screeningtests müssen viele Prüfsubstanzen eine Latenzphase durchlaufen, bevor sie vollständig biologisch abgebaut werden. In dieser *Lag*-Phase akklimatisieren (bzw. adaptieren) sich die betreffenden Bakterien, ohne dass in nennenswertem Maße Prüfsubstanz abgebaut wird; erst nach dieser Phase setzt das Bakterienwachstum ein. Die Phase endet und die Abbauphase gilt als begonnen, wenn etwa 10 % der anfänglichen Prüfsubstanzmenge abgebaut sind (nach der Adsorption, falls es dazu kommt). Die *Lag*-Phase ist oft sehr variabel und schwer reproduzierbar.

### Plateauphase

49. Die Plateau-Phase einer Eliminationskurve im kontinuierlichen Test ist definiert als die Phase, in der maximale Zersetzung stattfindet. Sie sollte mindestens 3 Wochen dauern, in denen etwa 12-15 gültige Messwerte ermittelt werden.

### **Mittlerer Eliminationsgrad der Prüfsubstanz**

50. Dieser Mittelwert wird anhand der Eliminationswerte  $D_t$  (und  $D_{st}$ , falls dieser Wert vorliegt) der Prüfsubstanz in der Plateauphase berechnet. Auf die nächste ganze Zahl (1 %) gerundet entspricht dieser Wert dem Eliminationsgrad der Prüfsubstanz. Ferner wird empfohlen, das 95 %-Konfidenzniveau für den Mittelwert zu berechnen. Auf dieselbe Weise wird der mittlere Eliminationsgrad ( $D_B$ ) des organischen Mediums im Kontrollgefäß berechnet.

### **Hinweis auf den biologischen Abbau**

51. Lagert sich die Prüfsubstanz nicht in nennenswertem Umfang an den Biofilm an und hat die Eliminationskurve die typische Form einer Bioabbaukurve mit Latenz-, Abbau- und Plateauphasen (Nummern 48, 49), so kann die gemessene Elimination mit Sicherheit dem biologischen Abbau zugeschrieben werden. War die Abnahme im Anfangsstadium hoch, kann der Simulationstest nicht zwischen biologischen und abiotischen Eliminationsprozessen differenzieren. In derartigen Fällen und in anderen Fällen, in denen Zweifel am biologischen Abbau bestehen (z. B. wenn die Prüfsubstanz ausgegast wird (*stripping*)), wird die Adsorption der Prüfsubstanz an Biofilmprouben untersucht, oder anhand von Parametern, die biologische Prozesse genau angeben, werden zusätzliche statische Bioabbaubarkeitstests (Screeningtests) durchgeführt. Zu derartigen Tests zählen die Sauerstoffaufnahmemethoden (Kapitel C.4 (D, E und F) dieses Anhangs) (9) oder Kohlendioxid-Entwicklungstests (Kapitel C.4-C dieses Anhangs oder die ISO-*Headspace*-Methode (10)), wobei als Inokulum zuvor exponierter Biofilm aus dem entsprechenden Reaktor verwendet wird.
52. Wurden sowohl die DOC-Abnahme als auch die Prüfsubstanzabnahme gemessen, deuten große Unterschiede (d. h. wenn erstere geringer ist als letztere) zwischen den Abnahmeprozentsätzen auf die Präsenz intermediärer organischer Produkte in den Abläufen hin, die möglicherweise schwerer abzubauen sind und untersucht werden sollten.

### **Gültigkeit der Prüfergebnisse**

53. Der Test kann als gültig angesehen werden, wenn der Grad der DOC-Elimination (bzw. der CSB-Elimination) in den Kontrollanlagen nach zwei Wochen Betrieb > 80 % beträgt und nichts Ungewöhnliches festgestellt wurde.
54. Wurde eine leicht biologisch abbaubare (Referenz-)Substanz getestet, sollten der Abbaubarkeitsgrad > 90 % und die Differenz zwischen Duplikatwerten nicht mehr als 5 % betragen. Sind diese beiden Kriterien nicht erfüllt, sollten die Testverfahren überprüft werden, und/oder es sollte Haushaltsabwasser aus einer anderen Quelle bezogen werden.
55. Gleichmaßen sollten Differenzen zwischen Abbaubarkeitswerten aus einer Prüfsubstanz behandelnden Duplikatanlagen (sofern verwendet) nicht mehr als 5 %



betragen. Wenn dieses Kriterium nicht erfüllt ist, die Abnahmewerte jedoch hoch sind, sollten die Analysen für weitere drei Wochen fortgesetzt werden. Sind die Abnahmewerte gering, müssen die Hemmwirkungen der Prüfsubstanz, soweit sie nicht bekannt sind, untersucht werden, und der Test muss mit einer niedrigeren Prüfsubstanzkonzentration wiederholt werden, sofern dies möglich ist.

## Prüfbericht

56. Der Prüfbericht muss Folgendes umfassen:

### *Prüfsubstanz:*

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

### *Prüfbedingungen:*

- etwaige Modifikationen des Prüfsystems, vor allem bei Prüfungen nicht löslicher und flüchtiger chemischer Substanzen;
- Art des organischen Mediums;
- Anteil (und Art) der Industrieabwässer im kommunalen Abwasser, soweit bekannt;
- Animpfungsmethode;
- Prüfsubstanz-Stammlösung: DOC- und TOC-Gehalt; bei Suspension: Art der Zubereitung; verwendete Testkonzentration; falls außerhalb der Bandbreite von 10-20 mg/l DOC: Begründung; Zugabemethode; Datum der ersten Zugabe; etwaige Änderungen der Konzentration;
- mittlere hydraulische Verweilzeit (ohne Wachstum); Rotationsgeschwindigkeit des Rohres; ungefährender Neigungswinkel (wenn möglich);
- Angaben zur Bewuchsablösung (*Sloughing*); Dauer und Intensität;
- Testtemperatur und Temperaturspanne;
- angewandte Analysetechniken.

### *Prüfergebnisse:*

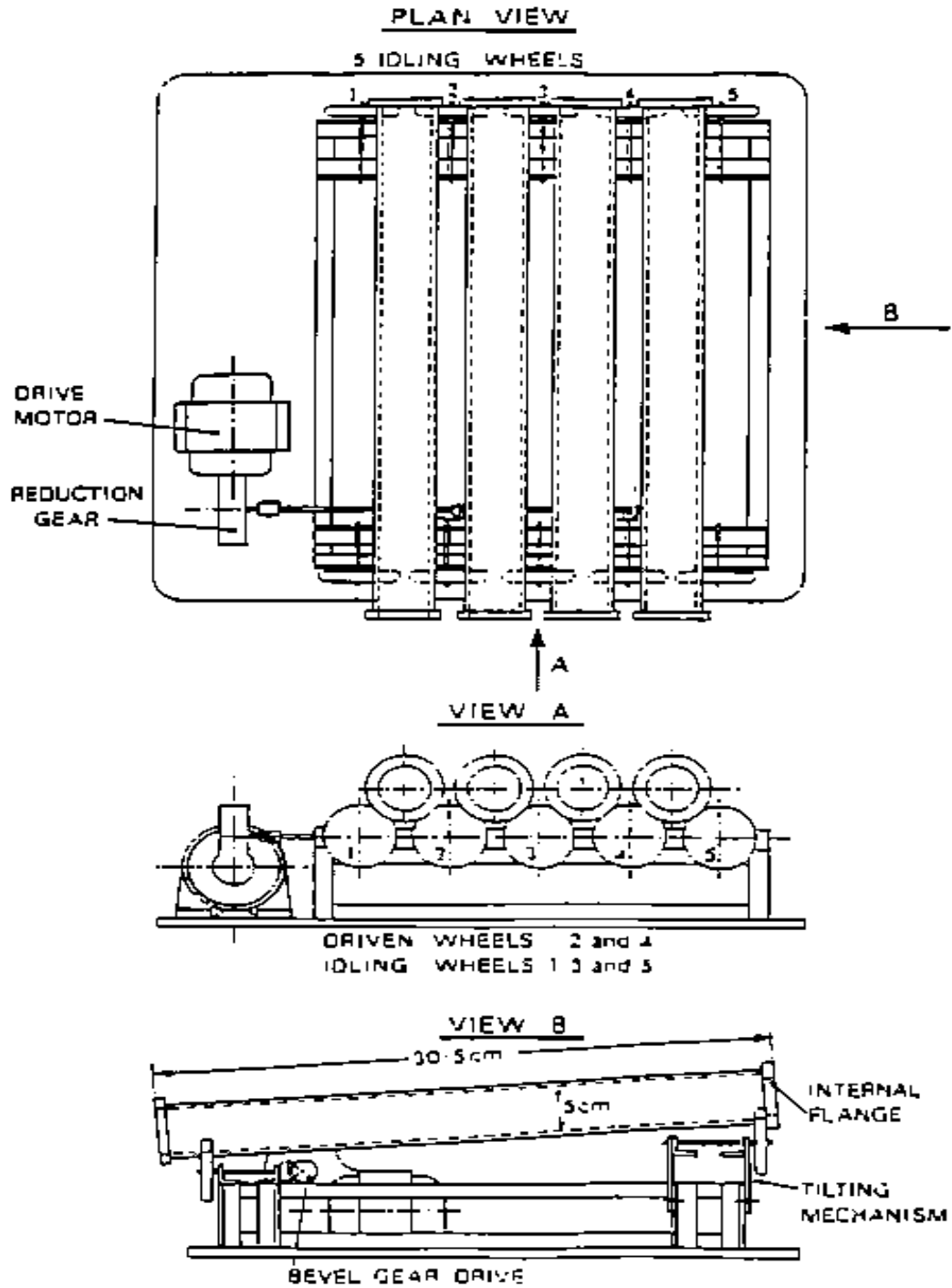
- alle Messdaten (DOC, CSB, spezifische Analysen, pH-Wert, Temperatur, N-Chemikalien, soweit relevant);
- alle Berechnungswerte für  $D_t$  (oder  $D_{tc}$ ),  $D_B$ ,  $D_S$  in tabellarischer Form und als Eliminationskurven;
- Aussagen zu Latenz- und Plateau-Phasen, Prüfungsdauer, Eliminationsgrad der Prüfsubstanz, der Referenzsubstanz (falls getestet) und des organischen Mediums (in der Kontrollanlage) sowie statistische Informationen und Angaben zur Bioabbaubarkeit und zur Gültigkeit des Tests;
- Diskussion der Ergebnisse.

## LITERATUR

- (1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). *Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test*. Wat. Res. 14: 753-758.
- (2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). *Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material*. Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.
- (3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
- (4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). *Rotary tubes as experimental trickling filters*. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.
- (5) Kumke GW, Renn CE (1966). *LAS removal across an institutional trickling filter*. JAOCS 43: 92-94.
- (6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). *Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms*. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.
- (7) Her Majesty's Stationery Office (1982). *Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability*, 1981, London.
- (8) Her Majesty's Stationery Office (1984). *Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes*, 1982, London.
- (9) Kapitel C.4 dieses Anhangs, Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit, A-F.
- (10) ISO 14593 (1998). Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen im wässrigen Medium - Verfahren mittels Bestimmung des anorganischen Kohlenstoffs in geschlossenen Flaschen.

# ANLAGE 8

Abbildung 1: Drehrohre



Legende:

Draufsicht:

Draufsicht A/B:

Antriebsrollen:

Umlenkrollen:

Antriebsmotor:

Umsetzungsgetriebe:

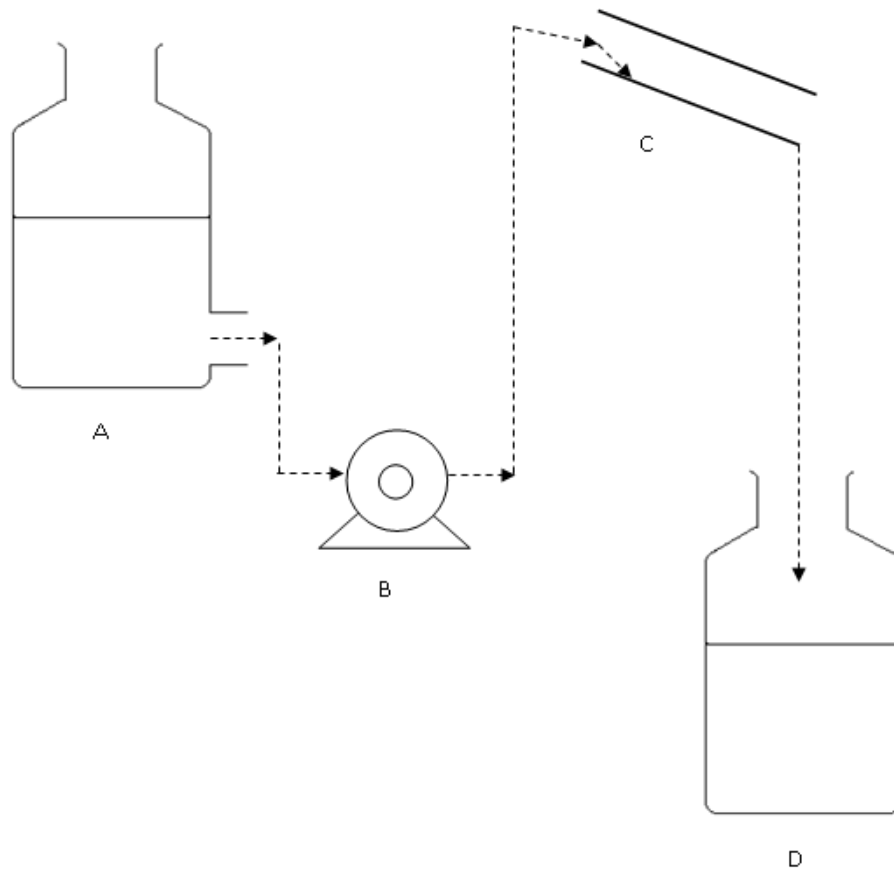
Innenflansch:

Neigungsmechanismus:

Kegelradgetriebe:

Abbildung 2

Fließdiagramm



A: Zulaufgefäß

B: Peristaltikpumpe

C: Drehrohr

D: Ablaufsammelgefäß

## **BEGRIFFSBESTIMMUNGEN:**

- a. Prüfsubstanz: jede nach dieser Prüfmethode getestete Substanz oder Mischung.
  
- b. Chemische Substanzen: „Es wird darauf hingewiesen, dass der Begriff ‚chemische Substanz‘ in den UNCED-Übereinkommen und Folgedokumenten im Allgemeinen Substanzen, Produkte, Gemische, Aufbereitungen oder jeden anderen Begriff einschließt, der in bestehenden Systemen möglicherweise zur Beschreibung des Prüfgegenstands verwendet wird.“

(10) Folgende Kapitel C.27, C.28, C.29 und C.30 werden angefügt:

**„C.27 CHIRONOMIDEN-TOXIZITÄTSTEST IN SEDIMENT-WASSER-SYSTEMEN  
MIT GESPIKTEM SEDIMENT**

**EINLEITUNG**

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 218 (2004). Sie dient der Bewertung der Wirkung einer Langzeitexposition gegenüber Chemikalien auf die sedimentbewohnenden Larven von *Chironomus* sp., einem in Frischwasser lebenden Zweiflügler. Die Methode basiert auf bestehenden Protokollen für Toxizitätstests mit *Chironomus riparius* und *Chironomus tentans*, die in Europa (1)(2)(3) und Nordamerika (4)(5)(6)(7)(8) entwickelt und Ringtests (1)(6)(9) unterzogen wurden. Auch andere gut dokumentierte Chironomid-Arten wie *Chironomus yoshimatsui* (10)(11) sind geeignet.
2. Bei dem für diese Prüfmethode verwendeten Expositionsszenario wird das Sediment mit der Prüfsubstanz gespikt. Die Wahl des Szenarios hängt vom jeweiligen Testziel ab. Durch Dotieren (Spiken) des Sediments soll die Akkumulation von persistenten Chemikalien im Sediment simuliert werden. Dieser Vorgang erfolgt in einem Sediment-Wasser-System.
3. In der Regel haben die an sedimentbewohnenden Organismen zu testenden Substanzen eine lange Verweildauer in diesem Kompartiment. Sedimentbewohner können über verschiedene Wege exponiert werden. Die relative Bedeutung der einzelnen Expositionspfade und die Geschwindigkeit, mit der diese jeweils zu den gesamten toxischen Wirkungen beitragen, hängen von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der betreffenden Substanz ab. Für stark adsorbierende Substanzen (z. B.  $\log K_{ow} > 5$ ) oder für kovalent an das Sediment gebundene Substanzen kann die Aufnahme von Schadstoffen über die Nahrung einen wichtigen Expositionspfad darstellen. Die Toxizität hoch lipophiler Substanzen sollte nicht unterschätzt werden, weshalb gegebenenfalls vor Applikation der Prüfsubstanz dem Sediment Futter hinzugegeben werden sollte. Um alle potenziellen Expositionspfade zu berücksichtigen, liegt der Schwerpunkt bei dieser Prüfmethode auf der Langzeitexposition. Die Testdauer beträgt 20 bis 28 Tage für *C. riparius* und *C. yoshimatsui* und 28 bis 65 Tage für *C. tentans*. Falls aus einem besonderen Grund, z. B. zur Untersuchung der Wirkungen von instabilen Chemikalien, Kurzzeitdaten benötigt werden, können nach dem 10. Versuchstag zusätzliche Replikate entnommen werden.
4. Als Endpunkte werden die Gesamtzahl der geschlüpften Imagines und die Emergenzzeit gemessen. Falls zusätzlich Kurzzeitdaten benötigt werden, sollten die Messungen der Überlebensrate und des Wachstums der Larven erst nach dem 10. Tag gegebenenfalls anhand zusätzlicher Replikate vorgenommen werden.
5. Es wird empfohlen, formuliertes Sediment zu verwenden, da es gegenüber natürlichen Sedimenten mehrere Vorteile hat:
  - Die Variabilität zwischen den Versuchen ist nicht so groß, da formuliertes Sediment eine reproduzierbare „standardisierte Matrix“ ergibt und es nicht erforderlich ist, Quellen für unkontaminiertes, sauberes Sediment ausfindig zu machen;

- es kann jederzeit mit den Versuchen begonnen werden, ohne durch jahreszeitliche Schwankungen gestört zu werden und ohne dass eine Vorbehandlung zur Defaunierung des Sediments erforderlich wäre; die Verwendung von formuliertem Sediment reduziert auch die Kosten, die bei Feldprobenahmen ausreichender Sedimentmengen für Routineprüfungen anfallen;
  - die Verwendung formulierter Sedimente ermöglicht Toxizitätsvergleiche und die entsprechende Einstufung der Substanzen.
6. Die verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

## **PRINZIP DER PRÜFMETHODE**

7. Chironomidlarven des 1. Larvenstadiums (L1-Larven) werden gegenüber der Prüfsubstanz in verschiedenen Konzentrationen in Sediment-Wasser-Systemen exponiert. Das Sediment wird mit der Prüfsubstanz dotiert (gespikt); anschließend werden L1-Larven in Bechergläser mit stabilisierten Sediment- und Wasserkonzentrationen eingesetzt. Zum Versuchsende werden Emergenz und Entwicklungsrate der Chironomiden bestimmt. Sofern erforderlich, können (gegebenenfalls anhand zusätzlicher Replikate) nach 10 Tagen Messungen der Überlebensrate und des Gewichts der Larven vorgenommen werden. Analysiert werden diese Daten entweder anhand eines Regressionsmodells, um die Konzentration zu ermitteln, die zu einer x-%igen Verringerung der Emergenz-, Überlebens- oder Wachstumsrate der Larven führt (z. B. EC<sub>15</sub>, EC<sub>50</sub> etc.), oder anhand statistischer Hypothesentests zur Bestimmung von NOEC/LOEC-Werten. Hierzu sind die Wirkungswerte anhand statistischer Tests mit Kontrollwerten zu vergleichen.

## **ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ**

8. Wasserlöslichkeit und Dampfdruck der Prüfsubstanz, ihre gemessene oder berechnete Verteilung im Sediment sowie ihre Stabilität im Wasser und im Sediment sollten bekannt sein. Ein zuverlässiges Analyseverfahren für die Quantifizierung der Prüfsubstanz im Überstandswasser, Porenwasser und Sediment mit bekannter und dokumentierter Genauigkeit und Nachweisgrenze sollte vorhanden sein. Weitere nützliche Informationen sind die Strukturformel und der Reinheitsgrad der Prüfsubstanz sowie das chemische Schicksal der Prüfsubstanz (z. B. Verlustrate, abiotischer und biotischer Abbau usw.). Weitere Hinweise zu Prüfsubstanzen mit physikalisch-chemischen Merkmalen, welche die Durchführung des Tests erschweren, sind Quelle (12) zu entnehmen.

## **REFERENZSUBSTANZEN**

9. Referenzsubstanzen können regelmäßig getestet werden, um auf diese Weise die Zuverlässigkeit des Prüfprotokolls und der Prüfbedingungen zu gewährleisten. Beispiele von Referenzgiftstoffen, die erfolgreich in Ringtests und Validierungsstudien verwendet werden: Lindan, Trifluralin, Pentachlorphenol, Cadmiumchlorid und Kaliumchlorid (1)(2)(5)(6)(13).



## GÜLTIGKEIT DER ERGEBNISSE

10. Der Test ist gültig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- Die Emergenz in den Kontrollen muss am Ende des Tests mindestens 70 % betragen. (1)(6);
- erste Imagines von *C. riparius* und *C. yoshimatsui* sollten zwischen dem 12. und dem 23. Tag nach dem Einsetzen der Tiere in die Prüfgefäße schlüpfen; für *C. tentans* sind 20 bis 65 Tage erforderlich;
- zum Versuchsende sind der pH-Wert und die Konzentration an gelöstem Sauerstoff zu messen. Der Sauerstoffgehalt sollte mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes betragen und der pH-Wert des Überstandswassers sollte in allen Prüfgefäßen zwischen 6 und 9 liegen;
- die Wassertemperatur sollte nicht mehr als  $\pm 1,0$  °C schwanken; sie kann mit Hilfe einer Klimakammer kontrolliert werden, wobei in diesem Fall die Raumtemperatur in angemessenen Zeitabständen zu bestimmen ist.

## BESCHREIBUNG DER METHODE

### Prüfgefäße

11. Der Versuch wird in 600-ml-Glasbechergläsern mit einem Durchmesser von 8 cm durchgeführt. Andere Gefäße sind ebenfalls geeignet, sofern sie eine entsprechende Höhe von Überstandswasser und Sediment fassen. Die Sedimentoberfläche sollte 2 bis 3 cm<sup>2</sup> pro Larve bieten. Das Verhältnis zwischen Sedimentschicht und Überstandswasser sollte 1:4 betragen. Die Prüfgefäße und sonstigen Geräte, die mit dem Prüfsystem in Kontakt kommen, müssen vollständig aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Material (z. B. Teflon) bestehen.

### Wahl der Testspezies

12. Als Testspezies sollte bevorzugt *Chironomus riparius* eingesetzt werden. *Chironomus tentans* ist ebenfalls geeignet, lässt sich aber schwieriger handhaben und erfordert eine längere Prüfdauer. Auch *Chironomus yohimatsui* kann verwendet werden. Einzelheiten zu den Anzuchtverfahren für *Chironomus riparius* sind in Anlage 2 enthalten. Informationen zu den Anzuchtbedingungen sind auch für andere Arten (*Chironomus tentans* (4) und *Chironomus yoshimatsui* (11)) verfügbar. Die Identität der Spezies ist vor der Prüfung zu bestätigen, allerdings ist dies nicht vor jedem Test erforderlich, wenn die Organismen aus laboreigener Zucht stammen.

### Sediment

13. Vorzugsweise ist formuliertes Sediment (so genanntes rekonstituiertes, künstliches oder synthetisches Sediment) zu verwenden. Wenn jedoch natürliches Sediment verwendet wird, so ist es zu charakterisieren (zumindest pH-Wert und Gehalt an organischem Kohlenstoff; die Bestimmung sonstiger Parameter wie C/N-Verhältnis und Granulometrie wird ebenfalls empfohlen). Auch sollte es frei von Verunreinigungen sowie Konkurrenten und Fressfeinden der Chironomiden sein. Ferner wird empfohlen,

natürliches Sediment vor seiner Verwendung in einem Chironomiden-Toxizitätstest für sieben Tage unter denselben Bedingungen, wie sie im anschließenden Test herrschen, zu konditionieren. Für diesen Test wird auf der Grundlage der in der Prüfmethode C.8 (14) verwendeten Kunsterde folgendes formuliertes Sediment empfohlen (1)(15)(16):

- a) 4-5 % (bezogen auf die Trockenmasse) Torf: so nahe wie möglich bei pH 5,5 bis 6,0; wichtig: Torf in Pulverform, feingemahlen (Partikelgröße  $\leq 1$  mm) und nur luftgetrocknet, verwenden;
- b) 20 % (bezogen auf die Trockenmasse) Kaolin-Ton (Kaolingegehalt vorzugsweise über 30 %);
- c) 75-76 % (bezogen auf die Trockenmasse) Quarzsand (hauptsächlich Feinsand, der zu mehr als 50 % eine Korngröße von 50 bis 200  $\mu\text{m}$  aufweist);
- d) der Feuchtegehalt der fertigen Mischung wird durch die Zugabe von entionisiertem Wasser auf einen Wert zwischen 30 % und 50 % eingestellt;
- e) durch die Zugabe von chemisch reinem Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) wird die fertige Mischung des Sediments auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,5$  eingestellt. Der Gehalt der fertigen Mischung an organischem Kohlenstoff sollte 2 % ( $\pm 0,5$  %) betragen und ist durch Zugabe geeigneter Mengen Torf und Sand (siehe Buchstaben a und c) zu gewährleisten.

14. Die Herkunft von Torf, Kaolin-Ton und Sand sollte bekannt sein. Es sollte kontrolliert werden, dass die Bestandteile des Sediments nicht chemisch verunreinigt sind (z. B. durch Schwermetalle, chlororganische Verbindungen, phosphororganische Verbindungen usw.). Ein Beispiel für die Herstellung des formulierten Sediments ist in Anlage 3 beschrieben. Die Bestandteile können auch in trockenem Zustand gemischt werden, sofern nachgewiesen ist, dass es nach Zugabe des Überstandswassers nicht zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile kommt (z. B. schwimmende Torfpartikel) und dass der Torf oder das Sediment ausreichend konditioniert ist.

## **Wasser**

15. Alle Wassersorten, die den chemischen Eigenschaften von zugelassenem Verdünnungswasser gemäß den Anlagen 2 und 4 entsprechen, sind als Testwasser geeignet. Natürliches Wasser (Oberflächen- oder Grundwasser), rekonstituiertes Wasser (siehe Anlage 2) oder entchlortes Leitungswasser sind als Hälterungs- und Verdünnungswasser zulässig, wenn die Chironomiden hierin während der Zucht- und Testphase ohne Stressanzeichen überleben. Zu Testbeginn sollte der pH-Wert des Testwassers zwischen 6 und 9 liegen und die Gesamthärte des Wassers sollte nicht mehr als 400 mg/l (in  $\text{CaCO}_3$ ) betragen. Wird jedoch ein Ionenaustausch zwischen den Härteionen und der Prüfsubstanz vermutet, ist Wasser geringerer Härte zu verwenden (und somit in diesem Fall das Elendt-Medium M4 zu vermeiden). Das Wasser muss über die gesamte Testdauer von gleichbleibender Qualität sein. Die Qualitätsparameter des Wassers gemäß Anlage 4 sind mindestens zweimal jährlich bzw. immer dann zu messen, wenn der Verdacht besteht, dass sie sich erheblich verändert haben.

## **Stammlösungen – Gespikte Sedimente**

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

## **VERSUCHSAUFBAU**

17. Unter „Versuchsaufbau“ sind die gewählte Anzahl und der Abstand der Testkonzentrationen, die Anzahl der Prüfgefäße je Konzentration und die Anzahl der Larven je Gefäß zu verstehen. Beschrieben werden die Verfahren für die Bestimmung der EC-Werte und der NOEC-Werte und für die Durchführung eines Limit-Tests.

### **Versuchsaufbau für die Regressionsanalyse**

18. Die im Test verwendeten Konzentrationen müssen in jedem Fall die Wirkungskonzentration (z. B.  $EC_{15}$ ,  $EC_{50}$ ) und den Konzentrationsbereich, in dem die Wirkung der Prüfsubstanz von Interesse ist, einschließen. Bei der Bestimmung von Wirkungskonzentrationen ( $EC_x$ ) wird in der Regel eine größere Genauigkeit und insbesondere Validität erzielt, wenn die Wirkungskonzentration im Bereich der getesteten Konzentrationen liegt. Extrapolierungen weit unter der niedrigsten positiven Konzentration oder über der höchsten Konzentration sind zu vermeiden. Ein Vorversuch kann die Auswahl der zu verwendenden Konzentrationsspanne erleichtern (siehe Nummer 27).
19. Für die Bestimmung von  $EC_x$  sollten mindestens fünf Konzentrationen und drei Replikate jeder Konzentration getestet werden. Im Interesse einer angemessenen Modellierung ist es in jedem Fall ratsam, eine hinreichende Anzahl an Konzentrationen zu testen. Die Konzentrationen sollten sich um einen Faktor von nicht mehr als 2 unterscheiden (außer bei einer schwachen Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve). Die Anzahl der Replikate pro Behandlung kann reduziert werden, wenn die Anzahl der Prüfkonzentrationen mit unterschiedlicher Wirkung erhöht wird. Eine höhere Anzahl an Replikaten oder eine Verkürzung der Intervalle zwischen den Prüfkonzentrationen führt tendenziell zu engeren Konfidenzintervallen für den Test. Zur Bestimmung der Überlebensrate und des Wachstums der Larven nach 10 Tagen sind zusätzliche Replikate erforderlich.

### **Versuchsaufbau für die Bestimmung von NOEC/LOEC-Werten**

20. Zur Bestimmung von LOEC- oder NOEC-Werten sollten fünf Prüfkonzentrationen mit mindestens vier Replikaten pro Konzentration verwendet werden, wobei sich die Konzentrationen um einen Faktor von nicht mehr als 2 unterscheiden sollten. Es sollten so viele Replikate verwendet werden, dass sich im Hinblick auf eine angemessene statistische Aussagekraft bei einem Signifikanzniveau von 5 % ( $p = 0,05$ ) eine Differenz von 20 % zur Kontrollkonzentration nachweisen lässt. Für die Entwicklungsrate eignen sich in der Regel Varianzanalysen (ANOVA) wie der Dunnett-Test und der Williams-Test (17)(18)(19)(20). Für die Schlupfrate kann der Cochran-Armitage-Test, der Exakte Test nach Fisher (mit Bonferroni-Korrektur) oder der Mantel-Haenszel-Test herangezogen werden.

### **Limit-Test**

21. Falls der Vorversuch keine Wirkungen zeigt, kann ein Limit-Test (mit je einer Prüfkonzentration und einer Kontrolle) durchgeführt werden. Der Limit-Test wird mit einer Konzentration durchgeführt, die hoch genug ist, dass Entscheidungsträger jegliche möglichen toxischen Wirkungen der Prüfsubstanz ausschließen können; dabei wird das Limit auf einen Konzentrationswert festgesetzt, der unter realen Bedingungen nicht erreicht werden dürfte. Empfohlen wird eine Konzentration von 1000 mg/kg (Trockengewicht). In der Regel sind jeweils mindestens sechs Replikate pro Behandlung und pro Kontrolle erforderlich. Es ist nachzuweisen, dass die statistische Aussagekraft ausreicht, um bei einem Signifikanzniveau von 5 % ( $p = 0,05$ ) eine Differenz von 20 % zur Kontrollkonzentration festzustellen. Für metrische Merkmale (Entwicklungsrate und Gewicht) ist der t-Test eine geeignete statistische Methode, sofern die Daten die Bedingungen für diesen Test (Normalverteilung, Varianzhomogenität) erfüllen. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so kann ein t-Test für ungleiche Varianzen oder ein nicht-parametrischer Test wie der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet werden. Für die Schlupfrate eignet sich der Exakte Test nach Fisher.

## **PRÜFVERFAHREN**

### **Expositionsbedingungen**

#### *Zubereitung des Sediment-Wasser-Systems mit gespiktem Sediment*

22. Für die Applikation der Prüfsubstanz wird das in der Prüfmethode „C.8: Toxizität für Regenwürmer“ beschriebene Spiking-Verfahren empfohlen (14). Gespiktes Sediment wird in die Prüfgefäße gefüllt und anschließend mit Wasser überschichtet, bis ein Verhältnis von Sediment zu Wasser von 1:4 erreicht ist (siehe Nummern 11 und 15). Die Sedimentschicht sollte 1,5 bis 3 cm dick sein. Um zu verhindern, dass es während der Zugabe von Prüfwasser in die Wassersäule zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile und einer Resuspension der feinen Partikel kommt, kann das Sediment beim Einfüllen des Wassers mit einer Plastikschale abgedeckt werden, die anschließend sofort entfernt wird. Andere Hilfsmittel sind ebenfalls geeignet.
23. Die Prüfgefäße sollten abgedeckt werden (z. B. mit Glasplatten). Etwaige Verdunstungsverluste im Laufe des Versuchs sind auszugleichen, und zwar mit destilliertem oder entionisiertem Wasser, um Salzfreiheit zu gewährleisten.

## Stabilisierung

24. Nach Fertigstellung des gespikten Sediments mit dem überschichteten Wasser ist abzuwarten, bis sich die Prüfsubstanz zwischen Wasserphase und Sediment verteilt hat (3)(4)(6)(13). Dies sollte bevorzugt unter denselben Temperatur- und Belüftungsbedingungen wie im Versuch erfolgen. Die erforderliche Zeit für die Einstellung des Gleichgewichts hängt vom Sediment und der Chemikalie ab. In einigen Fällen reichen ein paar Stunden oder Tage, in seltenen Fällen können sogar mehrere Wochen (4 bis 5 Wochen) erforderlich sein. Es sollte nicht abgewartet werden, bis die Gleichgewichtseinstellung abgeschlossen ist, da es in dieser Zeit bei vielen Chemikalien zu Abbauprozessen kommen kann, aber eine Wartezeit von 48 Std. wird empfohlen. Am Ende dieser Gleichgewichtseinstellungszeit wird die Konzentration der Prüfsubstanz im Überstandswasser, Porenwasser und Sediment gemessen, zumindest die Höchstkonzentration und eine niedrigere Konzentration (siehe Nummer 38). Diese analytischen Bestimmungen der Prüfsubstanz ermöglichen es, die Massenbilanz zu berechnen und die Ergebnisse auf der Grundlage der gemessenen Konzentrationen darzustellen.

## Einsetzen der Testorganismen

25. Vier bis fünf Tage vor dem Einsetzen der Testorganismen in die Prüfgefäße werden Eigelege aus der Zucht entnommen und in kleinen Gefäßen in das Kulturmedium eingesetzt. Es kann „altes“ Medium aus den Stammkulturen oder frisch zubereitetes Medium verwendet werden. In letzterem Fall wird eine geringe Futtermenge, z. B. Grünalgen und/oder einige Tropfen des Filtrats einer Suspension aus fein zerkleinerten Fischfutterflocken, zum Kulturmedium hinzugegeben (siehe Anlage 2). Es sollten nur frische Eigelege verwendet werden. Normalerweise beginnen die Larven einige Tage nach dem Einsetzen der Eier zu schlüpfen (*Chironomus riparius*: 2 bis 3 Tage bei 20 °C, *Chironomus tentans* und *Chironomus yoshimatsui*: 1 bis 4 Tage bei 23 °C bzw. 25 °C) und durchlaufen während ihres Wachstums vier Stadien von jeweils 4 bis 8 Tagen. Für den Versuch sollten Larven des ersten Larvenstadiums (L1) (2 bis 3 Tage oder 1 bis 4 Tage nach dem Schlüpfen) verwendet werden. Das Larvenstadium kann anhand der Kopfkapselbreite bestimmt werden (6).

26. Jeweils 20 L1-Larven werden nach dem Zufallsprinzip mit einer stumpfen Pipette in die einzelnen Prüfgefäße eingesetzt, die das gespikte Sediment und das Wasser enthalten. Während des Einsetzens der Larven in das Prüfgefäß und der folgenden 24 Std. (siehe Nummern 25 und 32) wird die Belüftung gestoppt. Je nach Versuchsaufbau (siehe Nummern 19 und 20) werden pro Konzentration mindestens 60 Larven zur Bestimmung der EC-Punktschätzung und mindestens 80 Larven zur Bestimmung der NOEC-Werte verwendet.

## Prüfkonzentrationen

27. Zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs für den endgültigen Test kann ein Vorversuch hilfreich sein. Hierzu wird eine Reihe von weit auseinander liegenden Konzentrationen der Prüfsubstanz verwendet. Um dieselbe Besiedlungsdichte der Oberfläche durch die Chironomiden wie im eigentlichen Versuch zu reproduzieren, werden die Chironomiden jeder Konzentration der Prüfsubstanz über einen Zeitraum ausgesetzt, mit dem sich die geeigneten Prüfkonzentrationen ermitteln lassen; Replikate

sind nicht erforderlich.

28. Die Prüfkonzentrationen für den endgültigen Test werden auf der Grundlage der Ergebnisse des Vorversuchs festgelegt. Es sollten mindestens fünf Konzentrationen (siehe Nummern 18 bis 20) ausgewählt und verwendet werden.

#### *Kontrollgefäße*

29. In den Versuch sind Kontrollgefäße mit unbehandeltem Sediment und einer ausreichenden Anzahl von Replikaten einzubeziehen (siehe Nummern 19 und 20). Wurde die Prüfsubstanz mit Hilfe eines Lösungsmittel appliziert (siehe Nummer 16), so ist ein Kontrollgefäß hinzuzufügen, dessen Sediment das Lösungsmittel enthält.

#### *Prüfsystem*

30. Es werden statische Prüfsysteme verwendet. Semi-statische oder Durchflusssysteme, bei denen das Überstandswasser in bestimmten Intervallen bzw. kontinuierlich ersetzt wird, können in Ausnahmefällen verwendet werden, z. B. wenn die Spezifikationen zur Wasserqualität für den Testorganismus nicht mehr geeignet sind oder sich auf das chemische Gleichgewicht auswirken (z. B. wenn die Konzentration an gelöstem Sauerstoff zu stark abnimmt, die Konzentration der Ausscheidungen zu stark zunimmt oder aus dem Sediment ausgewaschene Mineralien den pH-Wert und/oder die Wasserhärte beeinflussen). Allerdings reichen andere Methoden zur Verbesserung der Qualität des Überstandswassers wie die Belüftung aus und sollten bevorzugt angewendet werden.

#### *Futter*

31. Die Larven sollten täglich, mindestens jedoch dreimal pro Woche gefüttert werden. Für jüngere Larven scheinen in den ersten 10 Tagen 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg für *C. yoshimatui*) Fischfutter (in Wasser suspendiertes oder fein zerkleinertes Futter, z. B. Tetra-Min oder Tetra-Phyll; Einzelheiten siehe Anlage 2) pro Larve und Tag angemessen. Ältere Larven benötigen etwas mehr Nahrung: Für den Rest des Versuchs dürften 0,5 – 1 mg Futter pro Larve und Tag ausreichen. Bei Pilzbesatz oder Absterben von Kontrollorganismen wird die Futtermenge für alle behandelten Organismen und Kontrollorganismen reduziert. Lässt sich die Pilzentwicklung nicht stoppen, muss der Versuch wiederholt werden. Bei Versuchen mit stark adsorbierenden Substanzen (z. B.  $\log K_{ow} > 5$ ) oder kovalent an das Sediment gebundenen Substanzen kann dem formulierten Sediment die für das Überleben und natürliche Wachstum der Organismen erforderliche Futtermenge vor der Stabilisierungsphase hinzugefügt werden. In diesem Fall wird das Fischfutter durch pflanzliches Material ersetzt, z. B. durch Zugabe von 0,5 % (Trockengewicht) feingeriebene Blätter z. B. von Brennnessel (*Urtica dioeca*), Maulbeere (*Morus alba*), Weiß-Klee (*Trifolium repens*) oder Spinat (*Spinacia oleracea*) oder von sonstigem pflanzlichen Material (*Cerophyl* oder Alphacellulose).

#### *Inkubationsbedingungen*

32. Das Überstandswasser in den Prüfgefäßen wird vorzugsweise 24 Std. nach dem Einsetzen der Larven über den gesamten Versuchszeitraum moderat belüftet (Es ist darauf zu achten, dass die Konzentration an gelöstem Sauerstoff nicht unter 60 % des

Luftsauerstoff-Sättigungswertes fällt). Für die Belüftung (eine oder mehrere Blasen/sek.) wird eine Glaspasteurpipette 2-3 cm über der Sedimentschicht angebracht. Bei flüchtigen Prüfsubstanzen ist gegebenenfalls von einer Belüftung des Sediment-Wasser-Systems abzusehen.

33. Der Test wird bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 °C ( $\pm 2$  °C) durchgeführt. Für *C. tentans* und *C. yoshimatui* wird eine Temperatur von 23 °C bzw. 25 °C ( $\pm 2$ °C) empfohlen. Die Photoperiode beträgt 16 Std. und die Beleuchtungsstärke 500 bis 1000 lux.

#### *Expositionsdauer*

34. Die Exposition beginnt mit dem Einsetzen der Larven in die Gefäße mit dem gespikten Sediment und in die Kontrollgefäße. Die maximale Expositionsdauer beträgt 28 Tage für *C. riparius* und *C. yoshimatsui* und 65 Tage für *C. tentans*. Falls die Mücken früher schlüpfen, kann der Versuch frühestens fünf Tage nach dem Schlüpfen der letzten Kontrollimago beendet werden.

### **Beobachtungen**

#### *Emergenz*

35. Es werden die Entwicklungsdauer und die Anzahl der vollständig geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken bestimmt. Männchen sind leicht an den gefiederten Antennen zu erkennen.
36. Die Prüfgefäße sollten dreimal wöchentlich visuell auf Verhaltensänderungen (z. B. Verlassen des Sediments, ungewöhnliches Schwimmverhalten) gegenüber den Kontrollgefäßen überprüft werden. Während der Schlupfzeit müssen täglich die geschlüpften Tiere gezählt werden. Geschlecht und Anzahl der vollständig geschlüpften Mücken sind täglich festzuhalten. Danach werden die geschlüpften Mücken aus den Prüfgefäßen entfernt. Vor dem Versuchsende abgelegte Eigelege sind im Protokoll zu vermerken und anschließend zu entfernen, um zu verhindern, dass erneut Larven in das Sediment gelangen. Die Anzahl der sichtbaren Puppen, die nicht geschlüpft sind, wird ebenfalls protokolliert. Anweisungen zur Messung der Emergenz sind Anlage 5 zu entnehmen.

#### *Wachstum und Überleben*

37. Müssen Daten zum Überleben und Wachstum der Larven nach 10 Tagen ermittelt werden, so sollten bereits ab Versuchsbeginn zusätzliche Prüfgefäße hinzugefügt werden, die dann später verwendet werden können. Das Sediment aus diesen zusätzlichen Gefäßen wird durch ein 250- $\mu$ m-Sieb gesiebt, um die Larven auszusieben. Kriterien zur Bestimmung des Todes sind Bewegungslosigkeit oder mangelnde Reaktion auf mechanische Reize. Nicht wiedergefundene Larven sollten auch zu den Todesfällen gerechnet werden (Larven, die zu Versuchsbeginn gestorben sind, wurden möglicherweise durch Mikroben zersetzt). Nachdem das (aschefreie) Trockengewicht der überlebenden Larven pro Prüfgefäß bestimmt wurde, wird das mittlere Trockengewicht der einzelnen Larven pro Prüfgefäß berechnet. Es ist nützlich festzustellen, zu welchem Larvenstadium die überlebenden Larven gehören, was anhand

der Kopfkapselbreite der einzelnen Larven bestimmt werden kann.

## **Analysemessungen**

### *Konzentration der Prüfsubstanz*

38. Vor Versuchsbeginn (d. h. vor dem Einsetzen der Larven) werden aus mindestens einem Gefäß pro Behandlung Sedimentproben für die analytische Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz im Sediment entnommen. Es wird empfohlen, zu Beginn (siehe Nummer 24) und am Ende des Versuchs Proben des Überstandswassers, des Porenwassers und des Sediments zumindest in der Höchstkonzentration und einer niedrigeren Konzentration zu analysieren. Diese Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz gibt Aufschluss über das Verhalten/die Verteilung der Prüfsubstanz im Wasser-Sediment-System.
39. Falls Zwischenmessungen (z. B. am 7. Tag) vorgenommen werden und für die Analyse größere Proben erforderlich sind, die nicht aus den Prüfgefäßen entnommen werden können, ohne das Testsystem zu beeinflussen, sollten Analysemessungen an Proben aus zusätzlichen Prüfgefäßen vorgenommen werden, die derselben Behandlung (einschließlich Präsenz von Testorganismen) unterzogen, aber nicht für biologische Beobachtungen verwendet wurden.
40. Eine 30minütige Zentrifugation bei z. B. 10 000 g und 4 °C wird empfohlen, um das Interstitialwasser abzutrennen. Bei Prüfsubstanzen, die nachweislich nicht an Filtern anlagern, kann auch filtriert werden. Bei zu kleinen Proben kann es passieren, dass sich die Konzentrationen im Porenwasser nicht analysieren lassen.

### *Physikalisch-chemische Parameter*

41. pH-Wert und Temperatur der Prüfgefäße sind auf geeignete Weise zu messen (siehe Nummer 10). Zu Beginn und am Ende des Versuchs sind Härte und Ammonium-Gehalt in den Kontrollgefäßen und in einem Prüfgefäß zu bestimmen.

## **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

### *Auswertung der Ergebnisse*

42. Ziel dieses Versuchs ist, die Wirkung der Prüfsubstanz auf die Entwicklungsrate und die Gesamtanzahl der vollständig geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken bzw. im Falle des 10-Tage-Versuchs die Wirkungen auf Überleben und Gewicht der Larven zu bestimmen. Gibt es keinerlei Hinweise auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Geschlechter, werden die Ergebnisse für Männchen und Weibchen für die statistischen Analysen gepoolt. Unterschiedliche Empfindlichkeiten der Geschlechter können statistisch z. B. anhand eines Tafeltests mit  $\chi^2$ -r  $\times$  2 bewertet werden. Erforderlichenfalls sind nach 10 Tagen Daten zur Überlebensrate der Larven und zum mittleren Trockengewicht der einzelnen Larven pro Prüfgefäß zu ermitteln.
43. Die nach Trockengewicht ausgedrückten Effektkonzentrationen sind möglichst auf der Grundlage der zu Testbeginn gemessenen Sedimentkonzentrationen (siehe Nummer 38)



zu berechnen.

44. Für eine Punktschätzung von  $EC_{50}$  oder einem anderen  $EC_x$  können die pro Gefäß erstellten Statistiken als echte Replikate dienen. Bei der Berechnung eines Konfidenzintervalls für einen beliebigen  $EC_x$ -Wert ist die Variabilität zwischen den Gefäßen zu berücksichtigen oder nachzuweisen, dass diese Variabilität so klein ist, dass sie übergangen werden kann. Wird das Modell nach der Methode der geringsten Abweichungsquadrate angepasst, so sollten die pro Gefäß erstellten Statistiken transformiert werden, um die Varianzhomogenität zu verbessern. Allerdings werden die  $EC_x$ -Werte berechnet, nachdem die Ergebnisse auf den ursprünglichen Wert rücktransformiert wurden.
45. Wenn die statistische Analyse darauf abzielt, NOEC/LOEC-Werte anhand von Hypothesentests zu bestimmen, so ist die Variabilität zwischen den Prüfgefäßen zu berücksichtigen, z. B. mit Hilfe einer geschachtelten (nested) Varianzanalyse (ANOVA). Alternativ können in den Fällen, in denen von den herkömmlichen ANOVA-Annahmen abgewichen wird, robustere Tests (21) angewendet werden.

### *Schlupfrate*

46. Schlupfraten sind quantale Daten und können anhand des Cochran-Armitage-Tests im Step-Down-Verfahren analysiert werden, wenn eine monotone Dosis-Antwort erwartet wird und die Schlupfdaten dieser Erwartung entsprechen. Andernfalls können ein Exakter Test nach Fisher oder ein Mantel-Haenszel-Test mit Bonferroni-Holm-angepassten p-Werten verwendet werden. Ist die Variabilität zwischen den Replikaten mit derselben Konzentration nachweislich größer als eine Binomialverteilung ergeben würde (häufig als „extra-binomiale“ Variation bezeichnet), so sollte ein robusterer Test (Cochran-Armitage-Test oder Exakter Test nach Fisher), wie in (21) vorgeschlagen, angewendet werden.

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

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

Dabei sind:

- $ER$  = Schlupfrate  
 $n_e$  = Anzahl der geschlüpften Mücken je Prüfgefäß  
 $n_a$  = Anzahl der eingesetzten Larven je Prüfgefäß

47. Eine alternative Methode, die sich bei größeren Proben im Falle einer extra-binomialen Varianz eher eignet, besteht darin, die Schlupfrate als kontinuierliche Antwort zu behandeln und Methoden wie den Williams-Test anzuwenden, wenn eine monotone Dosis-Antwort erwartet wird und die Schlupfraten dies bestätigen. Der Dunnett's-Test eignet sich für den Fall, dass die Monotonie nicht anhält. Als große Probe gilt hier eine Probe, bei der die Anzahl der geschlüpften Mücken und die Anzahl der nicht geschlüpften Mücken jeweils mehr als fünf pro Replikat(gefäß) beträgt.

48. Für die Anwendung von ANOVA-Methoden sollten die ER-Werte zunächst einer arcsin-Wurzel-Transformation oder Freeman-Tukey-Transformation unterzogen werden, um annähernd normal verteilte Daten und Homogenität der Varianzen zu erreichen. Bei der Verwendung von absoluten Frequenzen können auch der Cochran-Armitage-, der Exakte Test nach Fisher (mit Bonferroni-Korrektur) oder der Mantel-Haenszel-Test angewendet werden. Bei der arcsin-Wurzel-Transformation wird die Umkehrfunktion des Sinus ( $\sin^{-1}$ ) der Wurzel von ER berechnet.
49. Für Schlupfraten werden die  $EC_x$ -Werte mittels Regressionsanalyse (oder z. B. mit der Probit- (22), Logit-, Weibull-Methode, geeigneter kommerzieller Software usw.) berechnet. Versagt die Regressionsanalyse (z. B. bei weniger als zwei Teilantworten), so werden andere nicht-parametrische Methoden wie die Berechnung des gleitenden Durchschnitts oder eine einfache Interpolation angewendet.

### Entwicklungsrate

50. Die mittlere Entwicklungszeit repräsentiert die mittlere Zeitspanne zwischen dem Einsetzen der Larven (Tag 0 des Versuchs) und dem Schlupf der in die Prüfgefäße eingesetzten Mückenkohorten. (Für die Berechnung der reellen Entwicklungszeit ist das Alter der Larven beim Einsetzen in die Prüfgefäße zu berücksichtigen). Die Entwicklungsrate ist der Reziprokwert der Entwicklungszeit (Einheit: 1/Tag) und repräsentiert den Teil der Larven, die sich pro Tag entwickeln. Für die Bewertung der Sedimenttoxizität ist die Entwicklungsrate zu bevorzugen, da sie im Vergleich zur Entwicklungszeit eine geringere Varianz aufweist und ihre Werte homogener sind und näher an der Normalverteilung liegen. Aus diesem Grund eignen sich parametrische Verfahren mit großer Teststärke eher für die Entwicklungsrate als für die Entwicklungszeit. Wird die Entwicklungsrate als kontinuierliche Antwort behandelt, so können die  $EC_x$ -Werte mittels Regressionsanalyse geschätzt werden (z. B. (23), (24)).
51. Für folgende statistische Tests gilt die Anzahl der am Kontrolltag  $x$  beobachteten Mücken als die Anzahl der Mücken, die in der Mitte des Zeitintervalls zwischen dem Tag  $x$  und dem Tag  $x-1$  geschlüpft sind ( $l$  = Länge des Kontrollintervalls, gewöhnlich 1 Tag). Die mittlere Entwicklungsrate je Prüfgefäß ( $\bar{x}$ ) berechnet sich folgendermaßen:

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

Dabei sind:

- $\bar{x}$  : mittlere Entwicklungsrate je Prüfgefäß
- $i$  : Index des Kontrollintervalls
- $m$  : maximale Anzahl der Kontrollintervalle
- $f_i$  : Anzahl der Mücken, die im Kontrollintervall  $i$  geschlüpft sind
- $n_e$  : Gesamtzahl der geschlüpften Mücken bei Versuchsende ( $= \sum f_i$ )
- $x_i$  : Entwicklungsrate der geschlüpften Mücken im Intervall  $i$

$$x_i = \frac{1}{\left( \text{Tag}_i - \frac{l_i}{2} \right)}$$

Dabei sind:

Tag<sub>i</sub> : Kontrolltag (Tage seit der Applikation)

l<sub>i</sub> : Länge des Kontrollintervalls i (Tage, in der Regel 1 Tag)

## Prüfbericht

52. Der Prüfbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

### *Prüfsubstanz:*

- physikalischer Zustand und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften (Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Verteilungskoeffizient im Boden (oder - falls verfügbar – im Sediment), Stabilität im Wasser usw.);
- chemische Kenndaten (Common name, chemische Bezeichnung, Strukturformel, CAS-Nummer usw.) einschließlich Reinheitsgrad und Analyseverfahren zur Quantifizierung der Prüfsubstanz.

### *Testspezies:*

- eingesetzte Testtiere: Art, wissenschaftlicher Name, Bezugsquelle der Testorganismen und Zuchtbedingungen;
- Informationen über die Handhabung der Eigelege und Larven;
- Alter der Tiere beim Einsetzen in die Prüfgefäße.

### *Prüfbedingungen:*

- verwendetes Sediment, d. h. natürliches oder formuliertes Sediment;
- für natürliches Sediment: Ort und Beschreibung der Probenahmestelle(n) für das Sediment, möglichst einschließlich etwaiger früherer Kontaminationen; Merkmale: pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff, C/N-Verhältnis und gegebenenfalls Granulometrie;
- Zubereitung des formulierten Sediments: Zutaten und Merkmale (Gehalt an organischem Kohlenstoff, pH-Wert, Feuchte usw. zu Versuchsbeginn);
- Zubereitung des Prüfwassers (falls rekonstituiertes Wasser verwendet wird) und Merkmale des Wassers (Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Leitfähigkeit, Härte usw. zu Testbeginn);
- Tiefe des Sediments und des Überstandswassers;
- Volumen des Überstandswassers und des Porenwassers; Gewicht des feuchten Sediments mit und ohne Porenwasser;
- Prüfgefäße (Material und Größe);

- Verfahren für das Spiken des Sediments: verwendete Prüfkonzentrationen, Anzahl der Replikate und gegebenenfalls Verwendung von Lösungsmitteln;
- Phase der Gleichgewichtseinstellung des Sediment-Wasser-Systems: Dauer und Bedingungen;
- Inkubationsbedingungen: Temperatur, Lichtzyklus und Beleuchtungsstärke, Belüftung (Häufigkeit und Intensität);
- genaue Angaben zur Fütterung, einschließlich Art des Futters, Präparation des Futters, Futtermenge und Fütterungsregime.

*Ergebnisse:*

- die nominellen Prüfkonzentrationen, die gemessenen Prüfkonzentrationen und die Ergebnisse sämtlicher Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz im Prüfgefäß;
- Qualität des Wassers in den Prüfgefäßen, d. h. pH-Wert, Temperatur, Gehalt an gelöstem Kohlenstoff, Härte und Ammonium;
- gegebenenfalls Ausgleich von Verdunstungsverlusten;
- Anzahl der geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken pro Gefäß und Tag;
- Anzahl der Larven pro Gefäß, die sich nicht zu Mücken entwickelt haben;
- mittleres Trockengewicht der einzelnen Larven pro Gefäß und gegebenenfalls pro Larvenstadium;
- prozentuale Emergenzrate pro Replikat und Prüfkonzentration (männliche und weibliche Mücken gepoolt);
- mittlere Entwicklungsrate der vollentwickelten Mücken pro Replikat und Behandlungsrate (männliche und weibliche Mücken gepoolt);
- Schätzung der toxischen Endpunkte, z. B.  $EC_x$  (und dazugehörige Konfidenzintervalle), NOEC- und/oder LOEC-Werte und die zu ihrer Bestimmung verwendeten statistischen Methoden;
- Diskussion der Ergebnisse, einschließlich der Auswirkungen etwaiger Abweichungen von dieser Prüfmethode auf die Prüfergebnisse.

## LITERATUR

- (1) BBA (1995): Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Herausgeber: M. Streloke und H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R. *et al.* (1994): Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Abschlussbericht an die Europäische Kommission. Bericht Nr.: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (3) SETAC (1993): Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Aus dem WOSTA-Workshop in den Niederlanden.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002): Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. S. 1125-1241. In: ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997): Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Dezember 1997.
- (6) US-EPA (2000): Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Zweite Ausgabe. EPA 600/R-99/064. März 2000. Überarbeitung der ersten Ausgabe vom Juni 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J. and Kirby R.S. (1996): Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyaella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technischer Bericht. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.
- (10) Sugaya Y. (1997): Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

- (11) Kawai K. (1986): Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). *Jp. J. Sanit. Zool.* 37(1): 47-57.
- (12) OECD (2000): Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (13) Environment Canada (1995): Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- (14) Prüfmethode C.8 dieses Anhangs: Toxizität für Regenwürmer.
- (15) Suedel B.C. and Rodgers J.H. (1994): Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C. and Rodrigues C. (1995): Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.
- (17) Dunnett C.W. (1964): A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statis. Assoc.*, 50: 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964): New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20: 482-491.
- (19) 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.
- (20) Williams D.A. (1972): The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
- (21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992): A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577-585.
- (22) Christensen E.R. (1984): Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992): A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485-1494.
- (24) Slob W. (2002): Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

## Anlage 1

### DEFINITIONEN

Für diese Prüfmethode gelten folgende Definitionen:

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

**Überstandswasser:** das auf das Sediment im Prüfgefäß aufgebrauchte Wasser.

**Interstitialwasser** oder Porenwasser: das Wasser in den Zwischenräumen zwischen Sediment- und Bodenpartikeln.

**Gespiktes Sediment:** Sediment, dem Prüfsubstanz hinzugefügt wurde.

**Prüfsubstanz:** jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

## Anlage 2

### **Empfehlungen für die Anzucht von *Chironomus riparius***

1. Für die Anzucht von *Chironomus*-Larven können Kristallisierschalen oder größere Behälter verwendet werden. Auf dem Boden des Behälters wird eine 5 bis 10 mm dicke Schicht feiner Quarzsand aufgetragen. Kieselguhr (z. B. Merck, Art 8117) hat sich ebenfalls als Substrat bewährt (eine dünnere Schicht von nur ein paar Millimetern ist ausreichend). Anschließend wird mit geeignetem Wasser auf mehrere Zentimeter Höhe aufgefüllt. Soweit erforderlich ist bei Verdunstungsverlusten Wasser nachzufüllen, um ein Austrocknen zu verhindern. Nötigenfalls kann das Wasser ausgetauscht werden. Leicht belüften. Die Larvenzuchtgefäße sind in geeignete Käfige zu setzen, um zu verhindern, dass die schlüpfenden Imagines entweichen. Der Käfig muss groß genug sein (Mindestgröße ca. 30 x 30 x 30 cm), damit die geschlüpften Imagines schwärmen können, da es andernfalls nicht zur Paarung kommt.
2. Die Käfige sind bei Raumtemperatur oder in einer Klimakammer bei  $20 \pm 2$  °C und einer Licht-/Dunkelphase von 16:8 Std. (Lichtintensität ca. 1000 lux) zu halten. Eine relative Luftfeuchte von weniger als 60 % soll offensichtlich die Vermehrung verhindern.

### **Verdünnungswasser**

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

### **Fütterung der Larven**

4. *Chironomus*-Larven sollten mit ca. 250 mg Fischfutterflocken (Tetra Min<sup>®</sup>, Tetra Phyll<sup>®</sup> oder einer anderen entsprechenden Fischfuttermarke) pro Gefäß und Tag gefüttert werden. Hierzu kann trockengemahlene Pulver oder eine Suspension in Wasser (1,0 g Futterflocken, mit 20 ml Verdünnungswasser zu einer homogenen Masse gemischt) verwendet werden. Diese Zubereitung kann in Portionen von 5 ml pro Gefäß und pro Tag verfüttert werden (vor Gebrauch schütteln). Ältere Larven können etwas mehr Futter erhalten.
5. Das Futter ist an die Wasserqualität anzupassen. Bei Trübung des Kulturmediums ist die Futterration zu reduzieren. Die Futterzugaben sind sorgfältig zu notieren. Zu wenig Futter kann dazu führen, dass die Larven in die Wassersäule abwandern, während zu viel Futter die mikrobielle Aktivität verstärkt und die Sauerstoffkonzentrationen verringert. In beiden Fällen kann es zu einer Verlangsamung des Wachstums der Organismen kommen.



6. Wenn neue Kulturgefäße angesetzt werden, können auch einige Grünalgenzellen (z. B. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) hinzugefügt werden.

### **Fütterung der geschlüpften Imagines**

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

### **Emergenz**

8. Nach ca. 13 bis 15 Tagen bei einer Temperatur von  $20 \pm 2$  °C beginnen die Imagines in den Larvenzuchtgefäßen zu schlüpfen. Männchen sind leicht an den gefiederten Antennen zu erkennen.

### **Eigelege**

9. Sobald sich Imagines in den Zuchtkäfigen befinden, sind alle Larvenzuchtgefäße dreimal wöchentlich auf gallertartige Eigelege zu kontrollieren. Diese sind vorsichtig zu entfernen und in eine kleine Schale mit einer Probe Anzuchtwasser umzusetzen. Mit den Eigelegen werden neue Kulturen angesetzt (z. B. 2 bis 4 Eigelege pro Gefäß) oder Toxizitätstests durchgeführt.
10. Nach 2 bis 3 Tagen sollten L1-Larven schlüpfen.

### **Ansetzen neuer Kulturen**

11. Sobald die Zucht etabliert ist, sollte es möglich sein, je nach Prüfungsanforderungen wöchentlich oder weniger häufig frische Kulturen anzusetzen und die älteren Prüfgefäße nach dem Schlüpfen der Imagines zu entfernen. Auf diese Weise ist es möglich, mit nur geringem Aufwand ständig über Imagines zu verfügen.

### **Zubereitung der Prüflösungen M4 und M7**

12. Das Medium M4 wurde von Elendt (1990) beschrieben. Das Medium M7 wird wie das Medium M4 zubereitet, mit Ausnahme der in Tabelle 1 angegebenen Substanzen, deren Konzentration bei M7 viermal niedriger ist als bei M4. Eine Veröffentlichung zum Medium M7 wird derzeit ausgearbeitet (Elendt, persönliche Mitteilung). Die Prüflösungen nicht nach den Anweisungen von Elendt und Bias (1990) zubereiten, da die für die Zubereitung der Stammlösungen angegebenen Konzentrationen von  $\text{NaSiO}_3$ ,  $5 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  nicht geeignet sind.

### **Herstellung des M7-Mediums**

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

werden. (Die Vitaminstammlösung wird in kleinen Portionen tiefgefroren aufbewahrt). Das Medium wird belüftet und stabilisiert.

## LITERATUR

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

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

Stammlösungen (I)	Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird	Zur Herstellung der kombinierten Stammlösung (II): Folgende Mengen (ml) der Stammlösungen (I) mischen und mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter auffüllen		Endkonzentrationen der Prüflösungen (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>(1)</sup>	57190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	7210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl <sup>(1)</sup>	6120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl <sup>(1)</sup>	1420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	3040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr <sup>(1)</sup>	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	1260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl <sub>2</sub>	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43.8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11.5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na <sub>2</sub> EDTA • 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)(2)</sup>	5000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O <sup>(1)(2)</sup>	1991	20,0	5,0	1,0	0,249

<sup>(1)</sup> Diese Stoffe sind in M4 und M7 unterschiedlich dosiert (siehe oben).

<sup>(2)</sup> Diese Lösungen werden einzeln hergestellt, zusammengegossen und sofort autoklaviert.

**Tabelle 2:** Makronährstoff-Stammlösungen für das M4- und das M7-Medium

	Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird	Zur Herstellung des M4- und des M7-Mediums zugesetzte Menge an Makronährstoff-Stammlösungen (ml/l)	Endkonzentrationen der Prüflösungen M4 und M7 (mg/l)
CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	293800	1,0	293,8
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	246600	0,5	123,3
KCl	58000	0,1	5,8
NaHCO <sub>3</sub>	64800	1,0	64,8
NaSiO <sub>3</sub> • 9 H <sub>2</sub> O	50000	0,2	10,0
NaNO <sub>3</sub>	2740	0,1	0,274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1430	0,1	0,143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1840	0,1	0,184

**Tabelle 3:** Vitamin-Stammlösung für das M4- und das M7-Medium. Aus den drei Vitaminlösungen wird eine einzige Vitamin-Stammlösung hergestellt.

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

## LITERATUR

Elendt B.P. (1990): Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. & W.-R. Bias (1990): Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

### Anlage 3

## ZUBEREITUNG DES FORMULIERTEN SEDIMENTS

### Zusammensetzung des Sediments

Das formulierte Sediment sollte die folgende Zusammensetzung haben:

Bestandteil	Charakterisierung	% des Trockengewichts des Sediments
Torf	Sphagnum-Torf, so nahe wie möglich bei pH 5,5 bis 6,0, ohne sichtbare Pflanzenreste, fein gemahlen (Partikelgröße $\leq 1$ mm) und luftgetrocknet	4-5
Quarzsand	Korngröße: > 50 % der Partikel sollten Größen zwischen 50 und 200 $\mu\text{m}$ aufweisen	75-76
Kaolin-Ton	Kaolinit-Gehalt $\geq 30$ %	20
Organischer Kohlenstoff	Eingestellt durch Zugabe von Torf und Sand	2 ( $\pm 0,5$ )
Calciumcarbonat	$\text{CaCO}_3$ , pulverisiert, chemisch rein	0,05 – 0,1
Wasser	Leitfähigkeit $\leq 10$ $\mu\text{S/cm}$	30 – 50

### Zubereitung

Der Torf wird luftgetrocknet und zu feinem Pulver zermahlen. Die erforderliche Menge an Torfpulver wird mit Hilfe eines Hochleistungshomogenisators in entionisiertem Wasser suspendiert und durch Zugabe von  $\text{CaCO}_3$  auf einen pH-Wert von  $5,5 \pm 0,5$  eingestellt. Diese Suspension wird bei  $20 \pm 2$  °C für mindestens zwei Tage unter sanftem Rühren konditioniert, um den pH-Wert zu stabilisieren und eine Etablierung der mikrobiellen Fauna zu ermöglichen. Der pH-Wert wird erneut bestimmt und sollte bei  $6,0 \pm 0,5$  liegen. Nun werden die übrigen Komponenten (Sand und Kaolin-Ton) sowie entionisiertes Wasser zur Torf-Wasser-Suspension hinzugegeben und zu einem homogenen Sediment vermischt, dessen Wassergehalt 30 bis 50 % des Trockengewichts des Sediments betragen sollte. Der pH-Wert der fertigen Mischung wird erneut gemessen und erforderlichenfalls mit  $\text{CaCO}_3$  auf 6,5 bis 7,5 eingestellt. Sedimentproben nehmen, um das Trockengewicht und den Gehalt an organischem Kohlenstoff zu bestimmen. Es wird empfohlen, das formulierte Sediment vor dem Einsatz in einem Chironomiden-Toxizitätstest für sieben Tage unter denselben Bedingungen, wie sie im anschließenden Test herrschen, zu konditionieren.

### Lagerung

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

## LITERATUR

Kapitel C.8 dieses Anhangs: Toxizität für Regenwürmer.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998): Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

#### Anlage 4

### CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS

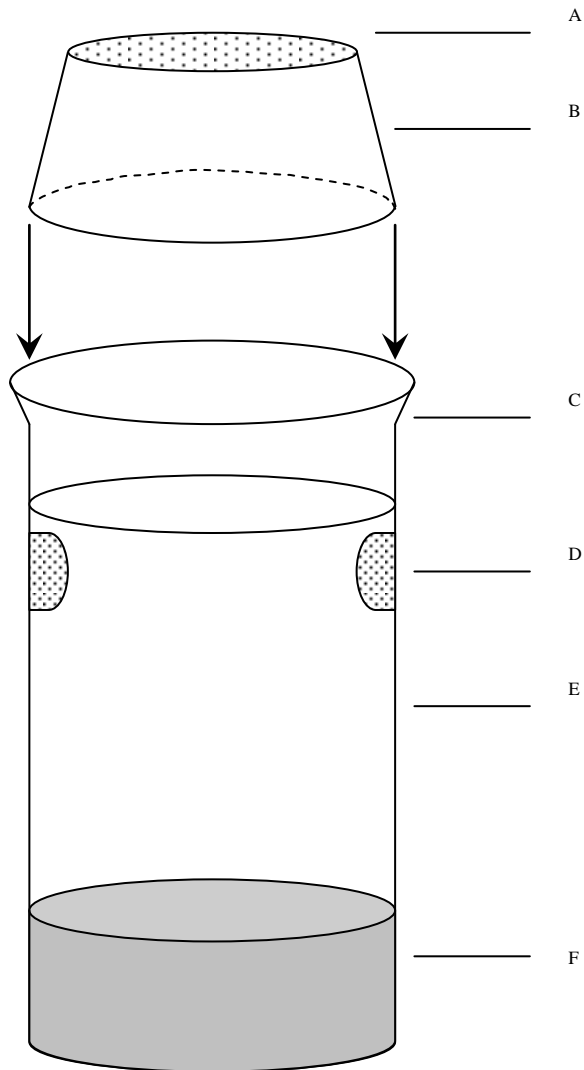
SUBSTANZ	KONZENTRATION
Partikel	< 20 mg/l
Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffen	< 2 mg/l
Nichtionisiertes Ammonium	< 1 µg/l
Härte in CaCO <sub>3</sub>	< 400 mg/l*
Restchlor	< 10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	< 25 ng/l

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

## Anlage 5

### EMPFEHLUNGEN FÜR DIE BEOBACHTUNG DES SCHLÜPFENS DER CHIRONOMIDENLARVEN

Die Bechergläser werden ab dem 20. Tag bis zum Versuchsende mit Emergenzfallen abgedeckt. Nachstehend ist ein Beispiel für eine derartige Falle abgebildet:



A: Nylongaze

B: umgedrehte Plastikschalen

C: Becherglas ohne Ausguss

D: abgedeckte Öffnungen für den Wasseraustausch

E: Wasser

F: Sediment

## C. 28. CHIRONOMIDEN-TOXIZITÄTSTEST IN SEDIMENT-WASSER-SYSTEMEN MIT GESPIKTEM WASSER

### EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 219 (2004). Sie dient der Bewertung der Wirkung einer Langzeitexposition gegenüber Chemikalien auf die sedimentbewohnenden Larven von *Chironomus* sp., einem in Frischwasser lebenden Zweiflügler. Die Methode basiert hauptsächlich auf der BBA-Richtlinie, bei der die Exposition anhand eines Sediment-Wasser-Testsystems mit Kunsterde und Wassersäule vorgenommen wird (1). Sie berücksichtigt auch die bestehenden Protokolle für Toxizitätstests mit *Chironomus riparius* und *Chironomus tentans*, die in Europa und Nordamerika (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) entwickelt und Ringtests (1)(6)(9) unterzogen wurden. Auch andere gut dokumentierte Chironomid-Arten wie *Chironomus yoshimatsui* (10)(11) sind geeignet.
2. Bei dem für diese Prüfmethode verwendeten Expositionsszenario wird das Wasser mit der Prüfsubstanz gespikt. Die Wahl des Szenarios hängt vom jeweiligen Testziel ab. Durch Dotieren (Spiken) der Wassersäule sollen Sprühverluste beim Aufbringen von Pestiziden simuliert und die Anfangsspitzen der Konzentrationen im Porenwasser erfasst werden. Die Methode eignet sich auch für andere Expositionsarten (einschließlich Austritt von Chemikalien), ausgenommen für Akkumulationsvorgänge, die länger dauern als der Test.
3. In der Regel haben die an sedimentbewohnenden Organismen zu testenden Substanzen eine lange Verweildauer in diesem Kompartiment. Sedimentbewohner können über verschiedene Wege exponiert werden. Die relative Bedeutung der einzelnen Expositionspfade und die Geschwindigkeit, mit der diese jeweils zu den gesamten toxischen Wirkungen beitragen, hängen von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der betreffenden Substanz ab. Für stark adsorbierende Substanzen (z. B.  $\log K_{ow} > 5$ ) oder für kovalent an das Sediment gebundene Substanzen kann die Aufnahme von Schadstoffen über die Nahrung einen wichtigen Expositionspfad darstellen. Die Toxizität hoch lipophiler Substanzen sollte nicht unterschätzt werden, weshalb gegebenenfalls vor Applikation der Prüfsubstanz dem Sediment Futter hinzugegeben werden sollte. Um alle potenziellen Expositionspfade zu berücksichtigen, liegt der Schwerpunkt bei dieser Prüfmethode auf der Langzeitexposition. Die Testdauer beträgt 20 bis 28 Tage für *C. riparius* und *C. yoshimatsui* und 28 bis 65 Tage für *C. tentans*. Falls aus einem besonderen Grund, z. B. zur Untersuchung der Wirkungen von instabilen Chemikalien, Kurzzeitdaten benötigt werden, können nach dem 10. Versuchstag zusätzliche Replikate entnommen werden.
4. Als Endpunkte werden die Gesamtzahl der geschlüpften Imagines und die Emergenzzeit gemessen. Falls zusätzlich Kurzzeitdaten benötigt werden, sollten die Messungen der Überlebensrate und des Wachstums der Larven erst nach dem 10. Tag gegebenenfalls anhand zusätzlicher Replikate vorgenommen werden.



5. Es wird empfohlen, formuliertes Sediment zu verwenden, da es gegenüber natürlichen Sedimenten mehrere Vorteile hat:
  - Die Variabilität zwischen den Versuchen ist nicht so groß, da formuliertes Sediment eine reproduzierbare „standardisierte Matrix“ ergibt und es nicht erforderlich ist, Quellen für unkontaminiertes, sauberes Sediment ausfindig zu machen;
  - es kann jederzeit mit den Versuchen begonnen werden, ohne durch jahreszeitliche Schwankungen gestört zu werden und ohne dass eine Vorbehandlung zur Defaunierung des Sediments erforderlich wäre; die Verwendung von formuliertem Sediment reduziert auch die Kosten, die bei Feldprobenahmen ausreichender Sedimentmengen für Routineprüfungen anfallen;
  - die Verwendung formulierter Sedimente ermöglicht Toxizitätsvergleiche und die entsprechende Einstufung der Substanzen: Versuche mit natürlichen und künstlichen Sedimenten haben vergleichbare Toxizitätsdaten für mehrere Chemikalien ergeben (2).
6. Die verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

## **PRINZIP DER PRÜFMETHODE**

7. Chironomidlarven des 1. Larvenstadiums (L1-Larven) werden gegenüber der Prüfsubstanz in verschiedenen Konzentrationen in Sediment-Wasser-Systemen exponiert. Der Versuch beginnt mit dem Einsetzen von L1-Larven in die Bechergäser mit dem Sediment-Wasser-System und dem Dotieren (Spiken) des Wassers mit der Prüfsubstanz. Zum Versuchsende werden Emergenz und Entwicklungsrate der Chironomiden bestimmt. Sofern erforderlich, können (gegebenenfalls anhand zusätzlicher Replikate) nach 10 Tagen Messungen der Überlebensrate und des Gewichts der Larven vorgenommen werden. Analysiert werden diese Daten entweder anhand eines Regressionsmodells, um die Konzentration zu ermitteln, die zu einer x-%igen Verringerung der Emergenz-, Überlebens- oder Wachstumsrate der Larven führt (z. B. EC<sub>15</sub>, EC<sub>50</sub> etc.), oder anhand statistischer Hypothesentests zur Bestimmung von NOEC/LOEC-Werten. Hierzu sind die Wirkungswerte anhand statistischer Tests mit Kontrollwerten zu vergleichen.

## **ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ**

8. Wasserlöslichkeit und Dampfdruck der Prüfsubstanz, ihre gemessene oder berechnete Verteilung im Sediment sowie ihre Stabilität im Wasser und im Sediment sollten bekannt sein. Ein zuverlässiges analytisches Verfahren für die Quantifizierung der Prüfsubstanz im Überstandswasser, Porenwasser und Sediment mit bekannter und dokumentierter Genauigkeit und Nachweisgrenze sollte vorhanden sein. Weitere nützliche Informationen sind die Strukturformel und der Reinheitsgrad der Prüfsubstanz sowie das chemische Schicksal der Prüfsubstanz (z. B. Verlustrate, abiotischer und biotischer Abbau usw.). Weitere Hinweise zu Prüfsubstanzen mit physikalisch-chemischen Merkmalen, welche die Durchführung des Tests erschweren, sind Quelle (12) zu entnehmen.

## REFERENZSUBSTANZEN

9. Referenzsubstanzen können regelmäßig getestet werden, um auf diese Weise die Zuverlässigkeit des Prüfprotokolls und der Prüfbedingungen zu gewährleisten. Beispiele von Referenzgiftstoffen, die erfolgreich in Ringtests und Validierungsstudien verwendet werden: Lindan, Trifluralin, Pentachlorphenol, Cadmiumchlorid und Kaliumchlorid (1)(2)(5)(6)(13).

## GÜLTIGKEIT DER ERGEBNISSE

10. Der Test ist gültig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- Die Emergenz in den Kontrollen muss am Ende des Tests mindestens 70 % betragen. (1)(6);
- erste Imagines von *C. riparius* und *C. yoshimatsui* sollten zwischen dem 12. und dem 23. Tag nach dem Einsetzen der Tiere in die Prüfgefäße schlüpfen; für *C. tentans* sind 20 bis 65 Tage erforderlich;
- zum Versuchsende sind der pH-Wert und die Konzentration an gelöstem Sauerstoff zu messen. Der Sauerstoffgehalt sollte mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes betragen und der pH-Wert des Überstandswassers sollte in allen Prüfgefäßen zwischen 6 und 9 liegen;
- die Wassertemperatur sollte nicht mehr als  $\pm 1,0$  °C schwanken; sie kann mit Hilfe einer Klimakammer kontrolliert werden, wobei in diesem Fall die Raumtemperatur in angemessenen Zeitabständen zu bestimmen ist.

## BESCHREIBUNG DER METHODE

### Prüfgefäße

11. Der Versuch wird in 600-ml-Glasbechergläsern mit einem Durchmesser von 8 cm durchgeführt. Andere Gefäße sind ebenfalls geeignet, sofern sie eine entsprechende Höhe von Überstandswasser und Sediment fassen. Die Sedimentoberfläche sollte 2 bis 3 cm<sup>2</sup> pro Larve bieten. Das Verhältnis zwischen Sedimentschicht und Überstandswasser sollte 1:4 betragen. Die Prüfgefäße und sonstigen Geräte, die mit dem Prüfsystem in Kontakt kommen, müssen vollständig aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Material (z. B. Teflon) bestehen.

### Wahl der Testspezies

12. Als Testspezies sollte bevorzugt *Chironomus riparius* eingesetzt werden. *Chironomus tentans* ist ebenfalls geeignet, lässt sich aber schwieriger handhaben und erfordert eine längere Prüfdauer. Auch *Chironomus yohimatsui* kann verwendet werden. Einzelheiten zu den Anzuchtverfahren für *Chironomus riparius* sind in Anlage 2 enthalten. Informationen zu den Anzuchtbedingungen sind auch für andere Arten (*Chironomus tentans* (4) und *Chironomus yoshimatsui* (11)) verfügbar. Die Identität der Spezies ist vor der Prüfung zu bestätigen, allerdings ist dies nicht vor jedem Test erforderlich, wenn die Organismen aus laboreigener Zucht stammen.

## Sediment

13. Vorzugsweise ist formuliertes Sediment (so genanntes rekonstituiertes, künstliches oder synthetisches Sediment) zu verwenden. Wenn jedoch natürliches Sediment verwendet wird, so ist es zu charakterisieren (zumindest pH-Wert und Gehalt an organischem Kohlenstoff; die Bestimmung sonstiger Parameter wie C/N-Verhältnis und Granulometrie wird ebenfalls empfohlen). Auch sollte es frei von Verunreinigungen sowie Konkurrenten und Fressfeinden der Chironomiden sein. Ferner wird empfohlen, natürliches Sediment vor seiner Verwendung in einem Chironomiden-Toxizitätstest für sieben Tage unter denselben Bedingungen, wie sie im anschließenden Test herrschen, zu konditionieren. Für diesen Test wird auf der Grundlage der in der Prüfmethode C.8 (14) verwendeten Kunsterde folgendes formuliertes Sediment empfohlen (1)(15)(16):

- a) 4-5 % (bezogen auf die Trockenmasse) Torf: so nahe wie möglich bei pH 5,5 bis 6,0; wichtig: Torf in Pulverform, feingemahlen (Partikelgröße  $\leq 1$  mm) und nur luftgetrocknet, verwenden;
- b) 20 % (bezogen auf die Trockenmasse) Kaolin-Ton (Kaolingegehalt vorzugsweise über 30 %);
- c) 75-76 % (bezogen auf die Trockenmasse) Quarzsand (hauptsächlich Feinsand, der zu mehr als 50 % eine Korngröße von 50 bis 200  $\mu\text{m}$  aufweist;
- d) der Feuchtegehalt der fertigen Mischung wird durch die Zugabe von entionisiertem Wasser auf einen Wert zwischen 30 % und 50 % eingestellt;
- e) durch die Zugabe von chemisch reinem Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) wird die fertige Mischung des Sediments auf einen pH-Wert von  $7,0 \pm 0,5$  eingestellt.
- f) der Gehalt der fertigen Mischung an organischem Kohlenstoff sollte 2 % ( $\pm 0,5$  %) betragen und ist durch Zugabe geeigneter Mengen Torf und Sand (siehe Buchstaben a und c) zu gewährleisten.

14. Die Herkunft von Torf, Kaolin-Ton und Sand sollte bekannt sein. Es sollte kontrolliert werden, dass die Bestandteile des Sediments nicht chemisch verunreinigt sind (z. B. durch Schwermetalle, chlororganische Verbindungen, phosphororganische Verbindungen usw.). Ein Beispiel für die Herstellung des formulierten Sediments ist in Anlage 3 beschrieben. Die Bestandteile können auch in trockenem Zustand gemischt werden, sofern nachgewiesen ist, dass es nach Zugabe des Überstandswassers nicht zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile kommt (z. B. schwimmende Torfpartikel) und dass der Torf oder das Sediment ausreichend konditioniert ist.

## Wasser

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

Testphase ohne Stressanzeichen überleben. Zu Testbeginn sollte der pH-Wert des Testwassers zwischen 6 und 9 liegen und die Gesamthärte des Wassers sollte nicht mehr als 400 mg/l (in CaCO<sub>3</sub>) betragen. Wird jedoch ein Ionenaustausch zwischen den Härteionen und der Prüfsubstanz vermutet, ist Wasser geringerer Härte zu verwenden (und somit in diesem Fall das Elendt-Medium M4 zu vermeiden). Das Wasser muss über die gesamte Testdauer von gleichbleibender Qualität sein. Die Qualitätsparameter des Wassers gemäß Anlage 4 sind mindestens zweimal jährlich bzw. immer dann zu messen, wenn der Verdacht besteht, dass sie sich erheblich verändert haben.

### **Stammlösungen – Gespiktes Wasser**

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

### **VERSUCHSAUFBAU**

17. Unter „Versuchsaufbau“ sind die gewählte Anzahl und der Abstand der Testkonzentrationen, die Anzahl der Prüfgefäße je Konzentration und die Anzahl der Larven je Gefäß zu verstehen. Beschrieben werden die Verfahren für die Bestimmung der EC-Werte und der NOEC-Werte und für die Durchführung eines Limit-Tests. Regressionsanalysen sind Hypothesentest vorzuziehen.

#### *Versuchsaufbau für die Regressionsanalyse*

18. Die im Test verwendeten Konzentrationen müssen in jedem Fall die Wirkungskonzentration (z. B. EC<sub>15</sub>, EC<sub>50</sub>) und den Konzentrationsbereich, in dem die Wirkung der Prüfsubstanz von Interesse ist, einschließen. Bei der Bestimmung von Wirkungskonzentrationen (EC<sub>x</sub>) wird in der Regel eine größere Genauigkeit und insbesondere Validität erzielt, wenn die Wirkungskonzentration im Bereich der getesteten Konzentrationen liegt. Extrapolierungen weit unter der niedrigsten positiven Konzentration oder über der höchsten Konzentration sind zu vermeiden. Ein Vorversuch kann die Auswahl der zu verwendenden Konzentrationsspanne erleichtern (siehe Nummer 27).

19. Für die Bestimmung von  $EC_x$  sollten mindestens fünf Konzentrationen und drei Replikate jeder Konzentration getestet werden. Im Interesse einer angemessenen Modellierung ist es in jedem Fall ratsam, eine hinreichende Anzahl an Konzentrationen zu testen. Die Konzentrationen sollten sich um einen Faktor von nicht mehr als 2 unterscheiden (außer bei einer schwachen Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve). Die Anzahl der Replikate pro Behandlung kann reduziert werden, wenn die Anzahl der Prüfkonzentrationen mit unterschiedlicher Wirkung erhöht wird. Eine höhere Anzahl an Replikaten oder eine Verkürzung der Intervalle zwischen den Prüfkonzentrationen führt tendenziell zu engeren Konfidenzintervallen für den Test. Zur Bestimmung der Überlebensrate und des Wachstums der Larven nach 10 Tagen sind zusätzliche Replikate erforderlich.

#### *Versuchsaufbau für die Bestimmung von NOEC/LOEC-Werten*

20. Zur Bestimmung von LOEC- oder NOEC-Werten sollten fünf Prüfkonzentrationen mit mindestens vier Replikaten pro Konzentration verwendet werden, wobei sich die Konzentrationen um einen Faktor von nicht mehr als 2 unterscheiden sollten. Es sollten so viele Replikate verwendet werden, dass sich im Hinblick auf eine angemessene statistische Aussagekraft bei einem Signifikanzniveau von 5 % ( $p = 0,05$ ) eine Differenz von 20 % zur Kontrollkonzentration nachweisen lässt. Für die Entwicklungsrate eignen sich in der Regel Varianzanalysen (ANOVA) wie der Dunnett-Test und der Williams-Test (17)(18)(19)(20). Für die Schlupfrate kann der Cochran-Armitage-Test, der Exakte Test nach Fisher (mit Bonferroni-Korrektur) oder der Mantel-Haenszel-Test herangezogen werden.

#### *Limit-Test*

21. Falls der Vorversuch keine Wirkungen zeigt, kann ein Limit-Test (mit einer Prüfkonzentration und einer Kontrolle) durchgeführt werden. Mit dem Limit-Test soll nachgewiesen werden, dass der toxische Wert der Prüfsubstanz über der getesteten Limitkonzentration liegt. Für diese Prüfmethode kann keine Konzentration empfohlen werden; dies bleibt den Regulierungsbehörden überlassen. In der Regel sind jeweils mindestens sechs Replikate pro Behandlung und Kontrolle erforderlich. Es ist nachzuweisen, dass die statistische Aussagekraft ausreicht, um bei einem Signifikanzniveau von 5 % ( $p = 0,05$ ) eine Differenz von 20 % zur Kontrollkonzentration festzustellen. Für metrische Merkmale (Entwicklungsrate und Gewicht) ist der t-Test eine geeignete statistische Methode, sofern die Daten die Bedingungen für diesen Test (Normalverteilung, Varianzhomogenität) erfüllen. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so kann ein t-Test für ungleiche Varianzen oder ein nicht-parametrischer Test wie der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet werden. Für die Schlupfrate eignet sich der Exakte Test nach Fisher.

## **PRÜFVERFAHREN**

### **Expositionsbedingungen**

#### *Zubereitung des Wasser-Sediment-Systems mit gespiktem Wasser*

22. In die Prüfgefäße wird formuliertes Sediment (siehe Nummern 13 und 14 sowie

Anlage 3) in ausreichender Menge gegeben, um eine mindestens 1,5 cm dicke Schicht zu erhalten, die anschließend mit 6 cm Wasser (siehe Nummer 15) überschichtet wird. Das Verhältnis von Sediment zu Wasser sollte nicht mehr als 1:4 und die Sedimenthöhe nicht mehr als 3 cm betragen. Das Sediment-Wasser-System sollte vor dem Einsetzen der Testorganismen für 7 Tage moderat belüftet werden (siehe Nummer 14 und Anlage 3). Um zu verhindern, dass es während der Zugabe von Prüfwasser in die Wassersäule zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile und einer Resuspension der feinen Partikel kommt, kann das Sediment beim Einfüllen des Wassers mit einer Plastikschaale abgedeckt werden, die anschließend sofort entfernt wird. Andere Hilfsmittel sind ebenfalls geeignet.

23. Die Prüfgefäße sollten abgedeckt werden (z. B. mit Glasplatten). Etwaige Verdunstungsverluste im Laufe des Versuchs sind auszugleichen, und zwar mit destilliertem oder entionisiertem Wasser, um Salzfreiheit zu gewährleisten.

#### *Einsetzen der Testorganismen*

24. Vier bis fünf Tage vor dem Einsetzen der Testorganismen in die Prüfgefäße werden Eigelege aus der Zucht entnommen und in kleinen Gefäßen in das Kulturmedium eingesetzt. Es kann „altes“ Medium aus den Stammkulturen oder frisch zubereitetes Medium verwendet werden. In letzterem Fall wird eine geringe Futtermenge, z. B. Grünalgen und/oder einige Tropfen des Filtrats einer Suspension aus fein zerkleinerten Fischfutterflocken, zum Kulturmedium hinzugegeben (siehe Anlage 2). Es sollten nur frische Eigelege verwendet werden. Normalerweise beginnen die Larven einige Tage nach dem Einsetzen der Eier zu schlüpfen (*Chironomus riparius*: 2 bis 3 Tage bei 20 °C, *Chironomus tentans* und *Chironomus yoshimatsui*: 1 bis 4 Tage bei 23 °C bzw. 25 °C) und durchlaufen während ihres Wachstums vier Stadien von jeweils 4 bis 8 Tagen. Für den Versuch sollten Larven des ersten Larvenstadiums (L1) (2 bis 3 Tage oder 1 bis 4 Tage nach dem Schlüpfen) verwendet werden. Das Larvenstadium kann anhand der Kopfkapselbreite bestimmt werden (6).
25. Jeweils 20 L1-Larven werden nach dem Zufallsprinzip mit einer stumpfen Pipette in die einzelnen Prüfgefäße eingesetzt, die das gespikte Sediment und Wasser enthalten. Während des Einsetzens der Larven in das Prüfgefäß und der folgenden 24 Std. (siehe Nummern 24 und 32) wird die Belüftung gestoppt. Je nach Versuchsaufbau (siehe Nummern 19 und 20) werden pro Konzentration mindestens 60 Larven zur Bestimmung der EC-Punktschätzung und mindestens 80 Larven zur Bestimmung der NOEC-Werte verwendet.
26. 24 Std. nach dem Einsetzen der Larven wird die Prüfsubstanz in die Wassersäule gespikt, und es wird erneut leicht belüftet. Kleine Mengen der Prüfsubstanz werden mit Hilfe einer Pipette unterhalb der Oberfläche der Wassersäule injiziert. Anschließend sollte das Überstandswasser vorsichtig gemischt werden, um das Sediment nicht aufzuwirbeln.

#### *Prüfkonzentrationen*

27. Zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs für den endgültigen Test kann ein Vorversuch hilfreich sein. Hierzu wird eine Reihe von weit auseinander liegenden Konzentrationen der Prüfsubstanz verwendet. Um dieselbe Besiedlungsdichte der

Oberfläche durch die Chironomiden wie im eigentlichen Versuch zu reproduzieren, werden die Chironomiden jeder Konzentration der Prüfsubstanz über einen Zeitraum ausgesetzt, mit dem sich die geeigneten Prüfkonzentrationen ermitteln lassen; Replikate sind nicht erforderlich.

28. Die Prüfkonzentrationen für den endgültigen Test werden auf der Grundlage der Ergebnisse des Vorversuchs festgelegt. Es sollten mindestens fünf Konzentrationen (siehe Nummern 18 bis 20) ausgewählt und verwendet werden.

#### *Kontrollgefäße*

29. In den Versuch sind Kontrollgefäße mit unbehandeltem Sediment und einer ausreichenden Anzahl von Replikaten einzubeziehen (siehe Nummern 19 und 20). Wurde die Prüfsubstanz mit Hilfe eines Lösungsmittel appliziert (siehe Nummer 16), so ist ein Kontrollgefäß hinzuzufügen, dessen Sediment das Lösungsmittel enthält.

#### *Prüfsystem*

30. Es werden statische Prüfsysteme verwendet. Semi-statische oder Durchflusssysteme, bei denen das Überstandswasser in bestimmten Intervallen bzw. kontinuierlich ersetzt wird, können in Ausnahmefällen verwendet werden, z. B. wenn die Spezifikationen zur Wasserqualität für den Testorganismus nicht mehr geeignet sind oder sich auf das chemische Gleichgewicht auswirken (z. B. wenn die Konzentration an gelöstem Sauerstoff zu stark abnimmt, die Konzentration der Ausscheidungen zu stark zunimmt oder aus dem Sediment ausgewaschene Mineralien den pH-Wert und/oder die Wasserhärte beeinflussen). Allerdings reichen andere Methoden zur Verbesserung der Qualität des Überstandswassers wie die Belüftung aus und sollten bevorzugt angewendet werden.

#### *Futter*

31. Die Larven sollten täglich, mindestens jedoch dreimal pro Woche gefüttert werden. Für jüngere Larven scheinen in den ersten 10 Tagen 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg für *C. yoshimatui*) Fischfutter (in Wasser suspendiertes oder fein zerkleinertes Futter, z. B. Tetra-Min oder Tetra-Phyll; Einzelheiten siehe Anlage 2) pro Larve und Tag angemessen. Ältere Larven benötigen etwas mehr Nahrung: Für den Rest des Versuchs dürften 0,5 – 1 mg Futter pro Larve und Tag ausreichen. Bei Pilzbesatz oder Absterben von Kontrollorganismen wird die Futtermenge für alle behandelten Organismen und Kontrollorganismen reduziert. Lässt sich die Pilzentwicklung nicht stoppen, muss der Versuch wiederholt werden. Bei Versuchen mit stark adsorbierenden Substanzen (z. B.  $\log K_{ow} > 5$ ) oder kovalent an das Sediment gebundenen Substanzen kann dem formulierten Sediment die für das Überleben und natürliche Wachstum der Organismen erforderliche Futtermenge vor der Stabilisierungsphase hinzugefügt werden. In diesem Fall wird das Fischfutter durch pflanzliches Material ersetzt, z. B. durch Zugabe von 0,5 % (Trockengewicht) feingeriebene Blätter z. B. von Brennnessel (*Urtica dioeca*), Maulbeere (*Morus alba*), Weiß-Klee (*Trifolium repens*) oder Spinat (*Spinacia oleracea*) oder von sonstigem pflanzlichen Material (*Cerophyl* oder Alphacellulose).

#### *Inkubationsbedingungen*

32. Das Überstandswasser in den Prüfgefäßen wird vorzugsweise 24 Std. nach dem Einsetzen der Larven über den gesamten Versuchszeitraum moderat belüftet (Es ist darauf zu achten, dass die Konzentration an gelöstem Sauerstoff nicht unter 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes fällt). Für die Belüftung (eine oder mehrere Blasen/sek.) wird eine Glaspasteurpipette 2 bis 3 cm über der Sedimentschicht angebracht. Bei flüchtigen Prüfsubstanzen ist gegebenenfalls von einer Belüftung des Sediment-Wasser-Systems abzusehen.
33. Der Test wird bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 °C ( $\pm 2$  °C) durchgeführt. Für *C. tentans* und *C. yoshimatsui* wird eine Temperatur von 23 °C bzw. 25 °C ( $\pm 2$ °C) empfohlen. Die Photoperiode beträgt 16 Std. und die Beleuchtungsstärke 500 bis 1000 lux.

#### *Expositionsdauer*

34. Die Exposition beginnt mit dem Einsetzen der Larven in die Gefäße mit dem gespikten Wasser und in die Kontrollgefäße. Die maximale Expositionsdauer beträgt 28 Tage für *C. riparius* und *C. yoshimatsui* und 65 Tage für *C. tentans*. Falls die Mücken früher schlüpfen, kann der Versuch frühestens fünf Tage nach dem Schlüpfen der letzten Kontrollimago beendet werden.

## **BEOBACHTUNGEN**

#### *Emergenz*

35. Es werden die Entwicklungsdauer und die Anzahl der vollständig geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken bestimmt. Männchen sind leicht an den gefiederten Antennen zu erkennen.
36. Die Prüfgefäße sollten dreimal wöchentlich visuell auf Verhaltensänderungen (z. B. Verlassen des Sediments, ungewöhnliches Schwimmverhalten) gegenüber den Kontrollgefäßen überprüft werden. Während der Schlupfzeit müssen täglich die geschlüpften Tiere gezählt werden. Geschlecht und Anzahl der vollständig geschlüpften Mücken sind täglich festzuhalten. Danach werden die geschlüpften Mücken aus den Prüfgefäßen entfernt. Vor dem Versuchsende abgelegte Eigelege sind im Protokoll zu vermerken und anschließend zu entfernen, um zu verhindern, dass erneut Larven in das Sediment gelangen. Die Anzahl der sichtbaren Puppen, die nicht geschlüpft sind, wird ebenfalls protokolliert. Anweisungen zur Messung der Emergenz sind Anlage 5 zu entnehmen.

#### *Wachstum und Überleben*

37. Müssen Daten zum Überleben und Wachstum der Larven nach 10 Tagen ermittelt werden, so sollten bereits ab Versuchsbeginn zusätzliche Prüfgefäße hinzugefügt werden, die dann später verwendet werden können. Das Sediment aus diesen zusätzlichen Gefäßen wird durch ein 250- $\mu$ m-Sieb gesiebt, um die Larven auszusieben. Kriterien zur Bestimmung des Todes sind Bewegungslosigkeit oder mangelnde Reaktion auf mechanische Reize. Nicht wiedergefundene Larven sollten auch zu den Todesfällen gerechnet werden (Larven, die zu Versuchsbeginn gestorben sind, wurden



möglicherweise durch Mikroben zersetzt). Nachdem das (aschefreie) Trockengewicht der überlebenden Larven pro Prüfgefäß bestimmt wurde, wird das mittlere Trockengewicht der einzelnen Larven pro Prüfgefäß berechnet. Es ist nützlich festzustellen, zu welchem Larvenstadium die überlebenden Larven gehören, was anhand der Kopfkapselbreite der einzelnen Larven bestimmt werden kann.

## **Analysemessungen**

### *Konzentration der Prüfsubstanz*

38. Es wird unbedingt empfohlen, zu Beginn (vorzugsweise eine Stunde nach Applikation der Prüfsubstanz) und am Ende des Versuchs Proben des Überstandswassers, des Porenwassers und des Sediments zumindest in der Höchstkonzentration und einer niedrigeren Konzentration zu analysieren. Diese Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz gibt Aufschluss über das Verhalten/die Verteilung der Prüfsubstanz im Wasser-Sediment-System. Die Entnahme von Sedimentproben zu Versuchsbeginn kann das Prüfsystem beeinflussen (Entfernen von Testlarven), so dass zusätzliche Prüfgefäße vorzusehen sind, um die Analysemessungen zu Beginn und gegebenenfalls während des Versuchs (siehe Nummer 39) vorzunehmen. Es ist nicht unbedingt notwendig, das Sediment zu analysieren, wenn die Verteilung der Prüfsubstanz zwischen Wasser und Sediment eindeutig in einer unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführten Wasser/Sediment-Studie bestimmt wurde (z. B. Sediment-Wasser-Verhältnis, Applikationsart, Gehalt an organischem Kohlenstoff im Sediment).
39. Falls Zwischenmessungen (z. B. am 7. Tag) vorgenommen werden und für die Analyse größere Proben erforderlich sind, die nicht aus den Prüfgefäßen entnommen werden können, ohne das Testsystem zu beeinflussen, sollten die Analysemessungen an Proben aus zusätzlichen Prüfgefäßen vorgenommen werden, die derselben Behandlung (einschließlich Präsenz von Testorganismen) unterzogen, aber nicht für biologische Beobachtungen verwendet wurden.
40. Eine 30minütige Zentrifugation bei z. B. 10 000 g und 4 °C wird empfohlen, um das Interstitialwasser abzutrennen. Bei Prüfsubstanzen, die nachweislich nicht an Filtern anlagern, kann auch filtriert werden. Bei zu kleinen Proben kann es passieren, dass sich die Konzentrationen im Porenwasser nicht analysieren lassen.

### *Physikalisch-chemische Parameter*

41. pH-Wert, Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Prüfwasser und Temperatur der Prüfgefäße sind auf geeignete Weise zu messen (siehe Nummer 10). Zu Beginn und am Ende des Versuchs sind Härte und Ammonium-Gehalt in den Kontrollgefäßen und in einem Prüfgefäß in der Höchstkonzentration zu bestimmen.

## **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

### *Auswertung der Ergebnisse*

42. Ziel dieses Versuchs ist, die Wirkung der Prüfsubstanz auf die Entwicklungsrate und die Gesamtanzahl der vollständig geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken bzw.

im Falle des 10-Tage-Versuchs die Wirkungen auf Überleben und Gewicht der Larven zu bestimmen. Gibt es keinerlei Hinweise auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Geschlechter, werden die Ergebnisse für Männchen und Weibchen für die statistischen Analysen gepoolt. Unterschiedliche Empfindlichkeiten der Geschlechter können statistisch z. B. anhand eines Tafeltests mit  $\chi^2$ -r  $\times$  2 bewertet werden. Erforderlichenfalls sind nach 10 Tagen Daten zur Überlebensrate der Larven und zum mittleren Trockengewicht der einzelnen Larven pro Prüfgefäß zu ermitteln.

43. Die als Konzentration im Überstandswasser ausgedrückten Effektkonzentrationen sind möglichst auf der Grundlage der zu Testbeginn gemessenen Konzentrationen (siehe Nummer 38) zu berechnen.
44. Für eine Punktschätzung von  $EC_{50}$  oder einem anderen  $EC_x$  können die pro Gefäß erstellten Statistiken als echte Replikate dienen. Bei der Berechnung eines Konfidenzintervalls für einen beliebigen  $EC_x$ -Wert ist die Variabilität zwischen den Gefäßen zu berücksichtigen oder nachzuweisen, dass diese Variabilität so klein ist, dass sie übergangen werden kann. Wird das Modell nach der Methode der geringsten Abweichungsquadrate angepasst, so sollten die pro Gefäß erstellten Statistiken transformiert werden, um die Varianzhomogenität zu verbessern. Allerdings werden die  $EC_x$ -Werte berechnet, nachdem die Ergebnisse auf den ursprünglichen Wert rücktransformiert wurden.
45. Wenn die statistische Analyse darauf abzielt, NOEC/LOEC-Werte anhand von Hypothesentests zu bestimmen, so ist die Variabilität zwischen den Prüfgefäßen zu berücksichtigen, z. B. mit Hilfe einer geschachtelten (nested) Varianzanalyse (ANOVA). Alternativ können in den Fällen, in denen von den herkömmlichen ANOVA-Annahmen abgewichen wird, robustere Tests (21) angewendet werden.

### *Schlupfrate*

46. Schlupfraten sind quantale Daten und können anhand des Cochran-Armitage-Tests im Step-Down-Verfahren analysiert werden, wenn eine monotone Dosis-Antwort erwartet wird und die Schlupfdaten dieser Erwartung entsprechen. Andernfalls können ein Exakter Test nach Fisher oder ein Mantel-Haenszel-Test mit Bonferroni-Holm-angepassten p-Werten verwendet werden. Ist die Variabilität zwischen den Replikaten mit derselben Konzentration nachweislich größer als eine Binomialverteilung ergeben würde (häufig als „extra-binomiale“ Variation bezeichnet), so sollte ein robusterer Test (Cochran-Armitage-Test oder Exakter Test nach Fisher), wie in (21) vorgeschlagen, angewendet werden.
47. Die Summe geschlüpfter Mücken ( $n_e$ ) je Prüfgefäß wird bestimmt und durch die Anzahl der eingesetzten Larven ( $n_a$ ) dividiert:

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

Dabei sind:

- ER = Schlupfrate
- $n_e$  = Anzahl der geschlüpften Mücken je Prüfgefäß
- $n_a$  = Anzahl der eingesetzten Larven je Prüfgefäß

48. Eine alternative Methode, die sich bei größeren Proben im Falle einer extra-binomialen Varianz eher eignet, besteht darin, die Schlupfrate als kontinuierliche Antwort zu behandeln und Methoden wie den Williams-Test anzuwenden, wenn eine monotone Dosis-Antwort erwartet wird und die Schlupfraten dies bestätigen. Der Dunnett's-Test eignet sich für den Fall, dass die Monotonie nicht anhält. Als große Probe gilt hier eine Probe, bei der die Anzahl der geschlüpften Mücken und die Anzahl der nicht geschlüpften Mücken jeweils mehr als fünf pro Replikat(gefäß) beträgt.
49. Für die Anwendung von ANOVA-Methoden sollten die ER-Werte zunächst einer arcsin-Wurzel-Transformation oder Freeman-Tukey-Transformation unterzogen werden, um annähernd normal verteilte Daten und Homogenität der Varianzen zu erreichen. Bei der Verwendung von absoluten Frequenzen können auch der Cochran-Armitage-, der Exakte Test nach Fisher (mit Bonferroni-Korrektur) oder der Mantel-Haenszel-Test angewendet werden. Bei der arcsin-Wurzel-Transformation wird die Umkehrfunktion des Sinus ( $\sin^{-1}$ ) der Wurzel von ER berechnet.
50. Für Schlupfraten werden die  $EC_x$ -Werte mittels Regressionsanalyse (oder z. B. mit der Probit- (22), Logit-, Weibull-Methode, geeigneter kommerzieller Software usw.) berechnet. Versagt die Regressionsanalyse (z. B. bei weniger als zwei Teilantworten), so werden andere nicht-parametrische Methoden wie die Berechnung des gleitenden Durchschnitts oder eine einfache Interpolation angewendet.

#### *Entwicklungsrate*

51. Die mittlere Entwicklungszeit repräsentiert die mittlere Zeitspanne zwischen dem Einsetzen der Larven (Tag 0 des Versuchs) und dem Schlupf der in die Prüfgefäße eingesetzten Mückenkohorten. (Für die Berechnung der reellen Entwicklungszeit ist das Alter der Larven beim Einsetzen in die Prüfgefäße zu berücksichtigen). Die Entwicklungsrate ist der Reziprokwert der Entwicklungszeit (Einheit: 1/Tag) und repräsentiert den Teil der Larven, die sich pro Tag entwickeln. Für die Bewertung der Sedimenttoxizität ist die Entwicklungsrate zu bevorzugen, da sie im Vergleich zur Entwicklungszeit eine geringere Varianz aufweist und ihre Werte homogener sind und näher an der Normalverteilung liegen. Aus diesem Grund eignen sich parametrische Verfahren mit großer Teststärke eher für die Entwicklungsrate als für die Entwicklungszeit. Wird die Entwicklungsrate als kontinuierliche Antwort behandelt, so können die  $EC_x$ -Werte mittels Regressionsanalyse geschätzt werden (z. B. (23), (24)).
52. Für folgende statistische Tests gilt die Anzahl der am Kontrolltag  $x$  beobachteten Mücken als die Anzahl der Mücken, die in der Mitte des Zeitintervalls zwischen dem Tag  $x$  und dem Tag  $x-1$  geschlüpft sind ( $l$  = Länge des Kontrollintervalls, gewöhnlich 1 Tag). Die mittlere Entwicklungsrate je Prüfgefäß ( $\bar{x}$ ) berechnet sich folgendermaßen:

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

Dabei sind:

$\bar{x}$  : mittlere Entwicklungsrate je Prüfgefäß

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

$$x_i = \frac{1}{\left( \text{Tag}_i - \frac{l_i}{2} \right)}$$

Dabei sind:

- $\text{Tag}_i$  : Kontrolltag (Tage seit der Applikation)
- $l_i$  : Länge des Kontrollintervalls  $i$  (Tage, in der Regel 1 Tag)

## Prüfbericht

53. Der Prüfbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

### *Prüfsubstanz:*

- physikalischer Zustand und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften (Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Verteilungskoeffizient im Boden (oder - falls verfügbar – im Sediment), Stabilität im Wasser usw.);
- chemische Kenndaten (Common name, chemische Bezeichnung, Strukturformel, CAS-Nummer usw.) einschließlich Reinheitsgrad und Analyseverfahren zur Quantifizierung der Prüfsubstanz.

### *Testspezies:*

- eingesetzte Testtiere: Art, wissenschaftlicher Name, Bezugsquelle der Testorganismen und Zuchtbedingungen;
- Informationen über die Handhabung der Eigelege und Larven;
- Alter der Tiere beim Einsetzen in die Prüfgefäße.

### *Prüfbedingungen:*

- verwendetes Sediment, d. h. natürliches oder formuliertes Sediment;
- für natürliches Sediment: Ort und Beschreibung der Probenahmestelle(n) für das Sediment, möglichst einschließlich etwaiger früherer Kontaminationen; Merkmale: pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff, C/N-Verhältnis und gegebenenfalls Granulometrie;
- Zubereitung des formulierten Sediments: Zutaten und Merkmale (Gehalt an organischem Kohlenstoff, pH-Wert, Feuchte usw. zu Versuchsbeginn);
- Zubereitung des Prüfwassers (falls rekonstituiertes Wasser verwendet wird) und

Merkmale des Wassers (Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Leitfähigkeit, Härte usw. zum Testbeginn);

- Höhe des Sediments und des Überstandswassers;
- Volumen des Überstandswassers und des Porenwassers; Gewicht des feuchten Sediments mit und ohne Porenwassers;
- Prüfgefäße (Material und Größe);
- Methode für die Zubereitung der Stammlösungen und Prüfkonzentrationen;
- Applikation der Prüfsubstanz: verwendete Prüfkonzentrationen, Anzahl der Replikate und gegebenenfalls Verwendung von Lösungsmitteln;
- Inkubationsbedingungen: Temperatur, Lichtzyklus und Beleuchtungsstärke, Belüftung (Häufigkeit und Intensität);
- genaue Angaben zur Fütterung, einschließlich Art des Futters, Präparation des Futters, Futtermenge und Fütterungsregime.

*Ergebnisse:*

- die nominellen Prüfkonzentrationen, die gemessenen Prüfkonzentrationen und die Ergebnisse sämtlicher Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz im Prüfgefäß;
- Qualität des Wassers in den Prüfgefäßen, d. h. pH-Wert, Temperatur, Gehalt an gelöstem Kohlenstoff, Härte und Ammonium;
- gegebenenfalls Ausgleich von Verdunstungsverlusten;
- Anzahl der geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken pro Gefäß und pro Tag;
- Anzahl der Larven pro Gefäß, die sich nicht zu Mücken entwickelt haben;
- mittleres Trockengewicht der einzelnen Larven pro Gefäß und gegebenenfalls pro Larvenstadium;
- prozentuale Emergenzrate pro Replikat und Testkonzentration (männliche und weibliche Mücken gepoolt);
- mittlere Entwicklungsrate von voll entwickelten Mücken pro Replikat und Behandlungsrate (männliche und weibliche Mücken gepoolt);
- Schätzung der toxischen Endpunkte, z. B.  $EC_x$  (und dazugehörige Konfidenzintervalle), NOEC- und/oder LOEC-Werte und die zu ihrer Bestimmung verwendeten statistischen Methoden;
- Diskussion der Ergebnisse, einschließlich der Auswirkungen etwaiger Abweichungen von dieser Prüfmethode auf die Prüfergebnisse.

## LITERATUR

- (1) BBA (1995): Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Herausgeber: M. Streloke und H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R. *et al.* (1994): Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Abschlussbericht an die Europäische Kommission. Bericht Nr.: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (3) SETAC (1993): Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Aus dem WOSTA-Workshop in den Niederlanden.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002): Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. S. 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997): Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Dezember 1997.
- (6) US-EPA (2000): Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Zweite Ausgabe. EPA 600/R-99/064. März 2000. Überarbeitung der ersten Ausgabe vom Juni 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996): Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.
- (10) Sugaya Y. (1997): Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

- (11) Kawai K. (1986): Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). *Jp. J. Sanit. Zool.* 37(1): 47-57.
- (12) OECD (2000): Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (13) Environment Canada (1995): Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- (14) Kapitel C.8 dieses Anhangs: Toxizität für Regenwürmer,
- (15) Suedel B.C. and Rodgers J.H. (1994): Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C. and Rodrigues C. (1995): Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31: 3291-3303.
- (17) Dunnett C.W. (1964): A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statis. Assoc.* 50: 1096-1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964): New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (19) 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.
- (20) Williams D.A. (1972): The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.
- (21) Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992): A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48:577-585.
- (22) Christensen E.R. (1984): Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992): A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.
- (24) Slob W: (2002): Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

## Anlage 1

### **DEFINITIONEN**

Für diese Prüfmethode gelten folgende Definitionen:

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

**Überstandswasser:** das auf das Sediment im Prüfgefäß aufgebrauchte Wasser.

**Interstitialwasser** oder Porenwasser: das Wasser in den Zwischenräumen zwischen Sediment- und Bodenpartikeln.

**Gespiktes Wasser:** Wasser, dem Prüfsubstanz hinzugefügt wurde.

**Prüfsubstanz:** jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.



## Anlage 2

### **Empfehlungen für die Anzucht von *Chironomus riparius***

1. Für die Anzucht von *Chironomus*-Larven können Kristallisierschalen oder größere Behälter verwendet werden. Auf dem Boden des Behälters wird eine 5 bis 10 mm dicke Schicht feiner Quarzsand aufgetragen. Kieselguhr (z. B. Merck, Art 8117) hat sich ebenfalls als Substrat bewährt (eine dünnere Schicht von nur ein paar Millimetern ist ausreichend). Anschließend wird mit geeignetem Wasser auf mehrere Zentimeter Höhe aufgefüllt. Soweit erforderlich ist bei Verdunstungsverlusten Wasser nachzufüllen, um ein Austrocknen zu verhindern. Nötigenfalls kann das Wasser ausgetauscht werden. Leicht belüften. Die Larvenzuchtgefäße sind in geeignete Käfige zu setzen, um zu verhindern, dass die schlüpfenden Imagines entweichen. Der Käfig muss groß genug sein (Mindestgröße ca. 30 x 30 x 30 cm), damit die geschlüpften Imagines schwärmen können, da es andernfalls nicht zur Paarung kommt.
2. Die Käfige sind bei Raumtemperatur oder in einer Klimakammer bei  $20 \pm 2$  °C und einer Licht-/Dunkelphase von 16:8 Std. (Lichtintensität ca. 1000 lux) zu halten. Eine relative Luftfeuchte von weniger als 60 % soll offensichtlich die Vermehrung verhindern.

### **Verdünnungswasser**

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

### **Fütterung der Larven**

4. *Chironomus*-Larven sollten mit ca. 250 mg Fischfutterflocken (Tetra Min<sup>®</sup>, Tetra Phyll<sup>®</sup> oder einer anderen entsprechenden Fischfuttermarke) pro Gefäß und Tag gefüttert werden. Hierzu kann trockengemahlene Pulver oder eine Suspension in Wasser (1,0 g Futterflocken mit 20 ml Verdünnungswasser zu einer homogenen Masse gemischt) verwendet werden. Diese Zubereitung kann in Portionen von 5 ml pro Gefäß und pro Tag verfüttert werden (vor Gebrauch schütteln). Ältere Larven können etwas mehr Futter erhalten.
5. Das Futter ist an die Wasserqualität anzupassen. Bei Trübung des Kulturmediums ist die Futterration zu reduzieren. Die Futterzugaben sind sorgfältig zu notieren. Zu wenig Futter kann dazu führen, dass die Larven in die Wassersäule abwandern, während zu viel Futter die mikrobielle Aktivität verstärkt und die Sauerstoffkonzentrationen verringert. In beiden Fällen kann es zu einer Verlangsamung des Wachstums der Organismen kommen.
6. Wenn neue Kulturgefäße angesetzt werden, können auch einige Grünalgenzellen (z. B.

*Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) hinzugefügt werden.

### **Fütterung der geschlüpften Imagines**

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

### **Emergenz**

8. Nach ca. 13 bis 15 Tagen bei einer Temperatur von  $20 \pm 2$  °C beginnen die Imagines in den Larvenzuchtgefäßen zu schlüpfen. Männchen sind leicht an den gefiederten Antennen zu erkennen.

### **Eiergelege**

9. Sobald sich Imagines in den Zuchtkäfigen befinden, sind alle Larvenzuchtgefäße dreimal wöchentlich auf gallertartige Eiergelege zu kontrollieren. Diese sind vorsichtig zu entfernen und in eine kleine Schale mit einer Probe Anzuchtwasser umzusetzen. Mit den Eiergelegen werden neue Kulturen angesetzt (z. B. 2 bis 4 Eiergelege pro Gefäß) oder Toxizitätstests durchgeführt.
10. Nach 2 bis 3 Tagen sollten L1-Larven schlüpfen.

### **Ansetzen neuer Kulturen**

11. Sobald die Zucht etabliert ist, sollte es möglich sein, je nach Prüfungsanforderungen wöchentlich oder weniger häufig frische Kulturen anzusetzen und die älteren Prüfgefäße nach dem Schlüpfen der Imagines zu entfernen. Auf diese Weise ist es möglich, mit nur geringem Aufwand ständig über Imagines zu verfügen.

### **Zubereitung der Prüflösungen M4 und M7**

12. Das Medium M4 wurde von Elendt (1990) beschrieben. Das Medium M7 wird wie das Medium M4 zubereitet, mit Ausnahme der in Tabelle 1 angegebenen Substanzen, deren Konzentration bei M7 viermal niedriger ist als bei M4. Eine Veröffentlichung zum Medium M7 wird derzeit ausgearbeitet (Elendt, persönliche Mitteilung). Die Prüflösungen nicht nach den Anweisungen von Elendt und Bias (1990) zubereiten, da die für die Zubereitung der Stammlösungen angegebenen Konzentrationen von  $\text{NaSiO}_3$ ,  $5 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  nicht geeignet sind.

### **Herstellung des M7-Mediums**

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

Das Medium wird belüftet und stabilisiert.

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

Stammlösungen (I)	Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird	Zur Herstellung der kombinierten Stammlösung (II): Folgende Mengen (ml) der Stammlösungen (I) mischen und mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter auffüllen		Endkonzentrationen der Prüflösungen (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>(1)</sup>	57190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl <sub>2</sub> • 4 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	7210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl <sup>(1)</sup>	6120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl <sup>(1)</sup>	1420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	3040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr <sup>(1)</sup>	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	1260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl <sub>2</sub>	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na2EDTA • 2 H <sub>2</sub> O <sup>(1)(2)</sup>	5000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O <sup>(1)(2)</sup>	1991	20,0	5,0	1,0	0,249

<sup>(1)</sup> Diese Stoffe sind in M4 und M7 unterschiedlich dosiert (siehe oben).

<sup>(2)</sup> Diese Lösungen werden einzeln hergestellt, zusammengossen und sofort autoklaviert.

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

	Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird	Zur Herstellung des M4- und des m7-Mediums zugesetzte Menge an Makronährstoff-Stammlösungen (ml/l)	Endkonzentrationen der Prüflösungen M4 und M7 (mg/l)
CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	293800	1,0	293,8
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	246600	0,5	123,3
KCl	58000	0,1	5,8
NaHCO <sub>3</sub>	64800	1,0	64,8
NaSiO <sub>3</sub> • 9 H <sub>2</sub> O	50000	0,2	10,0
NaNO <sub>3</sub>	2740	0,1	0,274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1430	0,1	0,143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1840	0,1	0,184

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

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

	Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird	Zur Herstellung des M4- und des M7-Mediums zugesetzte Menge an Vitamin-Stammlösung (ml/l)	Endkonzentrationen der Prüflösungen M4 und M7 (mg/l)
Thiamin-hydrochlorid	750	0,1	0,075
Cyanocobalamin (B <sub>12</sub> )	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

## LITERATUR

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

Elendt B.P. (1990): Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. and Bias W.-R. (1990): Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

### Anlage 3

## ZUBEREITUNG DES FORMULIERTEN SEDIMENTS

### Zusammensetzung des Sediments

Das formulierte Sediment sollte die folgende Zusammensetzung haben:

Bestandteil	Charakterisierung	% des Trockengewichts des Sediments
Torf	Sphagnum-Torf, so nahe wie möglich bei pH 5,5 bis 6,0, ohne sichtbare Pflanzenreste, fein gemahlen (Partikelgröße $\leq 1$ mm) und luftgetrocknet	4-5
Quarzsand	Korngröße: $> 50\%$ der Partikel sollten Größen zwischen 50 und 200 $\mu\text{m}$ aufweisen	75-76
Kaolin-Ton	Kaolinit-Gehalt $\geq 30\%$	20
Organischer Kohlenstoff	Eingestellt durch Zugabe von Torf und Sand	2 ( $\pm 0,5$ )
Calciumcarbonat	$\text{CaCO}_3$ , pulverisiert, chemisch rein	0,05 – 0,1
Wasser	Leitfähigkeit $\leq 10 \mu\text{S/cm}$	30 – 50

### Zubereitung

Der Torf wird luftgetrocknet und zu feinem Pulver zermahlen. Die erforderliche Menge an Torfpulver wird mit Hilfe eines Hochleistungshomogenisators in entionisiertem Wasser suspendiert und durch Zugabe von  $\text{CaCO}_3$  auf einen pH-Wert von  $5,5 \pm 0,5$  eingestellt. Diese Suspension wird bei  $20 \pm 2$  °C für mindestens zwei Tage unter sanftem Rühren konditioniert, um den pH-Wert zu stabilisieren und eine Etablierung der mikrobiellen Fauna zu ermöglichen. Der pH-Wert wird erneut bestimmt und sollte bei  $6,0 \pm 0,5$  liegen. Nun werden die übrigen Komponenten (Sand und Kaolin-Ton) sowie entionisiertes Wasser zur Torf-Wasser-Suspension hinzugegeben und zu einem homogenen Sediment vermischt, dessen Wassergehalt 30 bis 50 % des Trockengewichts des Sediments betragen sollte. Der pH-Wert der fertigen Mischung wird erneut gemessen und erforderlichenfalls mit  $\text{CaCO}_3$  auf 6,5 bis 7,5 eingestellt. Sedimentproben nehmen, um das Trockengewicht und den Gehalt an organischem Kohlenstoff zu bestimmen. Es wird empfohlen, das formulierte Sediment vor dem Einsatz in einem Chironomiden-Toxizitätstest für sieben Tage unter denselben Bedingungen, wie sie im anschließenden Test herrschen, zu konditionieren.

### Lagerung

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

abschließt, zu verwenden.

## **LITERATUR**

Kapitel C.8 dieses Anhangs: Toxizität für Regenwürmer

Meller M., Egeler P., Römbke J., Schallnass H., Nagel R. and Streit B. (1998): Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10-20.

## Anlage 4

### CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS

SUBSTANZ	KONZENTRATION
Partikel	< 20 mg/l
Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffen	< 2 mg/l
Nichtionisiertes Ammonium	< 1 µg/l
Härte in CaCO <sub>3</sub>	<400 mg/l*
Restchlor	< 10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	< 25 ng/l

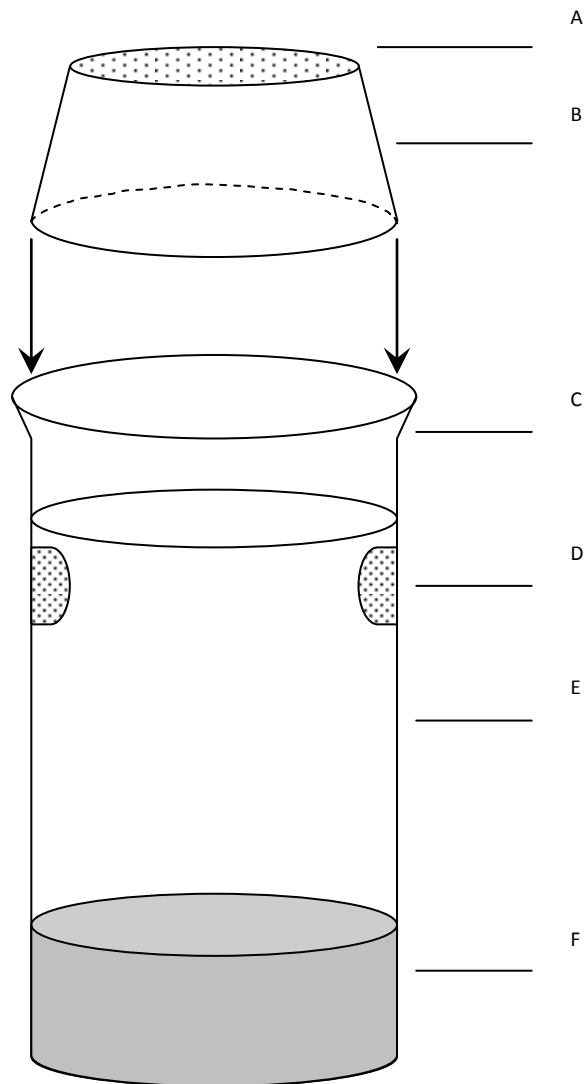
\* Wird jedoch ein Ionenaustausch zwischen den Härteionen und der Prüfsubstanz vermutet, ist Wasser geringerer Härte zu verwenden (und somit ist in diesem Fall das Elendt-Medium M4 zu vermeiden).



## Anlage 5

### EMPFEHLUNGEN FÜR DIE BEOBACHTUNG DES SCHLÜPFENS DER CHIRONOMIDENLARVEN

Die Bechergläser werden ab dem 20. Tag bis zum Versuchsende mit Emergenzfallen abgedeckt. Nachstehend ist ein Beispiel für eine derartige Falle abgebildet:



A: Nylongaze

D: abgedeckte Öffnungen für den Wasseraustausch

B: umgedrehte Plastikschalen

E: Wasser

## "C.29. LEICHTE BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT – BESTIMMUNG VON CO<sub>2</sub> IN GESCHLOSSENEN FLASCHEN (*Headspace*-Test)

### EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 310 (2003). Sie beschreibt ein Screening-Verfahren zur Bestimmung der leichten biologischen Abbaubarkeit von chemischen Substanzen und liefert ähnliche Informationen wie die sechs Prüfmethoden (A bis F), die in Kapitel C.4 dieses Anhangs beschrieben sind. Daher kann eine chemische Substanz, die im Rahmen dieser Prüfmethode positive Ergebnisse zeigt, als leicht biologisch abbaubar und somit auch als unter Umweltbedingungen rasch zersetzbar angesehen werden.
2. Die anerkannte Methode zur Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Entwicklung (1), die auf dem ursprünglichen Sturm-Test (2) zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von organischen Substanzen durch Erfassung des durch die mikrobielle Aktivität erzeugten Kohlendioxids basiert, ist in der Regel die erste Wahl für die Prüfung von im Wasser schwer löslichen Substanzen sowie von stark adsorbierenden Substanzen. Sie wird auch für lösliche (aber nicht flüchtige) Substanzen herangezogen, da die Kohlenstoffentwicklung von vielen als der einzige eindeutige Beweis für mikrobielle Aktivität angesehen wird. Eine Abnahme des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) kann durch physikalisch-chemische Prozesse (Adsorption, Verflüchtigung, Ausfällung, Hydrolyse) sowie durch mikrobielle Aktivität und zahlreiche nichtbiologische Reaktionen, die Sauerstoff verbrauchen, erreicht werden. Es ist selten, dass CO<sub>2</sub> auf abiotische Weise aus organischen Substanzen entsteht. Beim ursprünglichen und modifizierten Sturm-Test (1)(2) wird CO<sub>2</sub> aus der Flüssigphase entfernt und durch *Sparging* (d. h. Durchblasen von behandelter Luft durch das flüssige Medium zur Entfernung des CO<sub>2</sub>) in die Adsorptionsgefäße geleitet, während bei der Version von Larson (3)(4) das CO<sub>2</sub> aus dem Reaktionsgefäß in die Adsorptionsgefäße übergeleitet wird, indem CO<sub>2</sub>-freie Luft durch den Luftraum (*Headspace*) geblasen und dabei das Prüfgefäß kontinuierlich geschüttelt wird. Nur in der geänderten Version von Larson wird das Reaktionsgefäß geschüttelt; dagegen wird Rühren in der ISO-Norm 9439 (5) und in der ursprünglichen amerikanischen Version (6) ausschließlich für unlösliche Substanzen vorgeschrieben, wobei beide Versionen *Sparging* anstelle des *Headspace*-Austausches vorsehen. In einer anderen offiziellen amerikanischen EPA-Methode (7), die auf der Gledhill-Methode (8) basiert, wird das Reaktionsgefäß geschüttelt und atmosphärisch verschlossen. Das gebildete CO<sub>2</sub> wird direkt aus der Gasphase in einem Alkali-Abscheider aufgefangen, wie bei den klassischen Warburg/Barcroft-Respirometer-Kolben.
3. Es hat sich jedoch bei der Anwendung des modifizierten Standard-Sturm-Tests auf eine Reihe von chemischen Substanzen gezeigt, dass anorganischer Kohlenstoff (IC) sich im Medium akkumuliert (9). Der Abbau von 20 mg C/l Anilin ergab eine IC-Konzentration von 8 mg/l. Dies bedeutet, dass die Ansammlung von CO<sub>2</sub> im Alkali-Abscheider kein wahrheitsgetreues Bild der CO<sub>2</sub>-Menge liefert, die zwischenzeitlich während des Abbaus auf mikrobielle Weise erzeugt wird. Folglich wird die Auflage, wonach für die

Einstufung einer Prüfsubstanz als „biologisch leicht abbaubar“ > 60 % der theoretisch maximalen Menge an CO<sub>2</sub> (ThCO<sub>2</sub>) innerhalb eines „10-Tage-Fensters“ (der 10-Tage-Abschnitt, der unmittelbar auf das Erreichen von 10 % Abbau folgt) erreicht sein muss, für einige Substanzen nicht erreicht, die bei Zugrundelegung der DOC-Abnahme in dieser Kategorie eingestuft worden wären.

4. Ist der Abbaugrad niedriger als erwartet, so hat möglicherweise eine Akkumulation des IC in der Prüflösung stattgefunden. In diesem Fall kann die biologische Abbaubarkeit nach anderen Verfahren zur Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit bewertet werden.
5. Andere Nachteile der Sturm-Methode (umständlich, zeitaufwändig, anfälliger für Versuchsfehler und nicht geeignet für flüchtige Substanzen) waren früher bereits der Anlass dafür, anstelle des Gasdurchflusssystem nach einer anderen Technik mit geschlossenen Gefäßen als der von Gledhill zu suchen (10)(11). Boatman et al (12) haben frühere Methoden überprüft und sich für ein System mit geschlossenem Luftraum entschieden, bei dem CO<sub>2</sub> am Ende der Inkubation durch Ansäuerung des Mediums in den *Headspace* freigesetzt wird. Das CO<sub>2</sub> wurde mittels Gaschromatografie (GC)/IC-Analyse in automatisch aus dem *Headspace* entnommenen Proben gemessen, wobei der gelöste anorganische Kohlenstoff (DIC) in der Flüssigphase jedoch nicht berücksichtigt wurde. Auch waren die verwendeten Gefäße sehr klein (20 ml) und fassten nicht mehr als 10 ml des Mediums, was sich als problematisch erwies, z. B. wenn zwangsläufig nur sehr kleine Mengen unlöslicher Prüfsubstanz hinzugefügt wurden. Auch kann es sein, dass das inokulierte Medium nicht genügend oder keine Mikroorganismen enthält, durch die die Prüfsubstanzen abgebaut werden konnten.
6. Diese Probleme wurden durch die unabhängigen Studien von Struijs und Stoltenkamp (13) und von Birch und Fletcher (14) überwunden, wobei letztere sich von ihren Erfahrungen mit den in Prüfmethode für die anaerobe biologische Abbaubarkeit verwendeten Geräten hatten inspirieren lassen (15). Bei der erstgenannten Methode (13) wird das CO<sub>2</sub> im *Headspace* nach Ansäuerung und Herstellung eines Gleichgewichtszustands bestimmt, während bei letztgenannter Methode (14) der DIC sowohl in der Gasphase als auch in der Flüssigphase ohne Behandlung bestimmt wird; über 90 % des gebildeten IC befanden sich in der Flüssigphase. Gegenüber dem Sturm-Test hatten beide Methoden den Vorteil, dass das Prüfsystem kompakter und leichter zu handhaben war, flüchtige Substanzen getestet werden können und dem Risiko einer Verzögerung bei der Bestimmung des gebildeten CO<sub>2</sub> zuvorgekommen wird.
7. Diese beiden Konzepte wurden in der ISO-Norm für den CO<sub>2</sub>-*Headspace*-Test (16) miteinander kombiniert, die einem Ringtest unterzogen wurde (17) und die Grundlage für die vorliegende Prüfmethode bildet. Die beiden Konzepte wurden auch in der amerikanischen EPA-Methode (18) angewendet. Es wurden zwei Methoden für die CO<sub>2</sub>-Bestimmung empfohlen: Bestimmung des CO<sub>2</sub> im *Headspace* nach Ansäuerung (13) und Bestimmung des IC in der Flüssigphase nach Zugabe von überschüssigem Alkali. Letztere Methode wurde von Peterson während des CONCAWE-Ringtests (19) dieser modifizierten *Headspace*-Methode eingeführt, um die inhärente biologische Abbaubarkeit zu bestimmen. Die Änderungen, die im Rahmen der Revision 1992 (20) der in Kapitel C.4 dieses Anhangs beschriebenen Prüfmethode für die „leichte“ biologische Abbaubarkeit vorgenommen wurden, sind in die vorliegende Prüfmethode einbezogen worden, so dass die Bedingungen (Medium, Dauer usw.) im

Übrigen die gleichen sind wie bei dem überarbeiteten Sturm-Test (20). Birch und Fletcher (14) haben nachgewiesen, dass die mit dieser *Headspace*-Prüfmethode erzielten Ergebnisse den im OECD-Ringtest (21) der überarbeiteten Prüfmethode mit denselben Chemikalien erzielten Ergebnisse sehr ähnlich sind.

## PRINZIP DER PRÜFMETHODE

8. Die Prüfsubstanz (in der Regel 20 mg/l Kohlenstoff) wird als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu einem Mineralsalz-Puffermedium gegeben, das mit einer Mischpopulation von Mikroorganismen beimpft wurde. Der Versuch wird in geschlossenen Gefäßen mit einem Luftraum (*Headspace*) durchgeführt, der als Sauerstoffreservoir für den aeroben Abbau dient. Die aus dem vollständigen aeroben biologischen Abbau der Prüfsubstanz resultierende CO<sub>2</sub>-Entwicklung wird bestimmt, indem der in den Prüfflaschen gebildete überschüssige IC mit dem in den Blindwertgefäßen, die nur das Inokulum enthalten, verglichen wird. Der Abbaugrad wird als Prozentwert der theoretischen maximalen Menge an anorganischem Kohlenstoff (ThIC) ausgedrückt, die wiederum aus der ursprünglich zugegebenen Menge an Prüfsubstanz (als organischer Kohlenstoff) berechnet wird.
9. Die DOC-Abnahme und/oder der Primärabbau der Prüfsubstanz können ebenfalls bestimmt werden (20).

## ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

10. Der Gehalt an organischem Kohlenstoff (Massenanteil) der Prüfsubstanz muss bekannt sein, sei es aufgrund ihrer chemischen Struktur oder durch Messung, damit der prozentuale Abbau berechnet werden kann. Bei flüchtigen Prüfsubstanzen ist eine gemessene oder berechnete Henry-Konstante für die Bestimmung eines angemessenen Verhältnisses von *Headspace* zu Flüssigkeit hilfreich. Angaben über die Toxizität der Prüfsubstanz gegenüber Mikroorganismen sind wichtig für die Auswahl einer geeigneten Prüfkonzentration und die Auslegung der Ergebnisse bei geringem Abbau: Es wird empfohlen, eine Hemmkontrolle vorzusehen, außer wenn bekannt ist, dass die Prüfsubstanz mikrobielle Aktivitäten nicht hemmt (siehe Nummer 24).

## ANWENDUNGSBEREICH DER METHODE

11. Diese Methode ist auf wasserlösliche und wasserunlösliche Substanzen anwendbar, allerdings ist für eine gute Dispersion der Prüfsubstanz zu sorgen. Bei Anwendung des empfohlenen Verhältnisses von *Headspace* zu Flüssigkeit von 1:2 können flüchtige Substanzen mit einer Henry-Konstante von bis zu 50 Pa·m<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup> getestet werden, da der Anteil der Prüfsubstanz im *Headspace* höchstens 1 % beträgt (13). Ein kleineres *Headspace*-Volumen kann für die Testung von Prüfsubstanzen mit höherer Flüchtigkeit verwendet werden, allerdings kann ihre Bioverfügbarkeit begrenzt sein, insbesondere wenn es sich um in Wasser schwer lösliche Substanzen handelt. Es ist jedoch sicherzustellen, dass das Verhältnis von *Headspace* zu Flüssigkeit und die Konzentration der Prüfsubstanz so bemessen sind, dass ein ausreichendes Volumen an Sauerstoff vorhanden ist, um einen vollständigen aeroben biologischen Abbau zu

ermöglichen (Eine hohe Konzentration an Prüfsubstanz und ein kleines *Headspace*-Volumen sollten z. B. vermieden werden). Leitlinien hierzu sind in (13)(23) zu finden.

## REFERENZSUBSTANZEN

12. Zur Kontrolle des Prüfverfahrens sollte parallel eine Referenzsubstanz getestet werden, deren biologische Abbaubarkeit bekannt ist. Zu diesem Zweck können Anilin, Natriumbenzoat oder Ethylenglykol bei der Testung von wasserlöslichen Substanzen und Octan-1-ol für schwer lösliche Prüfsubstanzen verwendet werden (13). Der biologische Abbau dieser Substanzen muss nach 14 Tagen > 60 % des ThIC erreichen.

## REPRODUZIERBARKEIT

13. Der ISO-Ringtest der Prüfmethode (17), der unter den empfohlenen Bedingungen, einschließlich einer Prüfkonzentration von 20 mg/l Kohlenstoff, durchgeführt wurde, brachte folgende Ergebnisse:

<i>Prüfsubstanz</i>	<i>Mittelwert des prozentualen biologischen Abbaus (28d)</i>	<i>Variationskoeffizient (%)</i>	<i>Anzahl der Laboratorien</i>
<i>Anilin</i>	90	16	17
<i>Octan-1-ol</i>	85	12	14

Bei der Verwendung von Anilin war die Variabilität innerhalb desselben Tests (Reproduzierbarkeit) mit einem Variationskoeffizienten von maximal 5 % bei nahezu allen Testdurchläufen niedrig. In den beiden Fällen, in denen die Reproduzierbarkeit schlechter war, war die größere Variabilität wahrscheinlich der hohen IC-Produktion in den Blindwertansätzen zuzuschreiben. Bei Octan-1-ol war die Reproduzierbarkeit schlechter, wobei die Variabilität jedoch in 79 % der Testdurchläufe weniger als 10 % betrug. Diese größere Variabilität innerhalb desselben Tests könnte auf Dosierfehlern beruhen, da ein kleines Volumen (3 bis 4 µl) Octan-1-ol in die geschlossenen Prüfflaschen injiziert werden musste. Geringere Prüfsubstanzkonzentrationen würden höhere Variationskoeffizienten ergeben, insbesondere Konzentrationen von weniger als 10 mg/l Kohlenstoff. Dieses Problem lässt sich zum Teil dadurch beheben, dass die Konzentration des gesamten anorganischen Kohlenstoffs (TIC) im Inokulum reduziert wird.

14. In einem EU-Ringtest (24) von fünf Tensiden in einer Konzentration von 10 mg/l Kohlenstoff wurden folgende Ergebnisse erzielt:

<i>Prüfsubstanz</i>	<i>Mittelwert des prozentualen biologischen Abbaus</i>	<i>Variationskoeffizient (%)</i>	<i>Anzahl der Laboratorien</i>
---------------------	--	----------------------------------	--------------------------------

	(28d)		
<i>Tetrapropylen- benzolsulfonat</i>	17	45	10
<i>Di-iso- Octylsulfosuccinat</i> (anionisch)	72	22	9
<i>Hexadecyl- trimethyl*- ammoniumchlorid</i> (kationisch)	75	13	10
<i>Iso-Nonylphenol- (Ethoxylat)<sub>9</sub></i> (nichtionisch)	41	32	10
<i>Cocoamidopropyl- Dimethylhydroxy- Sulfobetain</i> (amphoter)	60	23	11

\* SiO<sub>2</sub> wurde zur Neutralisierung der Toxizität hinzugefügt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Variabilität in der Regel bei den weniger gut abgebauten Tensiden höher war. Die Variabilität innerhalb desselben Tests betrug in über 90 % der Fälle weniger als 15 % und lag maximal bei 30 bis 40 %.

ANM.: Die meisten Tenside bestehen nicht nur aus einer Molekülart, sondern sind Mischungen aus Isomeren, Homologen usw., die nach verschiedenen lag-Phasen und mit unterschiedlicher kinetischer Geschwindigkeit abbauen. Dies führt zu „verwischten“, abgeschwächten Kurven, so dass der Grenzwert von 60 % möglicherweise nicht innerhalb des „10-Tage-Fensters“ erreicht wird, selbst wenn jede einzelne Molekülart gesondert getestet den Wert von > 60 % innerhalb von 10 Tagen erreichen würde. Dies ist auch bei anderen komplexen Mischungen zu beobachten.

## BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

### Geräte

15. Übliche Laborausrüstung und folgende Geräte:

- a) Gläserumflaschen, mit Butylgummisepten und Aluminiumkrampen verschließbar. Empfohlen wird eine Größe von 125 ml bei einem Flaschenvolumen von ca. 160 ml (In diesem Fall muss das Volumen der einzelnen Flaschen  $160 \pm 1$  ml betragen). Kleinere Gefäße können verwendet werden, wenn die Ergebnisse den Bedingungen unter den Nummern 66 und 67 entsprechen;
- b) Kohlenstoffanalysator oder sonstiges Gerät zur Bestimmung des

- anorganischen Kohlenstoffs (z. B. Gaschromatograph);
- c) Präzisionsspritzen für Gas- und Flüssigproben;
- d) Orbitalschüttler in temperaturkontrollierter Umgebung;
- e) Vorrichtung für die Zufuhr von CO<sub>2</sub>-freier Luft – Hierzu kann Luft über Natronkalkgranulat oder durch eine Gasmischung aus 80 % N<sub>2</sub> und 20 % O<sub>2</sub> geleitet werden (optional) (siehe Nummer 28);
- f) Filtrationsvorrichtung mit Membranfilter (Porenweite zwischen 0,20 µm und 0,45 µm) (optional);
- g) Analysator zur Bestimmung des organischen Kohlenstoffs (optional).

### *Reagenzien*

16. Nur Reagenzien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ verwenden.

### *Wasser*

17. Wasser, destilliert oder entionisiert, mit weniger als 1 mg/l an gesamtem organischem Kohlenstoff. Dies entspricht ≤ 5% des durch die empfohlene Prüfsubstanzdosis bedingten ursprünglichen Gehalts an organischem Kohlenstoff.

### *Stammlösungen für das Mineralsalzmedium*

18. Die Stammlösungen und das Mineralsalzmedium sind mit denen der ISO-Norm 14593 (16) und der C.4-Prüfmethoden zur Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit (20) vergleichbar. Höhere Konzentrationen an Ammoniumchlorid (2,0 g/l anstelle von 0,5 g/l) sollten nur in ganz besonderen Ausnahmefällen erforderlich sein, z. B. bei einer Prüfsubstanzkonzentration von > 40 mg/l Kohlenstoff. Stammlösungen sind gekühlt zu lagern und werden nach sechs Monaten oder bei festgestellten Niederschlägen oder mikrobiellem Wachstum früher verworfen. Folgende Stammlösungen zubereiten:

- a) Kaliumdihydrogenorthosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 8,50 g  
 Dikaliummonohydrogenorthosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 21,75 g  
 Dinatriummonohydrogenorthosphat-Dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) 33,40 g  
 Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) 0,50 g

In Wasser lösen und auf 1 L auffüllen. Der pH-Wert der Lösung sollte bei 7,4 (± 0,2) liegen. Wenn dies nicht der Fall ist, eine neue Lösung herstellen.

- b) Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 36,40 g

In Wasser lösen und auf 1 L auffüllen.

- c) Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 22,50 g

In Wasser lösen und auf 1 L auffüllen.

- d) Eisen(III)chlorid-Hexahydrat (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) 0,25 g

In Wasser lösen und auf 1 L auffüllen und einen Tropfen HCl-Konzentrat hinzufügen.

### *Zubereitung des mineralischen Mediums*

19. 10 ml Lösung (a) mit 800 ml Wasser (Nummer 17) mischen, je 1 ml der Lösungen

(b), (c) und (d) hinzugeben und mit Wasser auf 1 L auffüllen (Nummer 17).

#### *Andere Reagenzien*

20. Konzentrierte Orthophosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (>85% Masse pro Volumen).

#### *Natriumhydroxid-Lösung 7M*

21. 280 g Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ ) in 1 L Wasser (Nummer 17) lösen. Die Konzentration an gelöstem anorganischem Kohlenstoff (DIC) bestimmen und diesen Wert bei der Berechnung des Testergebnisses berücksichtigen (siehe Nummern 55 und 61), insbesondere im Hinblick auf das Validitätskriterium unter Nummer 66 (b). Eine frische Lösung zubereiten, wenn die DIC-Konzentration zu hoch ist.

#### *Prüfsubstanz*

22. Bei ausreichend wasserlöslichen Prüfsubstanzen eine Stammlösung in Wasser (Nummer 17) oder im Testmedium (Nummer 19) herstellen. Die Konzentration sollte möglichst 100-mal größer sein als die im Versuch verwendete endgültige Konzentration. Es kann erforderlich sein, den pH-Wert einzustellen. Ein ausreichendes Volumen der Stammlösung zum mineralischen Medium geben, um eine TOC-Konzentration zwischen 2 und 40 mg/l Kohlenstoff, vorzugsweise jedoch 20 mg/l Kohlenstoff zu erhalten. Bei geringeren Konzentrationen kann es sein, dass sich die Genauigkeit verschlechtert. Lösliche und nicht lösliche flüssige Substanzen können direkt mit Hilfe von Präzisionspritzen in die Gefäße gegeben werden. Für schwer oder nicht lösliche Prüfsubstanzen kann eine besondere Behandlung erforderlich sein (25). Folgende Techniken stehen zur Wahl:

- a) Direkteinwaage;
- b) Ultraschalldispersion vor Zugabe der Prüfsubstanz;
- c) Dispersion mit Hilfe eines Emulgiermittels; vor Zugabe des Mittels ist festzustellen, ob es sich hemmend oder stimulierend auf die mikrobielle Aktivität auswirkt;
- d) Adsorption von flüssigen Prüfsubstanzen oder einer mit einem geeigneten Lösungsmittel hergestellten Lösung an ein inertes Medium oder inertes Trägermaterial (z. B. Glasfaserfilter) mit anschließender Verdampfung des Lösungsmittels (sofern eines verwendet wurde) und Direkteinwaage;
- e) Zugabe eines bekannten Volumens einer Lösung der Prüfsubstanz in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel in ein leeres Prüfgefäß mit anschließender Verdampfung des Lösungsmittels.

Bei den für die Techniken (c), (d) und (e) verwendeten Vermittlern und Lösungsmitteln ist zu testen, ob sie sich stimulierend oder hemmend auf die mikrobielle Aktivität auswirken (siehe Nummer 42(b).)

#### *Referenzsubstanz*

23. Eine Stammlösung der (löslichen) Referenzsubstanz in Wasser (Nummer 17) in einer Konzentration zubereiten, die möglichst 100-mal größer ist als die im Versuch zu verwendende endgültige Konzentration (20 mg/l Kohlenstoff).



### *Hemmkontrolle*

24. Es kommt häufig vor, dass unter den Bedingungen, die für die Beurteilung des leichten biologischen Abbaus zugrunde gelegt werden, kein signifikanter Abbau der Prüfsubstanzen festzustellen ist. Eine mögliche Ursache ist, dass sich die Prüfsubstanz in der Konzentration, in der sie im Test aufgetragen wird, hemmend auf das Inokulum auswirkt. Eine Hemmkontrolle kann in den Versuchsaufbau einbezogen werden, um (rückblickend) eine Hemmung als mögliche Ursache oder beitragenden Faktor leichter ausmachen zu können. Die Hemmkontrolle kann auch dazu dienen, derartige Interferenzen auszuschließen und nachzuweisen, dass der nicht stattgefundene oder schwache Abbau ausschließlich auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass die Mikroorganismen die Prüfsubstanz unter den Prüfbedingungen nicht angreifen. Um Informationen über die Toxizität der Prüfsubstanz gegenüber (aeroben) Mikroorganismen zu erhalten, eine Lösung aus Prüfsubstanz und Referenzsubstanz (Nummer 19) im Prüfmedium herstellen, dabei für beide Substanzen jeweils dieselbe Konzentration wie die im Versuch zugefügte Konzentration verwenden (siehe Nummern 22 und 23).

### *Inokulum*

25. Das Inokulum kann aus verschiedenen Quellen gewonnen werden: aus Belebtschlamm, aus Kläranlagenablauf (nicht chloriert), aus Oberflächenwasser, aus Böden oder aus mehreren dieser Quellen zugleich (20). Die Abbauaktivität der Quelle sollte mit Hilfe einer Referenzsubstanz überprüft werden. Ungeachtet der Quelle sollten vorexponierte Mikroorganismen nicht eingesetzt werden, wenn das Verfahren als Test für leichte biologische Abbaubarkeit verwendet werden soll.

Warnung: Belebtschlamm, Abwasser und Kläranlagenablauf können pathogene Organismen enthalten und sind daher mit Vorsicht zu handhaben.

26. Das für das Inokulum optimale Volumen ist erfahrungsgemäß das Volumen, das
- ausreicht, um eine genügende Abbauaktivität zu ermöglichen;
  - die Referenzsubstanz zum vorgesehenen Prozentgrad abbaut (siehe Nummer 66);
  - zwischen  $10^2$  und  $10^5$  koloniebildende Einheiten je ml Endgemisch ergibt;
  - üblicherweise 4 mg/l suspendierte Stoffe aus Belebtschlamm im Endgemisch ergibt (höhere Konzentrationen bis zu 30 mg/l sind möglich, können aber zu einem deutlichen Anstieg der  $\text{CO}_2$ -Produktion in den Blindwerten führen (26));
  - eine Menge von weniger als 10 % der ursprünglichen Konzentrationen an organischem Kohlenstoff der zugegebenen Prüfsubstanz liefert;
  - in der Regel 1-10 ml Inokulum für 1 Liter Testlösung beträgt.

### *Belebtschlamm*

27. Eine Belebtschlammprobe ist dem Belebungsbecken einer Kläranlage oder dem Belüftungsgefäß einer Laborkläranlage, die hauptsächlich kommunale Abwässer behandeln, frisch zu entnehmen. Falls erforderlich, sind grobe Partikel durch ein feinmaschiges Sieb (z. B. mit  $1 \text{ mm}^2$  Siebmaschengröße) auszusieben; danach ist der Schlamm bis zur Verwendung aerob zu halten.

28. Eine andere Möglichkeit besteht darin, den Schlamm nach Abtrennung grober Partikel absitzen zu lassen oder zu zentrifugieren (z. B. 10 Min. bei 1100 g). Der Überstand wird verworfen und der Schlamm kann im mineralischen Medium gewaschen werden. Der konzentrierte Schlamm wird in einem mineralischen Medium suspendiert, um eine Konzentration von 3 bis 5 g suspendierte Feststoffe pro Liter zu erhalten. Anschließend wird bis zur Verwendung belüftet.
29. Der Schlamm sollte von einer gut arbeitenden konventionellen Anlage genommen werden. Wenn Schlamm aus einer Abwasserkläranlage verwendet werden muss, der vermutlich Substanzen mit hemmender Wirkung enthält, ist er zu waschen. Dazu lässt man den resuspendierten Schlamm nach gründlichem Durchmischen absitzen oder zentrifugiert ihn, verwirft anschließend den Überstand und suspendiert den gewaschenen Schlamm in einem weiteren Volumen mineralischen Mediums erneut. Diese Schritte sind so lange zu wiederholen, bis der Schlamm als frei von übermäßigem Substrat oder Hemmsubstanz angesehen wird.
30. Nach vollständiger Resuspension oder bei unbehandeltem Schlamm ist unmittelbar vor Gebrauch das Trockengewicht der suspendierten Feststoffe zu bestimmen.
31. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Homogenisierung von Belebtschlamm (3 bis 5 g suspendierte Feststoffe pro Liter). Dazu wird der Schlamm 2 Min. bei mittlerer Geschwindigkeit in einer mechanischen Mischvorrichtung durchmischt. Danach lässt man den durchgemischten Schlamm 30 Min., wenn erforderlich länger, absitzen und dekantiert die als Inokulum zu verwendende Flüssigkeit im Verhältnis von 10 mg pro Liter mineralischen Mediums.
32. Eine weitere Reduzierung der CO<sub>2</sub>-Entwicklung in den Blindwertansätzen kann erreicht werden, indem der Schlamm über Nacht mit CO<sub>2</sub>-freier Luft belüftet wird. Als Inokulumkonzentration in diesem Versuch 4 mg/l Belebtschlammfeststoffe verwenden (13).

#### *Sekundärabwasserablauf*

33. Alternativ kann das Inokulum aus dem Sekundärablauf einer Kläranlage oder einer Laborkläranlage entnommen werden, in der vor allem kommunale Abwässer behandelt werden. Die Probe aerob halten und am Tag der Probenahme verwenden oder, falls erforderlich, eine Vorkonditionierung vornehmen. Die Ablaufprobe filtrieren, um grobe Partikel zu entfernen, und den pH-Wert messen.
34. Zu Reduzierung des IC-Gehalts das Filtrat mit CO<sub>2</sub>-freier Luft (Nummer 15-e) 1 Std. lang belüften; dabei den pH-Wert durch Zudosieren von Orthophosphorsäure (Nummer 20) bei 6,5 halten. Danach den pH-Wert mit Natriumhydroxid (Nummer 21) wieder auf den Ausgangswert einstellen, die Probe 1 Std. absitzen lassen und ein geeignetes Volumen aus dem Überstand zur Beimpfung verwenden. Dieses *Sparging*-Verfahren verringert den IC-Gehalt des Inokulums. Wenn z. B. das Maximum des empfohlenen Testvolumens von 100 ml filtrierten Ablaufs je Liter als Inokulum eingesetzt wird, dann liegt die Menge des in den Prüfgefäßen für die Blindkontrolle gebildeten IC im Bereich 0,4 mg/l bis 1,3 mg/l (14), was 2 bis 6,5 % des Kohlenstoffs der Prüfsubstanz bei 20 mg C/l und 4 bis 13 % bei 10 mg C/l entspricht.

### *Oberflächengewässer*

35. Aus einem geeigneten Oberflächengewässer eine Probe entnehmen, die unter aeroben Bedingungen zu halten und am Tag der Probenahme zu verwenden ist. Falls erforderlich ist die Probe durch Filtration oder Zentrifugation zu konzentrieren. Das für die einzelnen Prüfgefäße zu verwendende Inokulumvolumen muss die Kriterien von Nummer 26 erfüllen.

### *Böden*

36. Aus einem geeigneten Boden in einer Tiefe von bis zu 20 cm unter der Oberfläche eine Probe entnehmen. Steine, pflanzliche Reste und Invertebraten sollten aus der Bodenprobe entfernt werden, bevor diese durch ein 2-mm-Sieb passiert wird (falls die Probe zu feucht ist, um unmittelbar gesiebt zu werden, kann sie zum Teil luftgetrocknet werden, um das Sieben zu erleichtern). Die Probe ist unter aeroben Bedingungen zu halten und am Tag der Probenahme zu verwenden. (Wird die Probe in einem schwarzen, locker verschlossenen Polyethylenbeutel transportiert, so kann sie bis zu einem Monat lang bei 2 bis 4 °C gelagert werden).

### *Vorbereitung der Inokula*

37. Die Inokula können an die Versuchsbedingungen, nicht aber an die Prüfsubstanz adaptiert werden. Durch die Vorkonditionierung lässt sich die CO<sub>2</sub>-Entwicklung im Blindwert reduzieren. Zur Vorkonditionierung wird der Belebtschlamm, nachdem er im Prüfmedium auf 30 mg/l verdünnt wurde, über eine Dauer von fünf bis sieben Tagen bei Prüftemperatur mit feuchter CO<sub>2</sub>-freier Luft belüftet.

## **PRÜFVERFAHREN**

### *Anzahl der Flaschen*

38. Die Anzahl der benötigten Prüfgefäße (Nummer 15-a) hängt von der Häufigkeit der Analysen und der Testdauer ab.
39. Es wird empfohlen, die Flaschen dreifach zu analysieren, und zwar in ausreichenden Zeitabständen, um das 10-Tage-Fenster erkennen zu können. Es werden ebenfalls mindestens fünf Prüfflaschen (Nummer 15-a) der Versuchsreihen (a), (b) und (c) (siehe Nummer 42) am Versuchsende analysiert, um für den Mittelwert des prozentualen biologischen Abbaus Konfidenzintervalle von 95 % berechnen zu können.

### *Inokulum*

40. Als Inokulum wird Belebtschlamm mit einer Konzentration an trockenen Feststoffen von 4 mg/l verwendet. Unmittelbar vor Gebrauch eine ausreichende Menge Inokulum zubereiten, indem z. B. 2 ml auf geeignete Weise behandelter Belebtschlamm (Nummern 27 bis 32) in einer Konzentration von 2000 mg/l zu 1 Liter Mineralsalzmedium (Nummer 19) hinzugegeben wird. Bei der Verwendung von Abwasser bis zu 100 ml Abwasser (Nummer 33) zu 900 ml Mineralsalzmedium (Nummer 19) hinzugeben und mit dem Medium auf 1 Liter auffüllen.

## Ansatz der Flaschen

41. Portionen des Inokulums so auf die Replikatgefäße verteilen, dass das Verhältnis von *Headspace* zu Flüssigkeit 1:2 beträgt (z. B. 107 ml in Flaschen mit einem Fassungsvermögen von 160 ml geben). Es kann auch ein anderes Verhältnis verwendet werden, doch ist dabei die Warnung unter Nummer 11 zu beachten. Unabhängig von der Art des verwendeten Inokulums ist darauf zu achten, dass dieses gründlich gemischt wird, um zu gewährleisten, dass es gleichmäßig auf die Prüfflaschen verteilt ist.
42. Die Flaschenreihen (Nummer 15a) werden wie folgt vorbereitet:
  - a) Prüfgefäße ( $F_T$  bezeichnet) mit der Prüfsubstanz;
  - b) Prüfgefäße ( $F_B$  bezeichnet) für den Blindwert, nur mit Prüfmedium und Inokulum; alle für die Applikation der Prüfsubstanz in die Prüfgefäße verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel, Vermittler oder Glasfaserfilter sind ebenfalls hinzuzufügen;
  - c) Prüfgefäße ( $F_C$  bezeichnet) mit der Referenzsubstanz zur Kontrolle des Verfahrens;
  - d) falls erforderlich, Prüfgefäße ( $F_I$  bezeichnet) zur Prüfung einer möglichen Hemmwirkung der Prüfsubstanz; die Gefäße enthalten die Prüfsubstanz und die Referenzsubstanz in jeweils derselben Konzentration (Nummer 24) wie die Flaschen  $F_T$  bzw.  $F_C$ ;
  - e) Prüfgefäße ( $F_S$  bezeichnet) zur Prüfung eines möglichen abiotischen Abbaus; wie unter (a) plus 50 mg/l  $HgCl_2$  oder auf andere Weise sterilisiert (z. B. durch Autoklavieren).
43. Wasserlösliche Prüfsubstanzen und Referenzsubstanzen werden als wässrige Lösungen (Nummern 22, 23 und 24) hinzugefügt, um eine Konzentration von 10 bis 20 mg C/l zu erhalten.
44. Nicht wasserlösliche Prüfsubstanzen und nicht wasserlösliche Referenzsubstanzen werden je nach Art der Prüfsubstanz auf verschiedene Weise in die Flaschen gegeben (siehe Nummer 22a-e), und zwar abhängig von der Methode zur Behandlung der Prüfsubstanz entweder vor oder nach der Zugabe des Inokulums. Wird eines der unter Nummer 22a-e beschriebenen Verfahren angewendet, so sind die Flaschen  $F_B$  für den Blindwert (Nummer 42b) genauso zu behandeln, nur dass sie weder die Prüfsubstanz noch die Referenzsubstanz enthalten.
45. Flüchtige Prüfsubstanzen mit Hilfe einer Mikrospritze in die verschlossenen Gefäße (Nummer 47) injizieren. Die Dosis berechnet sich aus dem injizierten Volumen und der Dichte der Prüfsubstanz.
46. Die Prüfgefäße erforderlichenfalls mit Wasser auffüllen, bis in allen Gefäßen dasselbe Flüssigkeitsvolumen erreicht ist. Sicherstellen, dass das Verhältnis *Headspace* zu Flüssigkeit (in der Regel 1:2) und die Konzentration der Prüfsubstanz so bemessen sind, dass ein ausreichendes Volumen an Sauerstoff im *Headspace* vorhanden ist, um einen vollständigen biologischen Abbau zu ermöglichen.
47. Alle Gefäße dann dicht verschließen, z. B. mit Butylgummisepten und Aluminiumkrampen. Flüchtige Prüfsubstanzen sind in dieser Phase hinzuzufügen

(Nummer 45). Wenn die Abnahme der DOC-Konzentration in der Prüflösung bestimmt und die ursprüngliche IC-Konzentration zum Zeitpunkt Null (sterile Kontrollen, Nummer 42e) oder sonstige Parameter bestimmt werden sollen, wird eine entsprechende Probe aus dem Prüfgefäß entnommen. Das Prüfgefäß wird dann samt Inhalt verworfen.

48. Die verschlossenen Flaschen auf einen Orbitalschüttler stellen (Nummer 15d); dabei darauf achten, dass die Schüttelgeschwindigkeit ausreicht, um eine gute Durchmischung der Flascheninhalte zu erreichen (z. B. 150 bis 200 rpm); im Dunkeln bei  $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  inkubieren.

#### *Probenahme*

49. Das Probenahmeschema richtet sich nach der lag-Phase und der kinetischen Geschwindigkeit des biologischen Abbaus der Prüfsubstanz. Die Flaschen werden am Tag der Probenahme für Analysen entnommen. Dies ist mindestens einmal in der Woche erforderlich, kann aber auch öfters (z. B. zweimal pro Woche) erforderlich sein, um eine vollständige Abbaukurve zu erhalten. Die benötigte Anzahl Replikatgefäße der Versuchsreihen  $F_T$ ,  $F_B$  und  $F_C$  und, falls erforderlich,  $F_I$  und  $F_S$  vom Laborschüttler nehmen (siehe Nummer 42). Der Test dauert üblicherweise 28 Tage. Er kann vorzeitig beendet werden, wenn die Abbaukurve zeigt, dass die Plateau-Phase vor dem 28. Tag erreicht wurde. Proben aus den für den 28. Tag des Test für Analysen bestimmten Flaschen entnehmen und die Ergebnisse zur Berechnung der Konfidenzgrenzen oder des Variationskoeffizienten des prozentualen biologischen Abbaus verwenden. Die für die Hemmkontrollen und für die Kontrolle des abiotischen Abbau bestimmten Flaschen brauchen nicht so häufig beprobt zu werden wie die anderen Flaschen; Probenahmen am 1. und am 28. Tag reichen aus.

#### *Analyse des anorganischen Kohlenstoffs (IC)*

50. Das in den Flaschen gebildete  $\text{CO}_2$  durch Messung der Zunahme der Konzentration an anorganischem Kohlenstoff (IC) während der Inkubation bestimmen. Zur Bestimmung des während des Tests gebildeten IC werden die beiden nachstehend beschriebenen Verfahren empfohlen. Da die Verfahren geringfügig unterschiedliche Ergebnisse liefern können, darf in einem Testlauf nur eines davon verwendet werden.
51. Methode (a) wird empfohlen, falls damit zu rechnen ist, dass das Medium Reste z. B. von Galsfilterpapier und/oder nicht löslicher Prüfsubstanz enthält. Für diese Analyse kann ein Gaschromatograph verwendet werden, falls kein Kohlenstoffanalysator zur Verfügung steht. Es ist wichtig, dass die Flaschen (fast) Prüftemperatur haben, wenn das Gas im *Headspace* analysiert wird. Methode (b) ist möglicherweise einfacher für Labors, die zur IC-Bestimmung Kohlenstoffanalysatoren verwenden. Es ist wichtig, dass die für die Umsetzung von  $\text{CO}_2$  zu Carbonat verwendete Natriumhydroxidlösung (Nummer 21) entweder frisch zubereitet wird oder ihr IC-Gehalt bekannt ist, damit dieser Wert bei der Berechnung der Testergebnisse berücksichtigt werden kann (siehe Nummer 66-b.)

#### *Verfahren (a): Ansäuerung auf $\text{pH} < 3$*

52. Vor jeder Versuchsreihe wird der Kohlenstoffanalysator mit einem geeigneten Standard (z. B. 1 % w/w  $\text{CO}_2$  in  $\text{N}_2$ ) kalibriert. Konzentrierte Orthophosphorsäure (Nummer 20)

(z. B. 1 ml je 107 ml Prüfmedium hinzufügen) wird durch das Septum jedes Prüfgefäßes injiziert, um den pH-Wert des Mediums auf  $< 3$  zu senken. Die Flaschen zurück auf den Laborschüttler stellen. Nach 1 Std. Schütteln bei Prüftemperatur die Flaschen wieder vom Laborschüttler herunternehmen, Gasportionen (z. B. 1 ml) aus dem *Headspace* der einzelnen Flaschen entnehmen und in den IC-Analysator injizieren. Die gemessenen IC-Konzentrationen werden in mg C/l notiert.

53. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, dass nach Ansäuerung auf  $\text{pH} < 3$  und Einstellung des Gleichgewichts bei einer Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  die Gleichgewichtskonstante für die Verteilung des  $\text{CO}_2$  zwischen der flüssigen und der gasförmigen Phase in den Prüfgefäßen bei 1,0 liegt, wenn nach Konzentration gemessen wird (13). Dies ist für das Prüfsystem mindestens einmal wie folgt zu überprüfen:

Flaschen mit 5 und 10 mg/l anorganischem Kohlenstoff ansetzen; hierzu eine Lösung von wasserfreiem Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) in  $\text{CO}_2$ -freies Wasser geben, das wie folgt hergestellt wurde: Ansäuern von Wasser auf  $\text{pH} 6,5$  mit konzentrierter Orthophosphorsäure (Nummer 20), Begasen über Nacht mit  $\text{CO}_2$ -freier Luft und Neutralisierung des  $\text{pH}$  mit Alkali. Sicherstellen, dass das Verhältnis *Headspace*-Volumen zu Flüssigkeitsvolumen dem der Testansätze (z. B. 1:2) entspricht. Ansäuern und Einstellen des Gleichgewichts wie unter Nummer 52 beschrieben; IC-Konzentrationen im *Headspace* und in der Flüssigphase bestimmen. Prüfen, ob beide Konzentrationen innerhalb des Versuchsfehlers denselben Wert liefern. Wenn nicht, sollte der Experimentator seine Verfahren überprüfen. Diese Kontrolle der IC-Verteilung zwischen flüssiger und gasförmiger Phase braucht nicht bei jedem Test durchgeführt werden; sie könnte auch während des Kalibrierens erfolgen.

54. Wenn die DOC-Abnahme zu bestimmen ist (nur bei wasserlöslichen Prüfsubstanzen), sollten die Proben aus der Flüssigphase separater Flaschen (ohne Ansäuerung) entnommen, membranfiltriert und in den DOC-Analysator injiziert werden. Diese Flaschen können erforderlichenfalls auch für andere Analysen zur Bestimmung des Primärabbaus verwendet werden.

#### *Verfahren (b): Umsetzung von $\text{CO}_2$ zu Carbonat*

55. Vor jeder Versuchsreihe wird der Kohlenstoffanalysator mit einem geeigneten Standard (z. B. eine Lösung von Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) in  $\text{CO}_2$ -freiem Wasser (siehe Nummer 53) in Konzentrationen von 0 mg/l bis 20 mg/l) kalibriert. Dann Natriumhydroxid-Lösung (7M, Nummer 21) (z. B. 1 ml zu 107 ml Medium) durch das Septum in jede für die Probenahme bestimmte Flasche injizieren und die Flaschen 1 Std. bei Prüftemperatur schütteln. Für alle an einem bestimmten Tag verworfenen Flaschen wird dieselbe NaOH-Lösung verwendet, allerdings nicht unbedingt bei allen Probenahmen, die im Laufe des Versuchs durchgeführt werden. Werden absolute Werte des IC-Gehalts in den Blindwertansätzen für jede Probenahme benötigt, so ist der IC-Gehalt der NaOH-Lösung bei jeder Verwendung der Lösung zu bestimmen. Die Gefäße vom Laborschüttler nehmen und den Inhalt absetzen lassen. Aus der Flüssigphase der einzelnen Prüfgefäße mit Hilfe einer Spritze ein geeignetes Volumen (z. B. 50  $\mu\text{l}$  bis 1000  $\mu\text{l}$ ) entnehmen. Die Proben in den IC-Analysator injizieren und die IC-Konzentrationen aufzeichnen. Darauf achten, dass der eingesetzte Analysator für die bei diesem Verfahren anfallenden alkalischen Proben entsprechend ausgerüstet ist.

56. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Tatsache, dass nach Zugabe von Alkali und Schütteln die Konzentration an IC im *Headspace* vernachlässigbar klein ist. Dies ist für das Prüfsystem mindestens einmal zu überprüfen. Hierzu IC-Standards verwenden, Alkali zugeben, stabilisieren und sodann die IC-Konzentration sowohl im *Headspace* als auch in den Flüssigphasen bestimmen (siehe Nummer 53). Die Konzentration im *Headspace* sollte nahe an Null liegen. Es ist nicht erforderlich, diese praktisch vollständige CO<sub>2</sub>-Adsorption bei jedem Versuch zu überprüfen.
57. Wenn die DOC-Abnahme zu bestimmen ist (nur bei wasserlöslichen Prüfsubstanzen), sollten die Proben aus der Flüssigphase separater Flaschen (ohne Alkali-Zusatz) entnommen, membranfiltriert und in den DOC-Analysator injiziert werden. Diese Flaschen können erforderlichenfalls auch für anderen Analysen zur Bestimmung des Primärabbaus verwendet werden.

## DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

### Berechnung der Ergebnisse

58. Es wird angenommen, dass bei vollständiger Mineralisierung der Prüfsubstanz zu CO<sub>2</sub> die theoretische Menge an anorganischem Kohlenstoff (ThIC) nach Abzug des Blindwerts der Menge an gesamtem organischem Kohlenstoff (TOC) entspricht, die zu Beginn des Tests in die Prüfgefäße gegeben wurde:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}.$$

Der gesamte (mg) anorganische Kohlenstoff (TIC) in den Prüfgefäßen ist:

$$\text{TIC} = (\text{mg C in der Flüssigphase} + \text{mg C im Headspace}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H)$$

Gleichung [1]

Dabei sind:

$V_L$  = das Volumen der Flüssigkeit im Prüfgefäß (in Liter);

$C_L$  = die IC-Konzentration in der Flüssigphase in Milligramm Kohlenstoff je Liter Flüssigkeit (mg/l);

$V_H$  = das Volumen des *Headspace*s (in Liter);

$C_H$  = die IC-Konzentration im *Headspace* in Milligramm Kohlenstoff je Liter Gas (mg/l).

Die Berechnung des TIC für die beiden Analyseverfahren, die bei diesem Test verwendet werden, wird unter den Nummern 60 und 61 beschrieben. Der prozentuale biologische Abbau (% D) wird in beiden Fällen mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{Gleichung [2]}$$

Dabei sind:

TIC<sub>t</sub> = der TIC im Prüfgefäß zur Zeit t in Milligramm (mg);

TIC<sub>b</sub> = der mittlere TIC im Blindwert zur Zeit t in Milligramm (mg);

TOC = der TOC, der am Testbeginn in das Prüfgefäß gegeben wurde, in Milligramm (mg).

Der Abbaugrad (%D) der Prüfsubstanz (F<sub>T</sub>), der Referenzsubstanz (F<sub>C</sub>) und, sofern dies vorgesehen ist, der Hemmkontrolle (F<sub>I</sub>) wird aus dem jeweiligen produzierten TIC für jeden Probenahmezeitpunkt berechnet.

59. Wenn während des Versuchs der TIC-Gehalt in den sterilen Kontrollen (F<sub>S</sub>) deutlich angestiegen ist, kann darauf geschlossen werden, dass ein abiotischer Abbau der Prüfsubstanz stattgefunden hat, was bei der Berechnung von D in Gleichung [2] zu berücksichtigen ist.

### Ansäuerung auf pH < 3

60. Nach Ansäuerung auf pH < 3 und Einstellung des Gleichgewichts kommt es zu einem Ausgleich zwischen der TIC-Konzentration in der Flüssigphase und der TIC-Konzentration in der Gasphase. Daher muss in diesem Fall nur die IC-Konzentration in der Gasphase bestimmt werden. Somit ist nach Gleichung [1]  $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$ , wobei V<sub>B</sub> das Volumen der Serumflasche ist.

### Umsetzung von CO<sub>2</sub> zu Carbonat

61. Bei diesem Verfahren werden die Berechnungen wie in Gleichung [1] beschrieben durchgeführt; der vernachlässigbar kleine IC-Gehalt in der Gasphase wird jedoch ignoriert, so dass  $V_H \times C_H = 0$  und  $TIC = V_L \times C_L$  ist.

### Angabe der Ergebnisse

62. Eine Abbaukurve durch Auftragen der prozentualen Abbaugrade (D) gegen die Inkubationszeit erstellen und, wenn möglich, lag-Phase, Abbauphase, 10-Tage-Fenster und Plateau-Phase (die Phase, in der der maximale Abbaugrad erreicht ist und die Abbaukurve abnimmt) kennzeichnen. Wenn in den parallelen F<sub>T</sub>-Prüfgefäßen vergleichbare Ergebnisse (< 20% Differenz) erzielt wurden, die Abbaukurve mit den Mittelwerten erstellen (siehe Anlage 2, Schaubild 1); andernfalls Abbaukurven für jedes Prüfgefäß erstellen. Den Mittelwert des prozentualen Abbaus in der Plateau-Phase bestimmen oder den höchsten Abbauwert verwenden (z. B. wenn die Abbaukurve in der Plateau-Phase abnimmt), wobei jedoch in letzterem Fall zu ermitteln ist, dass es sich dabei nicht um einen Ausreißer handelt. Diesen maximalen biologischen Abbauwert als „Abbaugrad der Prüfsubstanz“ im Prüfbericht angeben. Wenn die Anzahl der Prüfgefäße nicht ausreichte, um eine Plateau-Phase zu erstellen, werden die gemessenen Daten des letzten Prüftags verwendet und daraus ein Mittelwert gebildet. Mit letzterem Wert, der den Durchschnitt aus fünf Replikaten darstellt, wird die Genauigkeit



angegeben, mit der der prozentuale Abbau ermittelt wurde. Im Prüfbericht ist ebenfalls der am Ende des 10-Tage-Fensters erzielte Wert anzugeben.

63. Auf dieselbe Weise Abbaukurven für die Referenzsubstanz  $F_C$  und, sofern angesetzt, Kurven der abiotischen Eliminationskontrolle  $F_S$  und der Hemmkontrolle  $F_I$  erstellen.
64. Die Mengen an TIC, die in den Blindkontrollen ( $F_B$ ) und, sofern im Versuch enthalten, in den Gefäßen  $F_S$  (abiotische Kontrolle) gebildet wurden, angeben.
65.  $D$  für die  $F_I$ -Gefäße auf der Grundlage des erwarteten theoretischen IC-Ertrags, der nur aus der Referenzsubstanz der Mischung stammt, berechnen. Ist am 28. Tag  $[(D_{FC}^1 - D_{FI}^2)/D_{FC}] \times 100 > 25\%$ , so kann angenommen werden, dass die Aktivität des Inokulums durch die Prüfsubstanz gehemmt wurde, was ein Grund für die unter den Prüfbedingungen erzielten niedrigen  $D_{FI}$ -Werte sein kann. In diesem Fall kann der Versuch mit einer niedrigeren Prüfkonzentration wiederholt werden, wobei der DIC im Inokulum und der TIC in den Blindkontrollen möglichst reduziert werden sollte, da sich andernfalls durch die niedrigere Konzentration die Genauigkeit des Verfahrens verschlechtert. Alternativ kann ein anderes Inokulum verwendet werden. Wenn in den Gefäßen  $F_S$  (abiotische Kontrolle) eine deutliche TIC-Zunahme ( $> 10\%$ ) festgestellt wird, ist dies ein Hinweis auf mögliche abiotische Abbauprozesse.

### **Gültigkeit der Ergebnisse**

66. Der Test ist gültig, wenn
  - f) der mittlere prozentuale Abbaugrad der Referenzsubstanz in den Prüfgefäßen  $F_C$  am 14. Tag der Inkubation  $>60\%$  ist; und
  - g) die mittlere Menge an produziertem TIC in den Blindwertansätzen  $F_B$  am Ende des Tests  $>3\text{mg/l}$  Kohlenstoff beträgt.

Werden diese Grenzwerte nicht erreicht, so sollte der Versuch mit einem Inokulum aus einer anderen Quelle wiederholt werden und/oder die angewandten Verfahren sollten überarbeitet werden. Bereitet z. B. die starke IC-Produktion in den Blindwertansätzen Schwierigkeiten, so ist das unter den Nummern 27 bis 32 beschriebene Verfahren anzuwenden.

67. Erreicht die Prüfsubstanz nicht  $60\%$  des ThIC und wurde nachgewiesen, dass sie keine Hemmwirkung (Nummer 65) hat, so kann der Versuch mit einem höher konzentrierten Inokulum (bis zu  $30\text{ mg/l}$  Belebtschlamm und  $100\text{ ml}$  Ablauf/l) oder mit Inokuli aus anderen Quellen wiederholt werden; dies gilt insbesondere, wenn der Abbaugrad  $20$  bis  $60\%$  beträgt.

### **Auswertung der Ergebnisse**

68. Erreicht eine Prüfsubstanz bei diesem Versuch innerhalb des 10-Tage-Fensters einen Abbaugrad von  $> 60\%$  des ThIC, so ist dies ein Nachweis dafür, dass sie unter aeroben Bedingungen leicht abbaubar ist.

---

<sup>1</sup> Der prozentuale Abbau in den Gefäßen  $F_C$  mit der Referenzsubstanz.

<sup>2</sup> Der prozentuale Abbau in den Gefäßen  $F_I$ .

69. Wurde der Grenzwert von 60 % des ThIC nicht erreicht, so wird der pH-Wert des Mediums in den Flaschen gemessen, die nicht angesäuert oder alkalisiert wurden; ein Wert von weniger als 6,5 könnte darauf hinweisen, dass eine Nitrifikation stattgefunden hat. In diesem Fall den Versuch mit einer höher konzentrierten Pufferlösung wiederholen.

## **Prüfbericht**

70. Eine Tabelle mit dem prozentualen Abbau (D) jeder Prüfsubstanz ( $F_T$ ), Referenzkontrolle ( $F_C$ ) und, sofern diese durchgeführt wurde, Hemmkontrolle ( $F_I$ ) für jeden Probenahmetag erstellen. Werden vergleichbare Ergebnisse für die Replikatgefäße erzielt, so wird der durchschnittliche prozentuale Abbau (D) als Funktion der Zeit in einer Kurve dargestellt. Die Menge an TIC in den Blindkontrollen ( $F_B$ ) und in den sterilen Kontrollen ( $F_S$ ) sowie den DOC und/oder sonstige Analyten und ihren prozentualen Abbau angeben.
71. Den mittleren Abbaugrad (prozentualen Abbau) D während der Plateau-Phase oder den maximalen Abbaugrad (wenn die Abbaukurve in der Abbauphase abnimmt) bestimmen und als „Abbaugrad der Prüfsubstanz“ angeben. In letzterem Fall ist sicherzustellen, dass es sich bei dem Maximalwert nicht um einen Ausreißer handelt.
72. Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

### *Prüfsubstanz:*

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

### *Prüfbedingungen:*

- Hinweis auf diese Prüfmethode;
- Beschreibung des verwendeten Prüfsystems (z. B. Volumen des Prüfgefäßes, Verhältnis *Headspace* zu Flüssigphase, Rührmethode usw.);
- Applikation der Prüf- und Referenzsubstanz auf das Prüfsystem: verwendete Prüfkonzentration und Anteil an Kohlenstoff, der jeder Prüfflasche hinzugegeben wurde; etwaige Verwendung von Lösungsmitteln;
- Angaben zum Inokulum, evtl. Vorbehandlung und Vorkonditionierung;
- Inkubationstemperatur;
- Validierung des Prinzips der IC-Analyse;
- wesentliche Merkmale des verwendeten Kohlenstoffanalysators (und anderer verwendeter Analysemethoden);
- Anzahl der Replikate.

### *Ergebnisse:*

- Rohdaten und berechnete Werte der biologischen Abbaubarkeit in Tabellenform;
- die Kurve des prozentualen Abbaus, aufgetragen gegen die Zeit, für Prüf- und

Referenzsubstanz; Angabe von lag-Phase, Abbauphase, 10-Tage-Fenster und Steigung;

- prozentualer Abbau auf dem Plateau, zum Versuchsende und nach dem 10-Tage-Fenster;
- Angabe von Gründen, falls die Prüfergebnisse verworfen werden;
- weitere Faktoren, die für das Prüfverfahren von Bedeutung waren;
- Diskussion der Ergebnisse.

## LITERATUR

- (1) Kapitel C.4 dieses Anhangs, Biologische Abbaubarkeit — Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit: CO<sub>2</sub>-Entwicklungstest (Methode C.4-C).
- (2) Sturm R.N. (1973): Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. *J.A., Oil Chem Soc.* 50: 159-167.
- (3) Larson R.J. (1979): Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. *Appl Env. Microbiol.* 38: 1153-1161.
- (4) Larson R.J., Hansmann M.A. and Bookland E.A. (1996): Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, *Chemosphere* 33: 1195-1210.
- (5) ISO 9439 (1990; überarbeitet 1999): (Sturm). Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der vollständigen aeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe im wäßrigen Medium - Verfahren mit Kohlenstoffdioxid-Messung.
- (6) US EPA (1996): Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (7) US EPA (1996): Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (8) Gledhill W.E. (1975): Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. *Appl Microbiol.* 30: 922-929.
- (9) Weytjens D., Van Ginneken I. and Painter H.A. (1994): The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. *Chemosphere* 28: 801-812.
- (10) Ennis D.M. and Kramer A. (1975): A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. *J. Food Sci.* 40: 181-185.
- (11) Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzoccki P.H. and Bailey P.H. (1978). *Appl. Env. Microbiol.* 35: 51-53.
- (12) Boatman R.J., Cunningham S.L. and Ziegler D.A. (1986): A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, *Env. Toxicol. Chem.* 5: 233-243.

- (13) Struijs J. and Stoltenkamp J. (1990): Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. *Ecotox. Env. Safety* 19: 204-211.
- (14) Birch R.R. and Fletcher R.J. (1991): The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. *Chemosphere* 23: 507-524.
- (15) Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., and Bontinck W.J. (1989): Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19: 1527-1550.
- (16) ISO 14593, (1999) Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen im wässrigen Medium – Verfahren mittels Bestimmung des anorganischen Kohlenstoffs in geschlossenen Flaschen (CO<sub>2</sub>-*Headspace*-Test).
- (17) Battersby N.S. (1997): The ISO headspace CO<sub>2</sub> biodegradation test, *Chemosphere* 34: 1813-1822.
- (18) US EPA (1996): Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.
- (19) Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R. and Starkey M. (1999). An “inherent” biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* 38: 3219-3235.
- (20) Kapitel C.4 dieses Anhangs, Biologische Abbaubarkeit — Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit.
- (21) OECD (1988): OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Bericht des Vorsitzenden (M. Hashimoto; MITI) und Abschlussbericht (M. Kitano und M. Takatsuki; CITI). Paris.
- (22) Kapitel C.11 dieses Anhangs, Biologische Abbaubarkeit — Belebtschlamm: Prüfung der Atmungshemmung.
- (23) Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. and Dekkers A.L.M. (1995): A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. *Biodegradation* 6: 319-327.
- (24) EU (1999): Ring-test of the ISO Headspace CO<sub>2</sub> method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Bericht EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.
- (25) ISO 10634 (1996) Wasserbeschaffenheit – Anleitung für die Vorbereitung und Behandlung von in Wasser schwer löslichen

organischen Verbindungen für die nachfolgende Bestimmung ihrer biologischen Abbaubarkeit in einem wäßrigen Medium.

## Anlage 1

### ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN

**IC:** anorganischer Kohlenstoff.

**ThCO<sub>2</sub>:** theoretisches Kohlendioxid (mg) — Kohlendioxidmenge, die sich rechnerisch aus dem bekannten oder gemessenen Kohlenstoffgehalt der Prüfsubstanz bei vollständiger Mineralisation ergibt; auch angegeben als mg Kohlendioxidentwicklung pro mg Prüfsubstanz.

**DOC:** gelöster organischer Kohlenstoff — Menge an organischem Kohlenstoff, die in der Lösung vorliegt oder einen Filter mit 0,45 µm Porengröße passiert bzw. nach 15 Minuten Zentrifugieren bei 40 000 m/s<sup>-2</sup> (± 4000 g) im Überstand verbleibt.

**DIC:** gelöster anorganischer Kohlenstoff

**ThIC:** Theoretische Menge an anorganischem Kohlenstoff

**TIC:** Gesamter anorganischer Kohlenstoff

**Biologisch leicht abbaubar:** ein willkürlich festgelegter Begriff für eine Kategorie von chemischen Substanzen, die bestimmte Screening-Tests auf vollständige biologische Abbaubarkeit durchlaufen haben; diese Tests sind so stringent, dass angenommen wird, dass diese Substanzen im aquatischen Milieu unter aeroben Bedingungen schnell und vollständig biologisch abgebaut werden.

**10-Tage-Fenster:** der 10-Tage-Abschnitt, der unmittelbar auf das Erreichen von 10 % Abbau folgt.

**Inhärente biologische Abbaubarkeit:** Begriff für eine Kategorie von Substanzen, deren biologische Abbaubarkeit (primär oder vollständig) eindeutig in einem beliebigen Test auf biologische Abbaubarkeit nachgewiesen worden ist.

**Vollständiger aerober biologischer Abbau:** Abbaugrad der Prüfsubstanz, der nach vollständiger Zerlegung der Substanz durch Mikroorganismen zur Bildung von Kohlendioxid, Wasser, Mineralsalzen und neuen mikrobiellen Zellbestandteilen (Biomasse) führt.

**Mineralisation:** vollständiger Abbau einer organischen Verbindung zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O unter aeroben Bedingungen und zu CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O unter anaeroben Bedingungen.

**lag-Phase:** Zeitspanne zwischen dem Beginn eines Tests und dem Zeitpunkt, an dem die Akklimation und/oder Adaptation der abbauenden Mikroorganismen erreicht ist und der biologische Abbau einer Prüfsubstanz oder eines rein organischen Materials einen nachweisbaren Umfang angenommen hat (z. B. 10 % des maximalen theoretischen biologischen Abbaus bzw. je nach Genauigkeit des Messverfahrens auch weniger).

**Abbauphase:** Zeitspanne zwischen dem Ende der lag-Phase und dem Erreichen von 90 %

des maximalen Abbaugrades.

**Plateau-Phase:** die Phase, in der der maximale Abbaugrad erreicht ist und die Abbaukurve abnimmt.

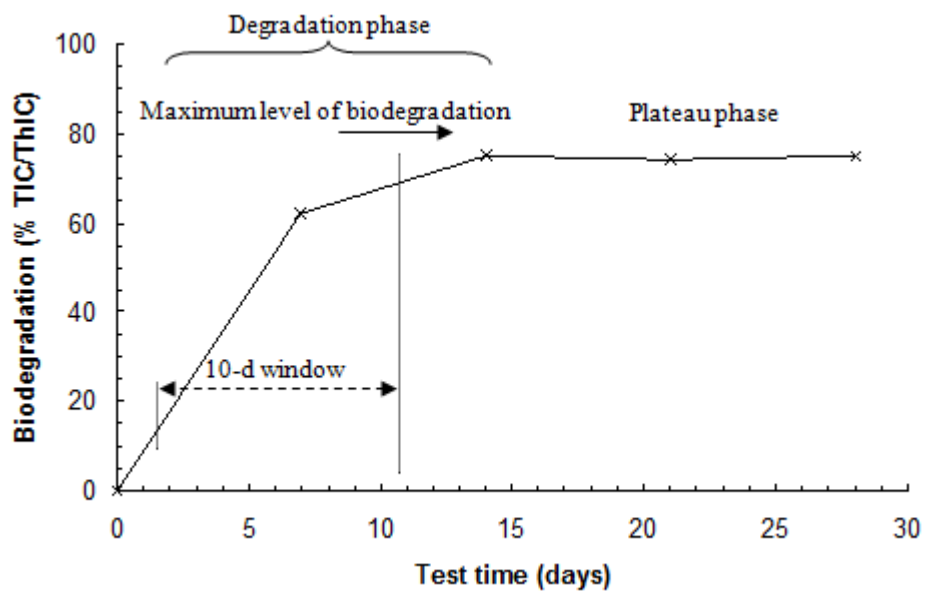
**Prüfsubstanz:** Jede Substanz oder jedes Gemisch, die/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.



## Anlage 2

### BEISPIEL EINER ABBAUKURVE

**Schaubild 1:** Bioabbau von Octan-1-ol im CO<sub>2</sub>-Headspace-Test



#### Glossar

Biodegradation: Abbaugrad

Degradation phase: Abbauphase

Maximum level of biodegradation: maximaler biologischer Abbaugrad

Plateau phase: Plateau-Phase

10-d(ay) window: 10-Tage-Fenster

Test time (days): Testdauer (Tage)

## C. 30. BIOAKKUMULATION IN TERRESTRISCHEN OLIGOCHAETEN

### EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 317 (2010). Zur Untersuchung des Verbleibs von Schadstoffen in der Umwelt liegen die Methode zur Bestimmung der „Biokonzentration: Durchfluss-Fischttest“ (Kapitel C.13 dieses Anhangs (49)) und die Methode zur Bestimmung der „Bioakkumulation in sedimentbewohnenden benthischen Oligochaeten“ (53) vor, die 1996 bzw. 2008 veröffentlicht wurden. Jedoch sind Rückschlüsse aus Daten über die aquatische Bioakkumulation auf die Reaktionen von Bodenorganismen wie Regenwürmern schwierig, wenn nicht gar unmöglich. Modellberechnungen auf der Grundlage der Lipophilie einer Prüfsubstanz, z. B. (14) und (37), werden derzeit zur Beurteilung der Bioakkumulation von chemischen Substanzen im Boden, wie z. B. im technischen Leitfaden der EU (Technical Guidance Document) (19), verwendet. Auf die Notwendigkeit einer kompartimentspezifischen Prüfmethode wurde bereits eingegangen, z. B. (55). Eine solche Methode ist vor allem für die Abschätzung der Sekundärvergiftung (*secondary poisoning*) in der terrestrischen Nahrungskette von Bedeutung (4). Mehrere nationale Prüfmethoden befassen sich mit der Bioakkumulation in anderen Organismen als Fischen, z. B. (2) und (72). So wurde eine Methode zur Bestimmung der Bioakkumulation aus kontaminierten Böden in Regenwürmern (*Eisenia fetida*, Savigny) und Topfwürmern von der *American Society for Testing and Materials* entwickelt (3). Eine international anerkannte Methode zur Bestimmung der Bioakkumulation in dotiertem Boden wird die Risikoanalyse für Chemikalien in terrestrischen Ökosystemen verbessern, z. B. (25) und (29).
2. Bodenfressende Invertebraten sind bodengebundenen chemischen Substanzen ausgesetzt. Unter diesen Tieren spielen terrestrische Oligochaeten eine wichtige Rolle für die Bodenstruktur und die Bodenfunktionen (15) (20). Terrestrische Oligochaeten leben im Boden und zum Teil an der Bodenoberfläche (insbesondere in der Streuschicht); ihrer Biomasse nach sind sie häufig die am stärksten vertretene Art (54). Durch Bioturbation des Bodens und als Beutetiere können diese Tiere einen erheblichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von chemischen Substanzen für andere Organismen wie Invertebraten (z. B. Raubmilben und Käfer; z. B. (64)) oder räuberische Vertebraten (z. B. Füchse und Möwen) (18) (62) haben. In Anlage 5 sind einige Arten von terrestrischen Oligochaeten beschrieben, die derzeit in ökotoxikologischen Untersuchungen verwendet werden.
3. Die ASTM-Richtlinie „Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus*“ (3) enthält zahlreiche wesentliche und nützliche Angaben für die Durchführung der vorliegenden Prüfmethode zur Bestimmung der Bioakkumulation im Boden. Weitere Dokumente, auf die in dieser Prüfmethode verwiesen wird, sind Kapitel C.13 dieses Anhangs „Biokonzentration: Durchfluss-Fischttest“ (49) und die OECD-Prüfrichtlinie (TG) 315 „Bioakkumulation in sedimentbewohnenden benthischen Oligochaeten“ (53). Praktische Erfahrungen mit der Untersuchung der Bioakkumulation im Boden und Veröffentlichungen aus der Literatur z. B. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79) sind ebenfalls wichtige

Informationsquellen für diese Prüfmethode.

4. Diese Prüfmethode wird am geeignetsten für stabile, neutrale organische Substanzen eingesetzt, die Tendenz haben, am Boden zu adsorbieren. Sie kann auch für die Testung der Bioakkumulation stabiler metallorganischer Verbindungen, die an den Boden gebunden sind, herangezogen werden. Ebenso eignet sie sich für Metalle und sonstige Spurenelemente.

## VORAUSSETZUNGEN

5. Untersuchungen zur Bestimmung der Bioakkumulation einer chemischen Substanz in terrestrischen Oligochaeten wurden mit Schwermetallen (siehe z. B. (63)) und persistenten, organischen Stoffen mit  $\log K_{ow}$ -Werten zwischen 3,0 und 6,0 durchgeführt, z. B. (40). Solche Tests können auch verwendet werden für
  - chemische Substanzen mit einem  $\log K_{ow}$ -Wert von  $> 6,0$  (superhydrophobe chemischen Substanzen);
  - chemische Substanzen, die zu einer Kategorie von organischen Chemikalien gehören, von denen bekannt ist, dass sie ein Potenzial zur Bioakkumulation in lebenden Organismen haben, z. B. oberflächenaktive Stoffe oder Stoffe mit hohem Adsorptionsvermögen;
  - chemische Substanzen mit Struktureigenschaften, die auf ein Bioakkumulationspotenzial hinweisen, z. B. Analoga von chemischen Substanzen mit bekanntem Bioakkumulationspotenzial, und
  - Metalle.
6. Vor Beginn der Studie müssen bestimmte Informationen zur Prüfsubstanz wie Common name, chemische Bezeichnung (vorzugsweise IUPAC-Name), Strukturformel, CAS-Nummer, Reinheitsgrad, Sicherheitshinweise, angemessene Lagerungsbedingungen und Analysemethoden vorliegen. Darüber hinaus sollten folgende Angaben bekannt sein:
  - a) Wasserlöslichkeit;
  - b) Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient,  $K_{ow}$ ;
  - c) Boden-Wasser-Verteilungskoeffizient, ausgedrückt als  $K_{oc}$ ;
  - d) Dampfdruck;
  - e) Abbaubarkeit (z. B. im Boden, Wasser);
  - f) bekannte Metaboliten.
7. Es können sowohl radioaktiv markierte als auch nicht radioaktiv markierte Prüfsubstanzen verwendet werden. Zur Erleichterung der Analyse wird jedoch die Verwendung von radioaktiv markierten Prüfsubstanzen empfohlen. Diese Wahl wird von den Nachweisgrenzen oder der Notwendigkeit abhängen, Ausgangssubstanzen und Metaboliten zu messen. Wird eine radioaktiv markierte Prüfsubstanz verwendet und werden die gesamten radioaktiven Rückstände bestimmt, so ist es wichtig, dass die radioaktiv markierten Rückstände sowohl im Boden als auch in den Testorganismen nach dem prozentualen Anteil der Ausgangsprüfsubstanz und der markierten Nichtausgangssubstanz gekennzeichnet sind, z. B. in Proben, die im *steady state* oder am Ende der Aufnahmephase genommen wurden, so dass ein Bioakkumulationsfaktor (BAF) für die Ausgangsprüfsubstanz und für die betreffenden Bodenmetaboliten (siehe

Nummer 50) berechnet werden kann. Möglicherweise muss die hier beschriebene Methode angepasst werden, z. B. um über eine ausreichende Biomasse für die Messung von nicht radioaktiv markierten organischen Prüfsubstanzen oder Metallen zu verfügen. Werden die gesamten radioaktiven Rückstände (durch Flüssigszintillationszählung nach Extrahieren, Verbrennung oder Gewebeauflösung) bestimmt, so basiert der Bioakkumulationsfaktor auf der Ausgangsprüfsubstanz und den Metaboliten. Die Berechnung des BAF sollte sich vorzugsweise auf die Konzentration der Ausgangsprüfsubstanz in den Organismen und auf die gesamten radioaktiven Rückstände stützen. Anschließend wird der nach dem Lipidgehalt der Würmer und dem Gehalt des Bodens an organischem Kohlenstoff normalisierte Biota-Boden-Akkumulationsfaktor (BSAF) anhand des BAF berechnet, um die Ergebnisse aus verschiedenen Bioakkumulationstests vergleichen zu können.

8. Die Toxizität der Prüfsubstanz gegenüber der Testspezies sollte bekannt sein, z. B. eine Effektkonzentration ( $EC_x$ ) oder letale Konzentration ( $LC_x$ ) für die Dauer der Aufnahme-Phase (z. B. (19)). Die ausgewählte Konzentration der Prüfsubstanz sollte möglichst ca. 1 % ihres akuten asymptotischen  $LC_{50}$ -Wertes entsprechen und mindestens zehnmals höher sein als die durch das angewandte analytische Verfahren vorgegebene Nachweisgrenze im Boden. Soweit verfügbar sollten bevorzugt Toxizitätswerte aus Langzeitstudien über subletale Endpunkte (51) (52) herangezogen werden. Sind solche Daten nicht verfügbar, kann ein akuter Toxizitätstest nützliche Informationen liefern (siehe z. B. (23)).
9. Eine geeignete Analysemethode von bekannter Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit sollte für die Quantifizierung der Prüfsubstanz in den Testlösungen, im Boden und im biologischen Material verfügbar sein ebenso wie Einzelheiten zur Probenvorbereitung und -aufbewahrung und Sicherheitsdatenblätter. Auch die analytischen Nachweisgrenzen der Prüfsubstanz im Boden und Wurmgewebe sollten bekannt sein. Wenn eine  $^{14}C$ -markierte Prüfsubstanz verwendet wird, sollten die spezifische Radioaktivität (d. h. Bq mol<sup>-1</sup>) und der prozentuale Anteil der mit Verunreinigungen einhergehenden Radioaktivität bekannt sein. Zur Erleichterung der Analyse sollte die spezifische Radioaktivität der Prüfsubstanz hoch genug sein; auch sollten die Prüfkonzentrationen keine toxischen Effekte verursachen.
10. Der Versuch kann mit Kunsterde oder mit natürlichem Boden durchgeführt werden. Die Merkmale des verwendeten Bodens, z. B. Herkunft des Bodens oder seiner Bestandteile, pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff, Korngrößenverteilung (Anteil an Sand, Schluff und Lehm) und Wasserhaltekapazität (WHC) sollten vor Testbeginn bekannt sein (3) (48).

## **PRINZIP DER PRÜFMETHODE**

11. Zu den charakteristischen Parametern der Bioakkumulation einer Prüfsubstanz gehören der Bioakkumulationsfaktor (BAF), die Aufnahmekonstante ( $k_s$ ) und die Eliminationskonstante ( $k_e$ ). Definitionen dieser Parameter sind in Anlage 1 enthalten.
12. Der Test besteht aus zwei Phasen: der Aufnahme-/Expositionsphase und der Eliminations-/Post-Expositionsphase. Während der Aufnahme-Phase werden Replikatgruppen von Würmern gegenüber dem mit der Prüfsubstanz dotierten Boden

exponiert. Neben diesen Testtieren werden Gruppen von Kontrollwürmern unter identischen Bedingungen, jedoch ohne Prüfsubstanz gehalten. Das Trockengewicht und der Lipidgehalt der Prüforganismen werden bestimmt. Hierzu können Würmer der Kontrollgruppe verwendet werden. Analytische Hintergrundwerte (Blindwerte) können durch die Analyse von Proben der Kontrollwürmer und –böden ermittelt werden. Für die Eliminationsphase werden die Würmer in einen Boden ohne Prüfsubstanz umgesetzt. Eine Eliminationsphase ist immer erforderlich, es sei denn, während der Expositionsphase wurden nur vernachlässigbare Mengen Prüfsubstanz aufgenommen. Sie liefert Informationen über die Geschwindigkeit, mit der die Prüfsubstanz durch die Testorganismen ausgeschieden wird (z. B. (27)). Wurde während der Aufnahme-Phase kein *steady state* erreicht, so sollte sich die Bestimmung der kinetischen Parameter - kinetischer Bioakkumulationsfaktor BAF<sub>k</sub>, Aufnahme- und Eliminationskonstante(n) - vorzugsweise auf die gleichzeitige Anpassung der Ergebnisse der Aufnahme-Phase und der Eliminationsphase stützen. Die Konzentration der Prüfsubstanz in/an den Würmern wird während der beiden Phasen durchgehend überwacht.

13. Während der Aufnahme-Phase werden über einen Zeitraum von 14 Tagen (Enchytraeen) bzw. 21 Tagen (Regenwürmer) Messungen vorgenommen, bis der *steady state* erreicht ist (11) (12) (67). Der *steady state* tritt ein, wenn die Kurve der gegen die Zeit aufgetragenen Konzentration im Wurm parallel zur Zeitachse verläuft und wenn drei aufeinander folgende Konzentrationsanalysen, die an Proben durchgeführt werden, die im Abstand von mindestens zwei Tagen genommen wurden, auf Basis von statistischen Vergleichen (z. B. Varianzanalyse, Regressionsanalyse) um nicht mehr als  $\pm 20\%$  voneinander abweichen.
14. In der Eliminationsphase werden die Testorganismen in Gefäße umgesetzt, die das gleiche Substrat aber keine Prüfsubstanz enthalten. Während der Eliminationsphase werden über einen Zeitraum von 14 Tagen (Enchytraeen) bzw. 21 Tagen (Regenwürmer) Messungen genommen, es sei denn, bei einer früheren analytischen Messung wurde eine 90%ige Abnahme der Prüfsubstanzrückstände in den Würmern festgestellt. Die Konzentration der Prüfsubstanz in den Würmern am Ende der Eliminationsphase wird als nicht eliminierte Rückstände im Bericht verzeichnet. Der *steady-state*-Bioakkumulationsfaktor (BAF<sub>ss</sub>) wird möglichst auf zweierlei Weise berechnet: zum einen als Verhältnis der Konzentration in den Würmern (C<sub>a</sub>) zur Konzentration im Boden (C<sub>s</sub>) bei sichtbarem *steady state* und zum anderen als ein kinetischer Bioakkumulationsfaktor, BAF<sub>k</sub>, d. h. als Verhältnis der Aufnahmekonstante im Boden (k<sub>s</sub>) zur Eliminationskonstanten (k<sub>e</sub>) (Definitionen siehe in Anlage 1), wobei von einer Kinetik 1. Ordnung ausgegangen wird (Berechnungen siehe in Anlage 2). Ist eine Kinetik 1. Ordnung eindeutig nicht anwendbar, so sind andere Modellgleichungen zu verwenden.
15. Die Aufnahmekonstante, die Eliminationskonstante (oder Konstanten, wenn andere Modelle verwendet werden), der kinetische Bioakkumulationsfaktor (BAF<sub>k</sub>) und, wenn möglich, die Konfidenzgrenzen eines jeden dieser Parameter werden anhand computergestützter Modellgleichungen berechnet (Anleitungen siehe Anlage 2). Die Anpassungsgüte eines Modells lässt sich z. B. anhand des Korrelationskoeffizienten oder Bestimmungskoeffizienten (Koeffizienten nahe an 1 deuten auf eine gute Anpassung hin) oder anhand der Chi-Quadrat-Verteilung feststellen. Auch kann die Größe des Standardfehlers oder die Konfidenzgrenze um die geschätzten Parameter

einen Hinweis auf die Anpassungsgüte des Modells geben.

16. Zur Verringerung der Variabilität der Testergebnisse für Prüfsubstanzen mit hoher Lipophilie sollten die Bioakkumulationsfaktoren im Verhältnis zum Lipidgehalt und zum Gehalt an organischem Kohlenstoff (kg organischer Kohlenstoff im Boden (OC) kg<sup>-1</sup> Lipidgehalt der Würmer) ausgedrückt werden. Dieses Konzept stützt sich auf die Tatsache, dass bei bestimmten Chemikalienklassen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Bioakkumulationspotenzial und der Lipophilie besteht, wie dies für Fische eindeutig festgestellt wurde (47). Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Lipidgehalt der Fische und der Bioakkumulation solcher Substanzen. Für benthische Organismen wurden ähnliche Korrelationen festgestellt, z. B. (30) (44). Auch für terrestrische Oligochaeten wurde diese Korrelation nachgewiesen, z. B. (5) (6) (7) (14). Wenn genügend Wurmgewebe zur Verfügung steht, kann der Lipidgehalt der Testtiere mit demselben biologischen Material bestimmt werden, das für die Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration verwendet wurde. Als Alternative können Kontrolltiere zur Bestimmung des Lipidgehalts verwendet werden.

## **GÜLTIGKEIT DES TESTS**

17. Der Test ist gültig, wenn sowohl die Kontrollgruppen als auch die Testgruppen folgende Kriterien erfüllen:
  - Am Ende des Tests beträgt die Gesamtmortalität während der Aufnahme- und der Eliminationsphase höchstens 10 % (Regenwürmer) oder 20 % (Enchytraeen) der Gesamtanzahl der eingesetzten Würmer.
  - Für *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* beträgt der mittlere Masseverlust am Ende der Aufnahme- und am Ende der Eliminationsphase nicht mehr als 20 % des anfänglichen Frischgewichts zu Beginn jeder Phase.

## **BESCHREIBUNG DER METHODE**

### **Testspezies**

18. Für Bioakkumulationstests werden mehrere Arten von terrestrischen Oligochaeten empfohlen. In Anlage 5 sind die am häufigsten verwendeten Arten beschrieben: *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* (Lumbricidae) sowie *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* und *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae).

### **Apparatur**

19. Die Verwendung von Materialien, die sich auflösen können, die Prüfsubstanz absorbieren oder andere chemischen Substanzen auslaugen bzw. schädigende Auswirkungen auf die Testtiere haben können, sollte für alle verwendeten Teile sorgfältigst vermieden werden. Es können rechteckige oder zylindrische Standardbehälter aus chemisch inertem Material, die ein dem Besatz (Anzahl der Testwürmer) entsprechendes Fassungsvermögen haben, verwendet werden. Geräte, die mit dem Prüfmedium in Berührung kommen, können aus rostfreiem Stahl, Kunststoff oder Glas sein. Die Gefäße sind so abzudecken, dass die Tiere nicht entweichen können,

aber für eine ausreichende Luftzufuhr gesorgt ist. Bei Substanzen mit hohen Adsorptionskoeffizienten, wie z. B. synthetischen Pyrethroiden, kann die Verwendung von silanisiertem Glas nötig sein. In solchen Fällen muss die Apparatur/Anlage nach der Benutzung entsorgt werden (49). Das Entweichen radioaktiv markierter Prüfsubstanzen und flüchtiger Substanzen ist zu vermeiden. Hierzu Abscheider (z. B. Gaswaschflaschen aus Glas) mit geeigneten Adsorbenssubstanzen verwenden, um etwaige Rückstände, die aus den Prüfgefäßen verdampfen könnten, aufzufangen.

## **Boden**

20. Die Qualität des Prüfbodens sollte so beschaffen sein, dass die Prüforganismen während der Akklimatisierungs- und Testphasen überleben und sich möglichst vermehren können, ohne ein abnormales Aussehen oder Verhalten zu zeigen. Die Würmer sollten sich in den Boden eingraben.
21. Als Substrat für die Versuche wird die in Kapitel C.8 dieses Anhangs (48) beschriebene Kunsterde empfohlen. Anlage 4 enthält eine Beschreibung der Zubereitung dieser Kunsterde und Empfehlungen für ihre Lagerung: Luftgetrockneter künstlicher Boden kann bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert werden.
22. Natürliche Böden von nicht unkontaminierten Standorten können jedoch auch als Prüf- und/oder Anzuchtsubstrat dienen. Zur Charakterisierung von natürlichen Böden sind zumindest Herkunft (Sammelstelle), pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff, Korngrößenverteilung (Anteil an Sand, Schluff und Lehm), maximale Wasserhaltekapazität ( $WHC_{max}$ ) und prozentualer Wassergehalt anzugeben (3). Eine vor Gebrauch durchgeführte Analyse des Bodens oder seiner Bestandteile auf Mikroschadstoffe dürfte nützliche Informationen liefern. Wird Feldboden von landwirtschaftlichen Nutzflächen verwendet, so darf der Boden vor der Probenahme mindestens ein Jahr lang nicht mit Pflanzenschutzmitteln behandelt oder mit Dung von behandelten Tieren und sechs Monate lang nicht mit organischen Düngemitteln gedüngt worden sein (50). Verfahren für die Handhabung von natürlichen Böden vor ihrer Verwendung in ökotoxikologischen Labortests mit Oligochaeten sind in (3) beschrieben. Natürliche Böden sollten im Labor so kurz wie möglich gelagert werden.

## **Applikation der Prüfsubstanz**

23. Die Prüfsubstanz wird in den Boden eingemischt. Dabei sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der jeweiligen Substanz zu berücksichtigen. Wasserlösliche Prüfsubstanzen sind vollständig in Wasser zu lösen, bevor sie mit dem Boden vermischt werden. Als Dotierungsverfahren für im Wasser schwer lösliche Prüfsubstanzen wird empfohlen, einen oder mehrere Bestandteile des (künstlichen) Bodens mit der Prüfsubstanz zu beschichten. So kann z. B. der Quarzsand (oder ein Teil davon) mit einer Lösung der Prüfsubstanz in einem geeigneten organischen Lösungsmittel durchtränkt werden; das Lösungsmittel wird anschließend durch Trocknen abgedampft. Die beschichtete Quarzsandfraktion wird sodann mit dem befeuchteten Boden vermischt. Wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens ist, dass kein Lösungsmittel in den Boden gelangt. Bei natürlichem Boden kann die Prüfsubstanz, wie bei der Kunsterde beschrieben, durch Dotieren eines luftgetrockneten Teils des Bodens oder durch Einrühren der Prüfsubstanz in den feuchten Boden mit anschließendem Abdampfen im Falle der Verwendung eines Lösungsmittels hinzugefügt werden. Im Allgemeinen ist

soweit wie möglich zu vermeiden, dass feuchter Boden mit den Lösungsmitteln in Berührung kommt. Folgendes ist zu bedenken (3):

- Wird ein anderes Lösungsmittel als Wasser verwendet, so sollte dieses mit Wasser mischbar sein und/oder vollständig eliminiert werden können (z. B. durch Abdampfen), so dass nur die Prüfsubstanz im Boden zurückbleibt.
  - Wird eine Kontrolle mit Lösungsmittel verwendet, so sind keine Negativkontrollen erforderlich. Die Lösungsmittelkontrolle sollte die höchste Konzentration des in den Boden gegebenen Lösungsmittels enthalten, und das verwendete Lösungsmittel sollte aus derselben Partie stammen, die für die Zubereitung der Stammlösung verwendet wurde. Hauptkriterien für die Wahl des geeigneten Lösungsvermittlers sollten die Toxizität und Flüchtigkeit des Lösungsmittels und die Löslichkeit der Prüfsubstanz in dem gewählten Lösungsmittel sein.
24. Ist die Prüfsubstanz in Wasser und in organischen Lösungsmitteln nur schwer löslich, können mit Hilfe eines Mörsers pro Prüfgefäß 2,0 bis 2,5 g fein gemahlener Quarzsand mit der Menge Prüfsubstanz vermischt werden, die erforderlich ist, um die gewünschte Prüfkonzentration zu erhalten. Diese Mischung aus Quarzsand und Prüfsubstanz wird zum angefeuchteten Boden hinzugegeben und mit einer entsprechenden Menge entionisierten Wassers gründlich gemischt, um den gewünschten Feuchtegehalt zu erhalten. Die endgültige Mischung wird auf die Prüfgefäße verteilt. Das Verfahren wird für jede Prüfkonzentration wiederholt, und zusätzlich wird eine geeignete Kontrollgruppe mit 2,0 bis 2,5 g fein gemahlenem Quarzsand pro Prüfgefäß angesetzt.
25. Die Konzentration der Prüfsubstanz im Boden ist nach dem Dotieren zu bestimmen. Bevor die Testorganismen eingesetzt werden, ist die homogene Verteilung der Prüfsubstanz im Boden zu überprüfen. Das Dotierungsverfahren und die Gründe für die Wahl des Verfahrens werden im Protokoll erfasst (24).
26. Die Einstellung des Gleichgewichts zwischen Boden und Porenwasserphase sollte idealerweise noch vor dem Einsetzen der Organismen stattfinden; hierzu wird ein Zeitraum von 4 Tagen bei 20 °C empfohlen. Für viele im Wasser schwer lösliche organische Substanzen kann es Tage oder Monate dauern, bis zwischen den adsorbierten und gelösten Fraktionen ein echtes Gleichgewicht erreicht ist. Je nach Zweck der Studie, z. B. wenn die Umweltbedingungen simuliert werden sollen, kann der dotierte Boden über längere Zeit "gealtert" werden (z. B. 3 Wochen bei 20°C für Metalle) (22).

### **Anzucht der Testorganismen**

27. Die Würmer sind vorzugsweise in dauerhafter Laborkultur zu halten. Leitlinien für die Anzucht von *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* sowie von Enchytraeen-Arten unter Laborbedingungen sind in Anlage 5 enthalten (siehe auch (48) (51) (52)).
28. Die im Test verwendeten Würmer sollten frei von sichtbaren Erkrankungen, Abnormalitäten und Parasiten sein.

### **PRÜFVERFAHREN**

29. Die Testorganismen werden während der Aufnahmeperiode gegenüber der Prüfsubstanz



exponiert: Die Aufnahmephase sollte 14 Tage (Enchytraeen) oder 21 Tage (Regenwürmer) dauern, bis nachgewiesen wird, dass ein *steady state* erreicht ist.

30. Für die Eliminationsphase werden die Würmer in einen prüfsubstanzfreien Boden umgesetzt. Die erste Probe sollte 4 bis 24 Std. nach Beginn der Eliminationsphase genommen werden. Anlage 3 enthält Beispiele von Probenahmeplänen für eine Aufnahmephase und eine Eliminationsphase von jeweils 21 Tagen.

## Testorganismen

31. Bei vielen Arten der terrestrischen Enchytraeen ist das Einzelgewicht sehr niedrig (z. B. 5 bis 10 mg Feuchtgewicht je Individuum *Enchytraeus albidus* und weniger für *Enchytraeus crypticus* und *Enchytraeus luxuriosus*). Um Gewichtsbestimmungen und chemische Analysen vorzunehmen, kann es erforderlich sein, die Würmer der Replikatgefäße zu poolen (d. h. alle Würmer eines Replikatgefäßes werden verwendet, um ein analytisches Messergebnis für das Gewebe zu erhalten). 20 einzelne Enchytraeen werden in jedes Replikatgefäß gegeben, und es werden mindestens drei Replikate verwendet. Bei Prüfsubstanzen mit einer hohen analytischen Nachweisgrenze sind möglicherweise mehr Würmer erforderlich. Für Testspezies mit höherem Einzelgewicht (*Eisenia fetida* und *Eisenia andrei*) können Replikatgefäße mit nur einem Individuum verwendet werden.
32. Die jeweils für einen Versuch verwendeten Würmer sollten ein ähnliches Gewicht haben (z. B. *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* sollten jeweils 250 bis 600 mg wiegen). Enchytraeen (z. B. *Enchytraeus albidus*) sollten ca. 1 cm lang sein. Alle für einen bestimmten Versuch verwendeten Würmer sollten aus derselben Quelle stammen und adulte Tiere mit einem Clitellum sein (siehe Anlage 5). Da sich Gewicht und Alter der Tiere auf die BAF-Werte auswirken können (z. B. aufgrund des unterschiedlichen Lipidgehalts und/oder des Vorhandenseins von Eiern), sollten diese Parameter sorgfältig aufgezeichnet und bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Darüber hinaus kann es während der Exposition zur Ablage von Kokons kommen, was sich auch auf die BAF-Werte auswirken wird. Es wird empfohlen, eine Teilprobe der Testwürmer vor dem Test zu wiegen, um das mittlere Feucht- und Trockengewicht zu schätzen.
33. Um die Abnahme der Prüfsubstanzkonzentration im Boden während der Aufnahmephase möglichst gering zu halten, ist ein hohes Boden-Wurm-Verhältnis vorzusehen. Für *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* wird eine Mindestmenge von 50 g Trockengewicht (TG) Boden je Wurm und für Enchytraeen eine Mindestmenge von 10 bis 20 g (TG) Boden je Prüfgefäß empfohlen. Die Bodenschicht in den Prüfgefäßen sollte 2 bis 3 cm (Enchytraeen) bzw. 4 bis 5 cm (Regenwürmer) dick sein.
34. Die für einen Versuch benötigten Würmer werden aus der Kultur entnommen (z. B. Enchytraeen mit einer Juwelierpinzette). Adulte Tiere werden zur Akklimatisierung in einen unbehandelten Prüfboden umgesetzt und gefüttert (siehe Nummer 36). Weichen die Prüfbedingungen von den Anzuchtbedingungen ab, dürfte eine Akklimatisierungsphase von 24 bis 72 Std. ausreichen, damit die Würmer sich an die Prüfbedingungen gewöhnen können. Nach der Akklimatisierung werden die Regenwürmer zum Spülen in Glasschalen (z. B. Petrischalen) mit sauberem Wasser umgesetzt und anschließend gewogen, bevor sie in den Prüfboden gegeben werden. Vor dem Wiegen ist das an den Würmern anhaftende Wasser durch leichtes Abtupfen am

Rand der Schale oder durch vorsichtiges Trockentupfen mit einem leicht angefeuchteten Papiertuch zu entfernen.

35. Das Eingrabungsverhalten der Testorganismen ist zu beobachten und aufzuzeichnen. Bei Tests mit Regenwürmern graben sich die Tiere (Kontroll- und Testgruppe) in der Regel innerhalb von ein paar Stunden in den Boden ein; dies sollte spätestens 24 Std. nach dem Einsetzen der Würmer in die Prüfgefäße überprüft werden. Graben sich die Regenwürmer nicht in den Boden ein (z. B. über 10 % während mehr als der Hälfte der Aufnahmephase), so deutet dies darauf hin, dass die Prüfbedingungen nicht angemessen oder die Testorganismen nicht gesund sind. In diesem Fall muss der Test gestoppt und wiederholt werden. Enchytraeen leben hauptsächlich im Porenwasser des Bodens, und häufig kommt ihr Integument nur zum Teil mit dem umgebenden Substrat in Kontakt; es wird davon ausgegangen, dass grabende und nichtgrabende Enchytraeen in gleichem Maße exponiert sind, und ein Nichteingraben der Enchytraeen erfordert nicht unbedingt eine Wiederholung des Tests.

### **Fütterung**

36. Wenn ein Boden mit niedrigem Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff verwendet wird, dann sollte gefüttert werden. Bei der Verwendung von Kunsterde wird ein wöchentlicher Fütterrhythmus empfohlen (d. h. die Würmer werden einmal pro Woche gefüttert). Für Regenwürmer werden wöchentlich 7 mg getrockneter Dung pro g Boden (TG) und für Enchytraeen wöchentlich 2 bis 2,5 mg gemahlene Haferflocken pro g Boden (TG) empfohlen (11). Die erste Futtermahlung sollte mit dem Boden unmittelbar vor dem Einsetzen der Testorganismen vermischt werden. Es sollte möglichst dieselbe Art Futter wie für die Aufzucht (siehe Anlage 5) verwendet werden.

### **Licht und Temperatur**

37. Die Tests sind bei einem geregelten Licht-Dunkel-Zyklus von 16 zu 8 Std., bei einer Lichtstärke von vorzugsweise 400 bis 800 lx im Bereich der Prüfgefäße (3) durchzuführen. Die Prüftemperatur sollte während des gesamten Test  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  betragen.

### **Prüfkonzentrationen**

38. Es wird eine einzige Konzentration verwendet. Situationen, in denen zusätzliche Konzentration(en) erforderlich ist/sind, müssen begründet werden. Liegt die Toxizität ( $\text{EC}_x$ ) der Prüfsubstanz nahe an der analytischen Nachweisgrenze, wird empfohlen, radioaktiv markierte Prüfsubstanzen mit hoher spezifischer Radioaktivität zu verwenden. Für Metalle sollte die Konzentration über den Hintergrundwerten in Gewebe und Boden liegen.

### **Replikate**

39. Für die kinetischen Messungen (Aufnahme- und Eliminationsphase) sind pro Messpunkt mindestens drei behandelte Replikatgefäße vorzusehen. Die Gesamtzahl der vorbereiteten Replikate muss ausreichen, um alle Messpunkte während der Aufnahme- und Eliminationsphase abzudecken.

40. Für die biologischen Beobachtungen und Messungen (z. B. Verhältnis Trocken- und Feuchtgewicht, Lipidgehalt) und für die Analyse der Hintergrundkonzentrationen in den Würmern und im Boden sind mindestens 12 Replikatgefäße einer Negativkontrolle (jeweils vier Probenahmen zu Beginn und am Ende der Aufnahmephase und vier Probenahmen am Ende der Eliminationsphase) bereitzustellen, wenn kein anderes Lösungsmittel als Wasser verwendet wird. Wurde für die Applikation der Prüfsubstanz ein Lösungsvermittler verwendet, muss neben den behandelten Replikaten eine Lösungsmittelkontrolle (jeweils vier Replikatgefäße sind zu Beginn und am Ende der Aufnahmephase sowie vier am Ende der Eliminationsphase zu beproben) durchgeführt werden, für die mit Ausnahme der Prüfsubstanz alle Bestandteile zu verwenden sind. In diesem Fall können auch vier zusätzliche Replikatgefäße einer Negativkontrolle (kein Lösungsmittel) für eine fakultative Probenahme am Ende der Aufnahmephase vorgesehen werden. Diese Replikate können biologisch mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen werden, um Informationen über einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels auf den Testorganismus zu erhalten. Es wird empfohlen, eine ausreichende Anzahl an Replikatgefäßen (z. B. 8) als zusätzliche Reserve für Test- und Kontrollgruppen anzusetzen.

### **Häufigkeit der Bodenqualitätsmessungen**

41. Zu Beginn und am Ende der Aufnahmephase und der Eliminationsphase werden der pH-Wert und der Feuchtegehalt des Bodens sowie (kontinuierlich) die Temperatur in der Prüfkammer bestimmt. Einmal pro Woche sollte der Feuchtegehalt des Bodens durch Wiegen der Prüfgefäße und Vergleich ihres Gewichts zum Zeitpunkt der Kontrolle mit ihrem Gewicht zu Testbeginn überprüft werden. Wasserverluste sollten durch Zugabe von entionisiertem Wasser ausgeglichen werden.

### **Probenahme und Analyse der Wurm- und Bodenproben**

42. Anlage 3 enthält ein Beispiel eines Probenahmeplans für die Testung der Bioakkumulation mit Regenwürmern und Enchytraeen.
43. Vor dem Einsetzen der Würmer sowie während der Aufnahmephase und der Eliminationsphase wird den Prüfgefäßen Boden zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration entnommen. Während des Tests werden die Konzentrationen der Prüfsubstanz in den Würmern und im Boden bestimmt. In der Regel werden die Gesamtkonzentrationen im Boden gemessen. Es können auch die Konzentrationen im Porenwasser bestimmt werden; in diesem Fall sind vor Beginn der Studie eine Begründung für diesen Entschluss und geeignete Methoden anzugeben, die ebenfalls in den Bericht aufgenommen werden.
44. Während der Aufnahmephase und der Eliminationsphase werden jeweils mindestens sechs Mal Proben entnommen. Ist eine Prüfsubstanz nachweislich stabil, so kann die Zahl der Bodenproben reduziert werden. Es wird empfohlen, zu Beginn und am Ende der Aufnahmephase mindestens drei Replikate zu analysieren. Weicht die am Ende der Aufnahmephase bestimmte Konzentration im Boden um mehr als 30 % von der Ausgangskonzentration ab, so sollten die zu anderen Zeitpunkten genommenen Bodenproben ebenfalls analysiert werden.
45. Die Würmer eines bestimmten Replikatgefäßes werden an jedem Messzeitpunkt aus

dem Boden entnommen (z. B. indem der Boden des Replikats auf eine flache Schale verteilt wird und die Würmer mit einer abgerundeten Juwelierpinzette ausgelesen werden) und anschließend kurz in einer flachen Schale aus Glas oder Stahl mit Wasser gespült. Anhaftendes Wasser entfernen (siehe Nummer 34). Die Würmer vorsichtig in ein vorgewogenes Gefäß geben und sofort samt Darminhalt wiegen.

46. Die Regenwürmer (*Eisenia* sp.) sollten dann über Nacht ihren Darm entleeren, z. B. auf einem angefeuchteten Filterpapier in einer abgedeckten Petrischale (siehe Nummer 34). Nach der Darmentleerung ist das Gewicht der Würmer zu bestimmen, um die eventuelle Abnahme der Biomasse während des Tests zu beurteilen (siehe Validitätskriterien unter Nummer 17). Wiegen und Gewebsanalyse der Enchytraeen erfolgen ohne vorherige Darmentleerung, da dies aus technischer Sicht angesichts der geringen Größe dieser Würmer schwierig ist. Nachdem das Endgewicht bestimmt wurde, werden die Würmer anhand der am besten geeigneten Methode sofort abgetötet (z. B. mit Flüssigstickstoff oder durch Einfrieren bei Temperaturen unter  $-18\text{ °C}$ ).
47. Während der Eliminationsphase ersetzen die Würmer kontaminierten Darminhalt durch sauberen Boden. Dies bedeutet, dass bei unmittelbar vor der Eliminationsphase entnommenen Proben von Würmern, die ihren Darm nicht entleert haben (in diesem Fall Enchytraeen), der Darm verunreinigten Boden enthält. Bei aquatischen Oligochaeten wird davon ausgegangen, dass nach den ersten 4 bis 24 Std. der Eliminationsphase der Großteil des verunreinigten Darminhalts durch sauberes Sediment ersetzt wurde, z. B. (46). In Studien über die Akkumulation von radioaktiv markiertem Cadmium und Zink wurden vergleichbare Feststellungen für Regenwürmer gemeldet (78). Bei Enchytraeen mit Darminhalt kann die Konzentration dieser ersten Probe der Eliminationsphase als die Konzentration im Gewebe nach Darmentleerung angesehen werden. Um der Verdünnung der Prüfsubstanzkonzentration durch unkontaminierten Boden während der Eliminationsphase Rechnung zu tragen, kann das Gewicht des Darminhalts auf Basis des Verhältnisses Nassgewicht/Aschegewicht des Wurms oder des Verhältnisses Trockengewicht/Aschegewicht des Wurms geschätzt werden.
48. Die Analyse der Boden- und Wurmproben sollte vorzugsweise direkt nach der Probenahme (d. h. innerhalb von 1 bis 2 Tagen) erfolgen, um einen Abbau oder sonstige Verluste zu vermeiden; es wird empfohlen, die ungefähren Aufnahme- und Eliminationsraten zu ermitteln, während der Versuch fortgesetzt wird. Verzögert sich die Analyse, so sind die Proben auf geeignete Weise zu lagern, z. B. durch Tiefgefrieren ( $\leq -18\text{ °C}$ ).
49. Es sollte überprüft werden, ob die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der chemischen Analyse sowie die Wiederfindung der Prüfsubstanz aus Boden- und Wurmproben für die betreffende Methode geeignet sind; die Effizienz der Extraktion, die Nachweisgrenze („limit of detection; LOD“) und die Quantifizierungsgrenze („limit of quantification; LOQ“) sollten im Bericht erfasst werden. Auch ist zu kontrollieren, ob die Prüfsubstanz in den Kontrollgefäßen nicht in Konzentrationen feststellbar ist, die über der Hintergrundkonzentration liegen. Wenn die Konzentration der Prüfsubstanz im Testorganismus Ca für die Kontrollwürmer  $> 0$  ist, sollte dies bei der Berechnung der kinetischen Parameter berücksichtigt werden (siehe Anlage 2). Alle Proben sollten während des Tests stets so behandelt werden, dass Verunreinigungen und Verluste (z. B. infolge von Adsorption der Prüfsubstanz durch das Probenahmegerät) auf ein

Mindestmaß beschränkt werden.

50. Werden radioaktiv markierte Prüfsubstanzen verwendet, so können Ausgangssubstanz und Metaboliten analysiert werden. Eine Quantifizierung der Ausgangsprüfsubstanz und der Metaboliten im *steady state* oder am Ende der Aufnahmephase liefert wichtige Informationen. Die Proben sollten dann „gereinigt“ werden, damit die Ausgangsprüfsubstanz separat quantifiziert werden kann. Wenn einzelne Metaboliten mehr als 10 % der gesamten Radioaktivität in den analysierten Proben ausmachen, sollten diese Metaboliten identifiziert werden.
51. Die Gesamtwiederfindungsrate und die Wiederfindung der Prüfsubstanz in Würmern, Boden und gegebenenfalls Abscheidern mit Adsorbersubstanzen, die eingesetzt wurden, um verdampfende Prüfsubstanz aufzufangen, müssen registriert und im Protokoll erfasst werden.
52. Für Enchytraeen, die kleiner sind als Regenwürmer, ist es zulässig, die beprobten Individuen aus einem bestimmten Prüfgefäß zu poolen. Verringert sich durch das Pooling die Zahl der Replikate, so wird hierdurch die Zahl der statistischen Verfahren eingeschränkt, die auf die Daten anwendbar sind. Wird auf ein spezielles statistisches Verfahren bzw. eine bestimmte statistische Aussagekraft Wert gelegt, so muss der Test unter Berücksichtigung des Pooling, des Verfahrens und der gewünschten Aussagekraft eine angemessene Anzahl an Replikatgefäßen umfassen.
53. Der BAF sollte sowohl im Verhältnis zum gesamten Trockengewicht als auch, falls erforderlich (bei hochlipophilen Substanzen) im Verhältnis zum Lipidgehalt ausgedrückt werden. Zur Bestimmung des Lipidgehalts sollten geeignete Methoden verwendet werden (zu diesem Zweck sollten einige bestehende Methoden – z. B. (31) (58) – angepasst werden). Bei diesen Methoden wird ein Chloroform/Methanol-Extraktionsverfahren eingesetzt. Um die Verwendung von gechlorten Lösungsmitteln zu vermeiden, sollte jedoch eine angepasste Version der Methode von Bligh and Dyer (9), wie in (17) beschrieben, verwendet werden. Da die verschiedenen Methoden möglicherweise zu unterschiedlichen Werten führen, ist es wichtig, Einzelheiten über die verwendete Methode anzugeben. Wenn möglich, d. h. wenn genügend Wurmgewebe verfügbar ist, sollte die Lipidanalyse idealerweise an derselben Probe oder demselben Extrakt vorgenommen werden, das für die Analyse der Prüfsubstanz verwendet wurde, da die Lipide häufig erst aus dem Extrakt entfernt werden müssen, bevor dieses chromatografisch analysiert werden kann (49). Als Alternative können die Kontrolltiere verwendet werden, um den Lipidgehalt zu bestimmen, der dann herangezogen werden kann, um die BAF-Werte zu normalisieren. Mit letztgenanntem Konzept lässt sich die Verunreinigung der Geräte durch die Prüfsubstanz reduzieren.

## **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

### **Auswertung der Ergebnisse**

54. Die Aufnahmekurve der Prüfsubstanz ergibt sich, indem ihre Konzentration in/auf den Würmern in der Aufnahmephase gegen die Zeit auf einer arithmetischen Skala aufgetragen wird. Wenn die Kurve ein Plateau oder den *steady state* (siehe Definitionen in Anlage 1) erreicht hat, wird der *steady-state*-Bioakkumulationsfaktor  $BAF_{ss}$  wie folgt

errechnet:

$$\frac{C_a \text{ bei } steady \text{ state oder am Ende der Aufnahme phase (Durchschnitt)}}{C_s \text{ bei } steady \text{ state oder am Ende der Aufnahme phase (Durchschnitt)}}$$

Dabei sind:

- $C_a$  = die Konzentration der Prüfsubstanz im Testorganismus
- $C_s$  = die Konzentration der Prüfsubstanz im Boden

55. Wird kein *steady state* erreicht, sollte der auf den Konstanten basierende  $BAF_K$  anstelle des  $BAF_{ss}$  wie nachstehend beschrieben bestimmt werden:

- Bestimmung des Akkumulationsfaktors ( $BAF_K$ ) als Quotient  $k_s/k_e$ .
- Aufnahme- und Eliminationskonstante möglichst gleichzeitig berechnen (siehe Gleichung 11 in Anlage 2)
- Die Eliminationskonstante ( $k_e$ ) wird in der Regel aus der Eliminationskurve abgeleitet (d. h. einer graphischen Darstellung der Prüfsubstanzkonzentration in den Würmern während der Eliminationsphase). Die Aufnahmekonstante  $k_s$  wird dann anhand des gegebenen Wertes  $k_e$  und einem  $C_a$ -Wert berechnet, der sich aus der Aufnahmekurve ableitet. Siehe Beschreibung dieser Methoden in Anlage 2. Die bevorzugte Methode zur Berechnung des  $BAF_K$  und der Konstanten  $k_s$  und  $k_e$  ist eine computergestützte nichtlineare Parameterschätzung. Wenn die Ausscheidungskurve offensichtlich nicht erster Ordnung ist, sollten komplexere Modelle herangezogen werden.

## Prüfbericht

56. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

### *Prüfsubstanz:*

- Etwaige verfügbare Angaben zur akuten oder chronischen Toxizität (z. B.  $EC_x$ ,  $LC_x$ , NOEC) der Prüfsubstanz gegenüber bodenbewohnenden Oligochaeten;
- Reinheit, physikalischer Zustand und gegebenenfalls physikalisch-chemische Eigenschaften, z. B.  $\log K_{ow}$ , Wasserlöslichkeit;
- chemische Kenndaten; Herkunft der Prüfsubstanz, Bezeichnung und Konzentration der verwendeten Lösungsmittel;
- bei radioaktiv markierten Prüfsubstanzen: die genaue Position des markierten Atoms (der Atome), die spezifische Radioaktivität und die radiochemische Reinheit.

### *Testspezies:*

- wissenschaftlicher Name, Stamm, Bezugsquelle, eventuelle Vorbehandlungen, Akklimatisation, Alter, Größenbereich usw.

### *Prüfbedingungen:*

- angewandtes Prüfverfahren;

- Art und Eigenschaften der verwendeten Beleuchtung und Photoperiode(n);
- Versuchsaufbau (z. B. Anzahl und Größe der Prüfgefäße, Bodenmasse und Füllhöhe der Bodenschicht, Anzahl der Replikate, Anzahl der Würmer pro Replikat, Anzahl der Prüfkonzentrationen, Dauer der Aufnahme- und Eliminationsphase, Häufigkeit der Probenahmen);
- Begründung für die Wahl des Materials der Prüfgefäße;
- Methode für die Vorbereitung des Prüfgegenstands und Applikationsmethode sowie Begründung der Wahl einer bestimmten Methode;
- die nominellen Prüfkonzentrationen, der Durchschnitt der gemessenen Werte sowie deren Standardabweichungen in den Prüfgefäßen sowie das Verfahren, durch das diese Werte ermittelt wurden;
- Quelle der Bestandteile des künstlichen Bodens oder - wenn ein natürliches Medium verwendet wird – Herkunft des Bodens, Beschreibung etwaiger Vorbehandlungen, Ergebnisse der Kontrollen (Überlebensrate, Entwicklung der Biomasse, Reproduktion), Bodenmerkmale (pH-Wert, Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff, Korngrößenverteilung (Anteil an Sand, Schluff und Lehm), WHC<sub>max</sub>, Wassergehalt zu Beginn und am Ende des Versuchs und sonstige vorgenommene Messungen);
- Angaben zur Behandlung der Boden- und Wurmproben, einschließlich aller Einzelheiten über Vorbereitung, Lagerung, Dotierungsverfahren, Extraktion, und zu Analyseverfahren (und -genauigkeit) in Bezug auf die Prüfsubstanz in Würmern und Boden sowie zum Lipidgehalt (falls gemessen) und Wiederauffindungsraten des Prüfgegenstands.

#### *Ergebnisse:*

- Mortalität der Kontrollwürmer und der Würmer in den einzelnen Prüfgefäßen sowie jegliches beobachtetes anomales Verhalten (z. B. Vermeidung des Bodens, fehlende Reproduktion bei einem Bioakkumulationstest mit Enchytraeen);
- Verhältnis zwischen Trockengewicht und Frischgewicht im Boden und in den Testorganismen (nützlich für die Normalisierung);
- das Feuchtgewicht der Würmer bei jeder Probenahme; für Regenwürmer das Feuchtgewicht zu Beginn des Versuchs und bei jeder Probenahme vor und nach der Darmentleerung;
- der Lipidgehalt der Testorganismen (falls in der Prüfung ermittelt);
- Kurven der Aufnahme- und Eliminationskinetiken der Prüfsubstanz in den Würmern und die Zeit bis zur Einstellung des *steady state*;
- C<sub>a</sub> und C<sub>s</sub> (gegebenenfalls mit Standardabweichung und Abweichungsbereich) für alle Probenahmen (wobei C<sub>a</sub> in g kg<sup>-1</sup> Feucht- und Trockengewicht des Ganzkörpers und C<sub>s</sub> in g kg<sup>-1</sup> Feucht- und Trockengewicht des Bodens ausgedrückt wird). Wird der Biota-Boden-Akkumulationsfaktor (BSAF) benötigt (z. B. für den Vergleich der Ergebnisse von zwei oder mehreren Tests, die mit Tieren mit unterschiedlichem Lipidgehalt durchgeführt wurden), so können C<sub>a</sub> zusätzlich als g kg<sup>-1</sup> Lipidgehalt des Organismus und C<sub>s</sub> als g kg<sup>-1</sup> organischer Kohlenstoff (OC) des Bodens ausgedrückt werden;

- BAF (ausgedrückt in  $\text{kg Boden} \cdot \text{kg}^{-1} \text{Wurm}$ ), Boden-Aufnahmekonstante  $k_s$  (ausgedrückt in  $\text{g Boden kg}^{-1} \text{Wurm d}^{-1}$ ) und Eliminationskonstante  $k_e$  (ausgedrückt in  $\text{d}^{-1}$ ); BSAF (ausgedrückt in  $\text{kg Boden organischer Kohlenstoff kg}^{-1} \text{Lipidgehalt des Wurms}$ ) kann zusätzlich angegeben werden;
- falls gemessen: Gehalt an Ausgangssubstanz, Metaboliten und gebundenen Rückständen (d. h. Gehalt an Prüfsubstanz, die sich nicht mit gewöhnlichen Extraktionsmethoden extrahieren lässt) im Boden und in den Testtieren;
- Methoden zur statistischen Datenanalyse.

*Auswertung der Ergebnisse:*

- Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Validitätskriterien gemäß in Nummer 17;
- unerwartete oder ungewöhnliche Ergebnisse, z. B. unvollständige Elimination der Prüfsubstanz durch die Testtiere.



## LITERATUR

- (1) Amorim M. (2000): Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane ( $\gamma$ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Master thesis, Universidade de Coimbra.
- (2) ASTM (2000): Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.
- (3) ASTM International (2004): Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 ff.
- (4) Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000): The assessment of bioaccumulation. In: Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (5) Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994): The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem., 13: 93-99.
- (6) Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. & Hermens J. (1993): The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety, 25: 154-165.
- (7) Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995): Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.
- (8) Bell A.W. (1958): The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.
- (9) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.
- (10) Bouche M. (1972): Lombriciens de France. Écologie et Systématique. INRA, Annales de Zoologie-Écologie animale, Paris, 671 p.
- (11) Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a): Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Bericht an das Umweltbundesamt Berlin, FuE-Nr.: 298 64 416.

- (12) Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b): Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). *Hydrobiologia* 463: 185-196.
- (13) Conder J.M. and Lanno R.P. (2003): Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. *J. Soils Sediments* 3: 13-20.
- (14) Connell D.W. and Markwell R.D. (1990): Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91-100.
- (15) Didden W.A.M. (1993): Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2-29.
- (16) Didden W.A.M. (2003): Oligochaeta. In: Bioindicators and Biomonitoring. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., Niederlande, S. 555-576.
- (17) De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999): Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU-Programm für Normung, Mess- und Prüfverfahren.
- (18) Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995): Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.
- (19) Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission; ABl. L 396 vom 30.12.2006, S. 1.
- (20) Edwards C.A. and Bohlen P.J. (1996): *Biology and Ecology of Earthworms*. Third Edition, Chapman & Hall, London, S. 426 ff.
- (21) OECD (2008), „Bioakkumulation in sedimentbewohnenden benthischen Oligochaeten“, Prüfrichtlinie Nr. 315, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (22) Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. and Römbke J. (2009): Validierung einer Methode zur Messung der Bioakkumulation in terrestrischen Organismen mittels eines internationalen Ringtests. Bericht an das Umweltbundesamt Dessau-Rosslau, FuE-Nr.:

204 67 458: S. 149 ff. Abrufbar unter folgender Adresse:  
<http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>.

- (23) Elmegaard N. and Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. (2000): Safety factors in pesticide risk assessment. Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technischer Bericht 325: S. 57 ff.
- (24) Environment Canada (1995): Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.
- (26) Franke C. (1996): How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.
- (27) Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U. (1994): The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.
- (28) Füll C. (1996): Bioakkumulation und Metabolismus von  $\gamma$ -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 ff.
- (29) Füll C., Schulte C., Kula C. (2003): Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.
- (30) Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990): A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.
- (31) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985): Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.
- (32) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988): Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.
- (33) Hund-Rinke K. and Wiechering H. (2000): Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

- (34) Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.
- (35) ISO 11268-2 (1998) Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*). Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung.
- (36) Jaenike J. (1982): “*Eisenia foetida*” is two biological species. *Megadrilologica* 4: 6-8.
- (37) Jager T. (1998): Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080-2090.
- (38) Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L (2000): Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 953-961.
- (39) Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., DeJong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G.M. (2003a): Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767-775.
- (40) Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b): Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399-3404.
- (41) Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991): Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (42) Kasprzak K. (1982): Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23: 217-232.
- (43) Khalil A.M. (1990): Aufnahme und Metabolismus von <sup>14</sup>C-Hexachlorbenzol und <sup>14</sup>C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation Universität München, S. 137 ff.
- (44) Landrum P.F. (1989): Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23: 588-595.
- (45) Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997): Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions

- compared with accumulation under field conditions. *Ecotox. Environ. Safety* 36: 17-26.
- (46) Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999): Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1244-1249.
- (47) Nendza M. (1991): QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log  $K_{ow}$ /log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): *Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990*, VCH, Weinheim.
- (48) Kapitel C.8 dieses Anhangs; Toxizität für Regenwürmer.
- (49) Kapitel C.13 dieses Anhangs; Biokonzentration: Durchfluss-Fischtest.
- (50) Kapitel C.21 dieses Anhangs; Bodenmikroorganismen: Stickstofftransformationstest.
- (51) OECD (2004a), Reproduktionstest mit Enchytraeen, Prüfrichtlinie Nr. 220, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (52) OECD (2004b) Reproduktionstest mit Regenwürmern (*Eisenia fetida* / *Eisenia andrei*), Prüfrichtlinie Nr. 222, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (53) OECD (2008), „Bioakkumulation in sedimentbewohnenden benthischen Oligochaeten“, Prüfrichtlinie Nr. 315, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- (54) Petersen H. and Luxton M. (1982): A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388.
- (55) Phillips D.J.H. (1993): Bioaccumulation. In: *Handbook of Ecotoxicology* Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.
- (56) Pflugmacher J. (1992): Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- Z. *Umweltchem. Ökotox.* 4: 77-81.
- (57) Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996): Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

- (58) Randall R.C., Lee II H., Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991): Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ.Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.
- (59) Römbke J., Egele, P., Füll C. (1998): Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.
- (60) Römbke J. and Moser Th. (1999): Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: S. 373 ff.
- (61) Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.
- (62) Romijn C.A.F.M., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W., Canton J.H. (1993): Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107-127.
- (63) Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efrogmson R.A. (1999): Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.
- (64) Schlosser H-J. and Riepert F. (1992): Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr. NF* 34: 413-433.
- (65) Schmelz R. and Collado R. (1999): *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). *Carolinae* 57: 93–100.
- (66) Sims R.W. and Gerard B.M. (1985): Earthworms, In: Kermack, D.M. & Barnes, R.S.K. (Hrsg.): *Synopses of the British Fauna (New Series)* No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (67) Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000): Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557–2563.
- (68) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982): Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.

- (69) Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998): Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.
- (70) Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003): Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991): Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- (72) US EPA (2000): Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (73) Van Brummelen T.C. and Van Straalen N.M. (1996): Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.
- (74) Van Gestel C.A.M. (1992): The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review. In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker H., Edwards P.J., Greig-Smith P.W. & Heimbach F.). Intercept Press, Andover (GB).
- (75) Van Gestel C.A.M. and Ma W.-C. (1990): An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.
- (76) Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005): Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.
- (77) Venter J.M. and Reinecke A.J. (1988): The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.
- (78) Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. (2005): Biphase elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.
- (79) Widianarko B. and Van Straalen N.M. (1996): Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402-406.





## Anlage 1

### DEFINITIONEN

**Bioakkumulation** ist die Konzentrationszunahme (Anreicherung) der Prüfsubstanz in oder an einem Organismus gegenüber der Prüfsubstanzkonzentration im umgebenden Medium. Bioakkumulation setzt sich aus Biokonzentrations- und Biomagnifikationsvorgängen (siehe unten) zusammen.

**Biokonzentration** ist die Konzentrationszunahme (Anreicherung) der Prüfsubstanz in oder an einem Organismus gegenüber der Prüfsubstanzkonzentration im umgebenden Medium, die ausschließlich aus der Aufnahme der Substanz aus dem umgebenden Medium (z. B. über die Körperoberfläche und durch die ingestive Aufnahme des Bodens) resultiert.

**Biomagnifikation** ist die Konzentrationszunahme (Anreicherung) der Prüfsubstanz in oder an einem Organismus, die hauptsächlich aus der Aufnahme der Prüfsubstanz über kontaminiertes Futter oder kontaminierte Beute resultiert, bezogen auf die Prüfsubstanzkonzentration im Futter bzw. in der Beute. Biomagnifikation kann zum Transfer oder zur Bioakkumulation der Prüfsubstanz in Nahrungsketten oder -netzen führen.

Die **Elimination** einer Prüfsubstanz ist die Ausscheidung der angereicherten Prüfsubstanz aus dem Prüforganismus durch aktive oder passive Prozesse, die unabhängig von An- oder Abwesenheit der Prüfsubstanz im umgebenden Medium erfolgt.

Der **Bioakkumulationsfaktor** (BAF) zu jedem beliebigen Zeitpunkt während der Aufnahmephase dieses Bioakkumulationstests ist der Quotient aus der Konzentration der Prüfsubstanz in/an dem Prüforganismus ( $C_a$  in  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  Trockengewicht Wurm) und der Konzentration der Prüfsubstanz im umgebenden Medium ( $C_s$  in  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  Trockengewicht Boden); der BAF wird in  $\text{kg Boden}\cdot\text{kg}^{-1}$  Wurm ausgedrückt.

Der **steady-state-Bioakkumulationsfaktor** ( $\text{BAF}_{ss}$ ), der den BAF im *steady state* bezeichnet, ändert sich über einen längeren Zeitraum nicht wesentlich; die Konzentration der Prüfsubstanz im umgebenden Medium ( $C_s$  ausgedrückt als  $\text{g kg}^{-1}$  Trockengewicht des Bodens) ist während dieser Zeit konstant.

**Bioakkumulationsfaktoren**, die sich direkt anhand des Verhältnisses der Substrat-Aufnahmekonstanten zur Eliminationskonstanten ( $k_s$  und  $k_e$ , siehe unten) berechnen lassen, werden als kinetischer Bioakkumulationsfaktor ( $\text{BAF}_K$ ) bezeichnet.

Der **Biota-Boden-Akkumulationsfaktor** (BSAF) ist der Quotient aus der auf den Lipidgehalt normierten Prüfsubstanzkonzentration in/an dem Testorganismus ( $C_a$  in  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  Lipidgehalt des Organismus) und der auf den organischen Kohlenstoffgehalt normierten Prüfsubstanzkonzentration im Boden im *steady state* ( $C_s$  in  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  organischen Kohlenstoff des Bodens); der BSAF wird in  $\text{kg organischer Kohlenstoff}\cdot\text{kg}^{-1}$  Lipid ausgedrückt.

Ein **Plateau** oder *steady state* ist definiert als das Gleichgewicht zwischen den während der Aufnahmephase simultan auftretenden Aufnahme- und Eliminationsvorgängen. Der *steady state* in der grafischen Darstellung des gegen die Zeit aufgetragenen BAF ist erreicht, wenn

die Kurve parallel zur Zeitachse verläuft und wenn drei aufeinander folgende BAF-Analysen, die an Proben durchgeführt werden, die im Abstand von mindestens zwei Tagen genommen wurden, um nicht mehr als  $\pm 20\%$  voneinander abweichen, bzw. wenn es keine statistisch bedeutenden Unterschiede zwischen den drei Probenahmephasen gibt. Für Prüfsubstanzen, die nur langsam aufgenommen werden, ist ein zeitlicher Abstand zwischen den Probenahmen von sieben Tagen geeigneter (49).

Der **Koeffizient für die Verteilung organischer Kohlenstoff/Wasser** ( $K_{oc}$ ) bezeichnet das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentration Substanz im/am organischen Kohlenstoffanteil im Boden zu derjenigen im Wasser.

Der **Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient** ( $K_{ow}$ ) bezeichnet das Verhältnis zwischen der Konzentration einer Substanz in n-Oktanol und ihrer Konzentration in Wasser im Gleichgewicht, auch als  $P_{ow}$ -Wert ausgedrückt. Der Logarithmus von  $K_{ow}$  ( $\log K_{ow}$ ) gilt als Maß für das Potenzial einer Substanz, von aquatischen Organismen angereichert zu werden.

Die **Aufnahme- oder Expositionsphase** ist der Zeitraum, in dem die Prüforganismen der Prüfsubstanz ausgesetzt sind.

Die **Substrat-Aufnahmekonstante** ( $k_s$ ) ist der numerische Wert, der die Geschwindigkeitsrate der Zunahme der Prüfsubstanzkonzentration im/am Testorganismus bei Anreicherung der Substanz aus dem Boden definiert.  $k_s$  wird in  $g\text{ Boden } kg^{-1}\text{ Wurm } d^{-1}$  ausgedrückt.

Die **Eliminationsphase** ist der Zeitraum, in dem nach Umsetzung der Testorganismen von kontaminiertem Medium in prüfsubstanzfreies Medium die Ausscheidung (oder der Nettoverlust) der Prüfsubstanz durch die Testorganismen beobachtet wird.

Die **Eliminationskonstante** ( $k_e$ ) ist der numerische Wert, der die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme der Prüfsubstanz in/an dem Testorganismus nach Umsetzung der Testorganismen aus einem mit Prüfsubstanz belasteten Medium in prüfsubstanzfreies Medium definiert;  $k_e$  wird in  $Tag^{-1}$  ( $d^{-1}$ ) angegeben.

**Prüfsubstanz:** jede Substanz oder jedes Gemisch, die/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

## Anlage 2

### **BERECHNUNG DER AUFNAHME- UND ELIMINATIONSPARAMETER**

Hauptendpunkt eines Bioakkumulationstests ist der Bioakkumulationsfaktor (BAF). Zur Berechnung des gemessenen BAF bildet man den Quotienten aus der Konzentration der Prüfsubstanz im Testorganismus ( $C_a$ ) und der Konzentration im Substrat ( $C_s$ ) im *steady state*. Wurde der *steady state* während der Aufnahmephase nicht erreicht, so wird anhand der Konstanten der kinetische Bioakkumulationsfaktor ( $BAF_K$ ) anstelle des *steady-state*-Bioakkumulationsfaktors  $BAF_{ss}$  berechnet.

Für die Berechnung des kinetischen Bioakkumulationsfaktors ( $BAF_K$ ), der Substrat-Aufnahmekonstanten ( $k_s$ ) und der Eliminationskonstanten ( $k_e$ ) werden in der Regel computergestützte, nichtlineare Verfahren zur Parameterschätzung eingesetzt, z. B. basierend auf den in (68) beschriebenen Modellen. Diese Programme bestimmen die Werte  $BAF_K$ ,  $k_s$  und  $k_e$  basierend auf einem gegebenen Satz von über die Zeit ermittelten Konzentrationsdaten und den Modellgleichungen:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[Gleichung 1]}$$

oder

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad \text{[Gleichung 2]}$$

Dabei sind:

$C_a$  = Konzentration der chemischen Substanz in den Würmern [g kg<sup>-1</sup> Feucht- oder Trockengewicht]

$k_s$  = Aufnahmekonstante im Gewebe [g Boden kg<sup>-1</sup> Wurm d<sup>-1</sup>]

$C_s$  = Konzentration der chemischen Substanz im Boden [g kg<sup>-1</sup> Feucht- oder Trockengewicht]

$k_e$  = Eliminationskonstante [d<sup>-1</sup>]

$t_c$  = Zeit am Ende der Aufnahmephase.

Wenn die Hintergrundkonzentration in den nichtexponierten Würmern z. B. am Tag 0 deutlich von Null abweicht (was z. B. bei Metallen der Fall sein kann), so wird diese Hintergrundkonzentration ( $C_{a,0}$ ) in den Gleichungen wie folgt berücksichtigt:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[Gleichung 3]}$$

und

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e(t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad \text{[Gleichung 4]}$$

Wird im Verlauf der Aufnahmephase eine deutliche Abnahme der Prüfsubstanzkonzentration im Boden beobachtet, so können folgende Modellgleichungen verwendet werden (z. B. (67) (79)):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \quad \text{[Gleichung 5]}$$

Dabei sind:

$C_s$  = Konzentration der Substanz im Boden [g kg<sup>-1</sup> Feucht- oder Trockengewicht]

$k_0$  = Boden-Abbaukonstante [d<sup>-1</sup>]

$C_0$  = anfängliche Konzentration der chemischen Substanz im Boden [g kg<sup>-1</sup> Feucht- oder Trockengewicht]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[Gleichung 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t_c} - e^{-k_e t_c}) * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad \text{[Gleichung 7]}$$

Dabei sind:

$C_a$  = Konzentration der chemischen Substanz in Würmern [g kg<sup>-1</sup> Feucht- oder Trockengewicht]

$k_s$  = Aufnahmekonstante im Gewebe [g soil kg<sup>-1</sup> of worm d<sup>-1</sup>]

$k_0$  = Boden-Abbaukonstante [d<sup>-1</sup>]

$k_e$  = Eliminationskonstante [d<sup>-1</sup>]

$t_c$  = Zeit am Ende der Aufnahmephase.

Wird ein *steady state* während der Aufnahmephase erreicht (d. h.  $t = \infty$ ), kann Gleichung 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[Gleichung 1]}$$

umgeformt werden zu

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

oder

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad \text{[Gleichung 8]}$$

Damit stellt  $k_s/k_e \times C_s$  eine Annäherung an die Konzentration der Prüfsubstanz im Wurmgewebe im *steady state* ( $C_{a,ss}$ ) dar.

Der Biota-Boden-Akkumulationsfaktor (BSAF) lässt sich wie folgt berechnen:

$$BSAF = BAF_K^* \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad \text{[Gleichung 9]}$$

wobei  $f_{oc}$  die Fraktion des organischen Kohlenstoffs im Boden und  $f_{lip}$  die Fraktion des Lipidgehalts der Würmer ist, beide vorzugsweise an Proben, die aus dem Versuch stammen, und jeweils nach Trocken- oder Feuchtgewicht bestimmt.

Zur Modellierung der Eliminationskinetik/Eliminationsverläufe können die Daten aus der Eliminationsphase herangezogen und die folgende Modellgleichung und ein computergestütztes, nichtlineares Verfahren zur Parameterschätzung angewendet werden. Weisen die gegen die Zeit aufgetragenen Messwerte auf eine konstante exponentielle Abnahme der Prüfsubstanzkonzentration in den Tieren hin, so lässt sich der Eliminationsverlauf mit einem Ein-Kompartiment-Modell (Gleichung 9) beschreiben.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad \text{[Gleichung 10]}$$

Die Elimination kann zuweilen biphasisch verlaufen, mit einer raschen Abnahme von  $C_a$  in den Anfangsphasen und einem langsameren Verlust an Prüfsubstanz in den letzten Phasen der Elimination, z. B. (27) (68). Erklären lassen sich die beiden Phasen mit der Annahme, dass es im Organismus zwei verschiedene Kompartimente gibt, aus denen die Prüfsubstanz mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten eliminiert wird. Für diese Fälle wird auf die einschlägige Literatur verwiesen, z. B. (38) (39) (40) (78).

Anhand der obigen Modellgleichungen können die Kinetikparameter ( $k_s$  und  $k_e$ ) auch in einem Durchlauf berechnet werden, indem die Kinetikmodellgleichung 1. Ordnung auf alle Daten aus der Aufnahme- und der Eliminationsphase gleichzeitig angewendet wird. Für die Beschreibung einer Methode, die eine solche kombinierte Berechnung der Aufnahme- und Eliminationskonstanten ermöglicht, wird auf (41), (73) und (70) verwiesen.

$$C_a = \left[ \frac{k_s}{k_e} * C_s (1 - e^{-k_e t}) * (m=1) \right] + \left[ \frac{k_s}{k_e} * C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) * (m=2) \right] \quad \text{[Gleichung 11]}$$

Anm.: Bei gleichzeitiger Schätzung der Aufnahme- und Eliminationsparameter anhand der kombinierten Aufnahme- und Eliminationsdaten ist „m“ in Gleichung 11 ein Deskriptor, mit dem das Computerprogramm die Teilterme der Gleichung den Datensätzen der jeweiligen Phase zuordnen und die Schätzung korrekt durchführen kann (m = 1 für die Aufnahme- und m = 2 für die Eliminationsphase).

die Eliminationsphase).

Diese Modellgleichungen sind jedoch mit Vorsicht anzuwenden, insbesondere wenn sich während des Versuchs die Bioverfügbarkeit der Prüfsubstanz ändert oder (biologischer) Abbau stattfindet (siehe z. B. (79)).

### Anlage 3

## **PROBENAHPMEPLAN FÜR DIE TESTUNG DER BIOAKKUMULATION IM BODEN - BEISPIELE**

### **Regenwurmtest**

a) Aufnahmephase mit 8 Messpunkten für die Kinetikberechnung

<b>Tag</b>	<b>Arbeitsschritte</b>
-6	Konditionieren des zubereiteten Bodens für 48 Std.;
-4	Dotieren der Bodenfraktion mit der Lösung der Prüfsubstanz, Abdampfen von Lösungsmitteln; Mischen der Bodenbestandteile; Befüllen der Prüfgefäße mit dem Boden; Equilibrieren bei Prüfbedingungen für 4 Tage (3 Wochen bei metalldotierten Böden);
-3 bis -1	Entnahme der Testorganismen aus der Anzuchtkultur zwecks Akklimatisierung; Zubereitung und Befeuchtung der Bodenbestandteile;
0	Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Entnahme von Bodenproben aus den behandelten Prüfgefäßen und den Kontrollgefäßen mit Lösungsmittel zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration; Zugabe der Futterration; Wiegen und Verteilen der Würmer auf die Prüfgefäße nach dem Zufallsprinzip; Reservieren einer ausreichenden Anzahl von Teilproben von Würmern zur Bestimmung von analytischen Hintergrundwerten, Feucht- und Trockengewicht sowie Lipidgehalt; Wiegen sämtlicher Prüfgefäße zur Kontrolle der Bodenfeuchte; Kontrolle der Luftzufuhr bei Verwendung eines geschlossenen Prüfsystems;
1	Kontrolle der Luftzufuhr, Aufzeichnung von Wurmverhalten und Temperatur; Entnahme von Boden- und Wurmproben zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration;
2	wie Tag 1;
3	Kontrolle von Luftzufuhr, Wurmverhalten und Temperatur;
4	wie Tag 1;
5 - 6	wie Tag 3;
7	wie Tag 1; Zugabe der Futterration; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße und Ausgleichen der Verdunstungsverluste;
8 - 9	wie Tag 3;
10	wie Tag 1;
11 - 13	wie Tag 3;
14	wie Tag 1; Zugabe der Futterration; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße und Ausgleichen der Verdunstungsverluste;
15 - 16	wie Tag 3;

- 17 wie Tag 1;
- 18 - 20 wie Tag 3;
- 21 wie Tag 1; Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße; Ende der Aufnahme phase; Umsetzen der Würmer aus den verbleibenden exponierten Replikaten in Gefäße mit sauberem Boden für die Eliminationsphase (ohne Entleerung des Darminhalts); Entnahme von Boden- und Wurmproben aus den Kontrollgefäßen mit Lösungsmittel.

---

Die Arbeitsschritte vor der Exponierung (Equilibrierungsphase) sind unter Berücksichtigung der Eigenschaften der Prüfsubstanz zu programmieren.

Die für Tag 3 beschriebenen Arbeitsschritte sind täglich durchzuführen (mindestens an den Arbeitstagen).

---



## b) Eliminationsphase

Tag	Arbeitsschritte
-6	Zubereitung und Befeuchtung der Bodenbestandteile; Konditionieren des zubereiteten Bodens für 48 Std.;
-4	Mischen der Bodenbestandteile; Befüllen der Prüfgefäße mit dem Boden; Inkubation bei Prüfbedingungen für 4 Tage;
0 (Ende der Aufnahmephase)	Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Wiegen und Verteilen der Würmer auf die Prüfgefäße nach dem Zufallsprinzip; Zugabe der Futtermation; Umsetzen der Würmer aus den verbleibenden exponierten Replikaten in Gefäße mit sauberem Boden; Entnahme von Boden- und Wurmproben nach 4 bis 6 Std. zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration;
1	Kontrolle der Luftzufuhr, Aufzeichnung von Wurmverhalten und Temperatur; Entnahme von Boden- und Wurmproben zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration;
2	wie Tag 1;
3	Kontrolle von Luftzufuhr, Wurmverhalten und Temperatur;
4	wie Tag 1;
5 - 6	wie Tag 3;
7	wie Tag 1; Zugabe der Futtermation; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße und Ausgleichen der Verdunstungsverluste;
8 - 9	wie Tag 3;
10	wie Tag 1;
11 - 13	wie Tag 3;
14	wie Tag 1; Zugabe der Futtermation; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße und Ausgleichen der Verdunstungsverluste;
15 - 16	wie Tag 3;
17	wie Tag 1;
18 - 20	wie Tag 3;
21	wie Tag 1; Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße; Entnahme von Boden- und Wurmproben aus den Kontrollgefäßen mit Lösungsmittel.
<p>Der Boden wird vor Beginn der Eliminationsphase auf dieselbe Weise zubereitet wie vor der Aufnahmephase.</p> <p>Die für Tag 3 beschriebenen Arbeitsschritte sind täglich durchzuführen (mindestens an den Arbeitstagen).</p>	

## Enchyträentest

### a) Aufnahmephase mit 8 Messpunkten für die Kinetikberechnung

---

Tag	Arbeitsschritte
-6	Konditionieren des zubereiteten Bodens für 48 h;
-4	Dotieren der Bodenfraktion mit der Lösung der Prüfsubstanz, Abdampfen von Lösungsmitteln; Mischen der Bodenbestandteile; Befüllen der Prüfgefäße mit dem Boden; Equiliben bei Prüfbedingungen für 4 Tage (3 Wochen bei metalldotierten Böden);
-3 bis -1	Entnahme der Testorganismen aus der Anzuchtkultur zwecks Akklimatisierung; Zubereitung und Befeuchtung der Bodenbestandteile;
0	Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Entnahme von Bodenproben aus den behandelten Prüfgefäßen und den Kontrollgefäßen mit Lösungsmittel zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration; Zugabe der Futterration in den Boden; Wiegen und Verteilen der Würmer auf die Prüfgefäße nach dem Zufallsprinzip; Reservieren einer ausreichenden Anzahl von Teilproben von Würmern zur Bestimmung von analytischen Hintergrundwerten, Feucht- und Trockengewicht sowie Lipidgehalt; Wiegen sämtlicher Prüfgefäße zur Kontrolle der Bodenfeuchte; Kontrolle der Luftzufuhr bei Verwendung eines geschlossenen Prüfsystems;
1	Kontrolle von Luftzufuhr, Wurmverhalten und Temperatur; Entnahme von <u>Boden- und Wurmproben</u> zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration;
2	wie Tag 1;
3	Kontrolle von Luftzufuhr, Wurmverhalten und Temperatur;
4	wie Tag 1;
5 - 6	wie Tag 3;
7	wie Tag 1; Zugabe der Futterration in den Boden; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße und Ausgleichen der Verdunstungsverluste;
9	wie Tag 1;
10	wie Tag 3;
11	wie Tag 1;
12 - 13	wie Tag 3;
14	wie Tag 1; Zugabe der Futterration in den Boden; Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße; Ende der Aufnahmephase; Umsetzen der Würmer aus den verbleibenden exponierten Replikaten in Gefäße mit sauberem Boden für die Eliminationsphase (ohne Entleerung des Darminhalts); Entnahme von Boden- und Wurmproben aus den Kontrollgefäßen mit Lösungsmittel.

---

Die Arbeitsschritte vor der Exponierung (Equilibrierungsphase) sind unter Berücksichtigung der Eigenschaften der Prüfsubstanz zu programmieren.

Die für Tag 3 beschriebenen Arbeitsschritte sind täglich durchzuführen (mindestens an den Arbeitstagen).

---



## Anlage 4

### **KUNSTERDE – EMPFEHLUNGEN FÜR DIE ZUBEREITUNG UND LAGERUNG**

Da natürlicher Boden aus einer bestimmten Quelle möglicherweise nicht das ganze Jahr über verfügbar ist und vorhandene Bodenorganismen sowie Mikroschadstoffe den Test beeinflussen können, wird für diesen Test künstliches Substrat, die Kunsterde gemäß Kapitel C.8 dieses Anhangs (Toxizität für Regenwürmer) (48), empfohlen. In dieser Kunsterde können mehrere Testspezies überleben, heranwachsen und sich vermehren, und eine maximale Standardisierung sowie Vergleichbarkeit der Test- und Kulturbedingungen sowohl laborintern als auch zwischen verschiedenen Labors sind gewährleistet.

#### Bodenbestandteile

Torf:	10 %	Sphagnum-Torf, gemäß OECD-Richtlinie Nr. 207 (48);
Quarzsand:	70 %	Industriequarzsand (luftgetrocknet); Korngröße: > 50 % der Partikel sollten Größen zwischen 50 und 200 µm aufweisen, aber alle Partikel sollten nicht größer als 2 mm sein;
Kaolin-Ton:	20 %	Kaolinitgehalt: ≥ 30 %;
Calciumcarbonat:	≤ 1 %	CaCO <sub>3</sub> , pulverisiert, chemisch rein.

Es ist ebenfalls möglich, den Gehalt der Kunsterde an organischem Kohlenstoff zu reduzieren, z. B. indem der Torfgehalt auf 4 bis 5 % bezogen auf das Trockengewicht des Bodens verringert und der Sandanteil entsprechend erhöht wird. Durch eine solche Reduzierung des Gehalts an organischem Kohlenstoff kann die Bindung der Prüfsubstanz an den Boden (organischen Kohlenstoff) verringert werden und die Bioverfügbarkeit der Prüfsubstanz für die Würmer zunehmen (74). Es wurde nachgewiesen, dass *Enchytraeus albidus* und *Eisenia fetida* den Validitätskriterien hinsichtlich der Vermehrung bei Versuchen mit Feldeböden mit geringerem Gehalt an organischem Kohlenstoff (z. B. 2,7 % (33), (61)) genügen, und es ist auch erwiesen, dass diese Ergebnisse auch mit Kunsterde mit 5 %igem Torfgehalt erzielt werden können.

#### **Zubereitung**

Die trockenen Bodenbestandteile werden ca. eine Woche vor Prüfbeginn gründlich durchmischt (z. B. in einem großen Labormischer). Diese Mischung sollte mindestens 48 Std. vor Auftragen der Prüfsubstanz zur Einstellung/Stabilisierung des Säuregehalts mit entionisiertem Wasser befeuchtet werden. Der pH-Wert wird bestimmt, indem man den Boden im Verhältnis 1:5 mit 1 M KCl-Lösung mischt. Den pH-Wert des Bodens gegebenenfalls durch Zugabe einer ausreichenden Menge von CaCO<sub>3</sub> auf 6,0 ± 0,5 einstellen oder eine neue Bodenpartie zubereiten.

Die maximale Wasserhaltekapazität (WHC) der Kunsterde wird nach der ISO-Norm 11268-2 bestimmt (35). Mindestens zwei Tage vor Testbeginn die trockene Kunsterde mit genug entionisiertem oder rekonsituiertem Wasser befeuchten, bis ungefähr 50 % des endgültigen Wassergehalts, der 40 bis 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität (WHC) betragen sollte, erreicht sind. Zu Testbeginn wird der angefeuchtete Boden in so viele Portionen, wie Prüfkonzentrationen und Kontrollen für den Test benötigt werden, aufgeteilt und der Feuchtegehalt wird mit der Lösung der Prüfsubstanz und/oder entionisiertem oder rekonstituiertem Wasser auf 40 bis 60 % des  $WHC_{max}$  eingestellt. Der Feuchtegehalt wird zu Beginn und am Ende des Tests (bei 105 °C) bestimmt. Er sollte optimal auf die Bedürfnisse der Spezies abgestimmt sein. (Der Feuchtegehalt kann auch überprüft werden, indem der Boden vorsichtig zusammengedrückt wird, bis kleine Wassertropfen zwischen den Finger auftauchen).

### **Lagerung**

Die trockenen Bestandteile der Kunsterde können bis zu ihrem Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert werden. Der vorbereitete, angefeuchtete Boden kann bis zu drei Tage vor dem Dotieren an einem kühlen Ort gelagert werden. Verdunstungsverluste sind möglichst gering zu halten. Der Boden ist unmittelbar nach dem Auftragen der Prüfsubstanz zu gebrauchen, außer es liegen Informationen darüber vor, dass der betreffende Boden gelagert werden kann, ohne dass hierdurch die Toxizität und Bioverfügbarkeit der Prüfsubstanz beeinflusst werden. In diesem Fall können Proben des dotierten Bodens bis zur Analyse unter den für die betreffende Prüfsubstanz empfohlenen Bedingungen gelagert werden.

## Anlage 5

### **ALS TESTSPEZIES FÜR DIE BESTIMMUNG DER BIOAKKUMULATION AUS DEM BODEN EMPFOHLENE ARTEN TERRESTRISCHER OLIGOCHAETEN**

#### **Regenwürmer**

Die empfohlene Testspezies *Eisenia fetida* (Savigny 1826) gehört zur Familie der Regenwürmer (Lumbricidae). Seit 1972 wird sie in zwei Unterarten (*Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* aufgeteilt (10)). Laut Jaenike (36) handelt es sich jedoch um zwei gesonderte Arten. *Eisenia fetida* ist leicht an den glänzenden gelben Streifen zwischen den Segmenten erkennbar, während *Eisenia andrei* eine einheitlich dunkelrote Färbung aufweist. Die ursprüngliche Heimat dieser Arten liegt wahrscheinlich in der Gegend des Schwarzen Meers; inzwischen sind sie weltweit verbreitet und kommen vor allem in anthropogen beeinflussten Habitaten wie Komposthaufen vor. Beide lassen sich sowohl für Ökotoxikologietests als auch für Bioakkumulationstests verwenden.

*Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* sind im Handel erhältlich, z. B. als Fischköder. Ihr Reproduktionszyklus ist im Vergleich zu anderen Lumbriciden relativ kurz. Bei Raumtemperatur erreichen sie nach ca. 2 – 3 Monaten Geschlechtsreife. Ihr Temperaturoptimum liegt bei ca. 20 – 24°C. Sie bevorzugen ein relativ feuchtes Substrat mit neutralem pH und hohem Gehalt an organischem Material. Da diese Arten seit ca. 25 Jahren weitgehend in standardisierten Ökotoxikologietests verwendet werden, ist das Verfahren für ihre Anzucht wohlbekannt (48) (77).

Beide Arten können in vielfältigen tierischen Exkrementen angezogen werden. In der ISO-Norm (35) wird als Anzuchtsmedium eine 50:50-Mischung von Pferde- oder Rinderdung und Torf empfohlen. Das Medium sollte einen pH-Wert von etwa 6 bis 7 (eingestellt mit Calciumcarbonat) sowie eine niedrige Ionenleitfähigkeit (weniger als 6 mS/cm oder weniger als 0,5 % Salzkonzentration) haben und sollte nicht übermäßig mit Ammonium oder tierischem Urin verunreinigt sein. Es kann auch handelsübliche zusatzfreie Gartenerde, OECD-Kunsterde (48) oder eine Mischung aus beiden zu gleichen Teilen verwendet werden. Das Substrat sollte feucht, jedoch nicht zu nass sein. Zur Anzucht eignen sich Kästen mit einem Fassungsvermögen von 10 L bis 50 L.

Zur Gewinnung von Würmern gleichen Alters und gleicher Größe (Masse) ist es am besten, die Kultur mit Kokons zu beginnen. Hierzu werden adulte Würmer zur Kokonablage in einen Anzuchtkasten mit frischem Substrat gesetzt. Die praktische Erfahrung hat gezeigt, dass eine Besatzdichte von ca. 100 adulten Würmern pro kg Substrat (Feuchtgewicht) gute Reproduktionsraten ergibt. Nach 28 Tagen werden die adulten Tiere entfernt. Die aus diesen Kokons geschlüpften Würmer werden nach Erreichen der Geschlechtsreife nach mindestens zwei Monaten, spätestens jedoch nach 12 Monaten für Tests verwendet.

Die Würmer der oben beschriebenen Arten können als gesund betrachtet werden, wenn sie sich durch das Substrat bewegen, nicht versuchen, das Substrat zu verlassen und sich regelmäßig reproduzieren. Substratmangel wird durch eine sehr langsame Bewegung der

Würmer angezeigt und dadurch, dass sie ein gelbes hinteres Ende (im Fall von *Eisenia fetida*) aufweisen. In diesem Fall ist/sind die Bereitstellung von frischem Substrat und/oder die Reduzierung der Besatzdichte je Kasten zu empfehlen.

### **Zusätzlich ausgewähltes Referenzmaterial**

Gerard B.M. (1964): Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O. (1953): Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997): Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977): Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955): Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

Sims R.W. and Gerard B.M. (1985): A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984): The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

### **Enchytraeen**

Als Testspezies wird *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (Weißer Topfwurm) empfohlen. Mit einer Länge von bis zu 15 mm ist *Enchytraeus albidus* einer der größten Vertreter der zu den Ringelwürmern gehörenden Oligochaetenfamilie Enchytraeidae und ist ubiquitär (8) verbreitet. *Enchytraeus albidus* ist in marinen, limnischen und terrestrischen Habitaten zu finden, hauptsächlich in faulem organischem Material (Seetang, Kompost), aber, wenn auch seltener, ebenso in Wiesen (42). Diese breite ökologische Toleranz und einige morphologische Variationen weisen darauf hin, dass es möglicherweise mehrere Unterarten dieser Art gibt.

*Enchytraeus albidus* ist im Handel erhältlich, z. B. als Fischfutter. Es ist zu prüfen, ob andere, für gewöhnlich kleinere Arten in der Kultur präsent sind (60). Ist dies der Fall, sind alle Würmer in einer Petrischale mit Wasser zu waschen. Große adulte Exemplare von *Enchytraeus albidus* werden dann (mittels Stereomikroskop) für eine neue Kultur aussortiert. Alle anderen Würmer werden verworfen. Der Reproduktionszyklus ist kurz, da die Tiere ihre Geschlechtsreife zwischen 33 Tagen (bei 18 °C) und 74 Tagen (bei 12 °C) erreichen. Für die Versuche sollten ausschließlich Wurmulturen verwendet werden, die mindestens fünf Wochen lang (eine Generation) problemlos im Labor gehalten wurden.

Andere Arten der Gattung *Enchytraeus* sind ebenfalls geeignet, insbesondere *Enchytraeus luxuriosus*. Diese in (65) neu beschriebene Art ist ein echter Bodenbewohner. Werden andere *Enchytraeus*-Arten verwendet, so sind diese eindeutig zu identifizieren und die Gründe für die Wahl der Art zu protokollieren.

Die Art *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) gehört zur selben Gruppe wie *Enchytraeus luxuriosus*. Ihr Vorkommen im Freiland konnte nicht sicher nachgewiesen werden, da die Art bisher nur im Zusammenhang mit Wurmzuchten und Komposthaufen beschrieben wurde (Römbke 2003). Ihre ursprünglichen ökologischen Ansprüche sind daher nicht bekannt. Jüngste Laborstudien mit Freilandböden haben jedoch bestätigt, dass sich diese Art durch eine breite Toleranz gegenüber Bodeneigenschaften wie pH-Wert und Bodentextur auszeichnet (Jänsch et al. 2005). In jüngster Zeit wird die Art wegen der Einfachheit ihrer Zucht und Testung häufig für ökotoxikologische Studien verwendet (z. B. Kuperman et al. 2003). Die Tiere sind jedoch klein (3 – 12 mm; im Durchschnitt 7 mm) (Westheide & Müller 1996) und daher nicht so leicht handhabbar wie *Enchytraeus albidus*. Bei Verwendung dieser Art anstelle von *Enchytraeus albidus* können, müssen aber nicht unbedingt kleinere Prüfgefäße eingesetzt werden. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass sich diese Art mit einer Generationszeit von weniger als 20 Tagen bei  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  (Achazi et al. 1999) sehr schnell und bei höheren Temperaturen sogar noch schneller vermehrt.

Enchytraeen der Art *Enchytraeus albidus* (sowie andere *Enchytraeus*-Arten können in großen Kunststoffschalen (z. B. 30 x 60 x 10 cm bzw. 20 x 12 x 8 cm für Kulturen kleinerer Wurmarten) gezüchtet werden, die mit einer Mischung aus Kunsterde und im Handel erhältlichere zusatzfreier Gartenerde gefüllt sind. Kompostmaterial ist zu vermeiden, da dieses toxische Substanzen wie Schwermetalle enthalten kann. Vor Gebrauch sollte das Zuchtsubstrat durch dreimaliges Tiefgefrieren defauniert werden. Reine Kunsterde kann ebenfalls verwendet werden, doch könnte die Reproduktionsgeschwindigkeit geringer sein als bei der Verwendung von Mischsubstraten. Der pH-Wert des Substrats sollte bei  $6,0 \pm 0,5$  liegen. Die Zucht erfolgt in einem Inkubator bei  $15 \pm 2^\circ\text{C}$  im Dauerdunkel. In jedem Fall sind Temperaturen von über  $23^\circ\text{C}$  zu vermeiden. Der künstliche/natürliche Boden sollte feucht, jedoch nicht nass sein. Bei leichtem Zusammendrücken des Bodens (Faustprobe) sollten nur kleine Wassertropfen austreten. Auf jeden Fall ist die Sauerstoffversorgung sicherzustellen (z. B. muss bei Verwendung eines Deckels dieser so perforiert sein, dass ein ausreichender Luftaustausch gewährleistet ist). Die Anzuchterde sollte einmal wöchentlich durch vorsichtiges Mischen belüftet werden.

Die Würmer sollten mindestens einmal wöchentlich ad libitum mit Haferflocken gefüttert werden, die in eine Vertiefung auf der Bodenoberfläche gegeben und mit Erde abgedeckt werden. Bleiben von der letzten Fütterung Futterreste im Behälter, so ist die Futterzugabe entsprechend anzupassen. Bei Pilzbesatz auf den Futterresten sind diese durch eine neue Menge Haferflocken zu ersetzen. Zur Stimulierung der Reproduktion kann den Haferflocken alle zwei Wochen mit Vitaminen angereichertes Proteinpulver zugesetzt werden. Nach drei Monaten werden die Tiere in eine frisch angesetzte Kultur oder Zuchtsubstrat umgesetzt. Die Haferflocken sind in geschlossenen Gefäßen zu lagern und sollten vor Gebrauch autoklaviert oder erhitzt werden, um den Befall mit Mehlmotten (z. B. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) oder Raubmilben (z. B. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina) zu vermeiden. Das desinfizierte Futter wird gemahlen, so dass es sich leicht auf die Bodenoberfläche streuen lässt. Als weitere Futterquellen kommen Bäckerhefe oder TetraMin<sup>®</sup>-Fischfutter in Betracht.

In der Regel sind die Anzuchtbedingungen ausreichend, wenn die Würmer nicht versuchen, das Substrat zu verlassen, sich schnell durch den Boden bewegen, eine glänzende Hautoberfläche ohne anhaftende Bodenpartikel aufweisen und weißlich gefärbt sind und



wenn Würmer verschiedener Altersgruppen vorhanden sind. Die Würmer können als gesund betrachtet werden, wenn sie sich regelmäßig reproduzieren.

### **Zusätzlich ausgewähltes Referenzmaterial**

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999): The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005): Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003): Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J. (2003): Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W. and Graefe U. (1992): Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479-488.

Westheide W. and Müller M.C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.“