



Rat der  
Europäischen Union

Brüssel, den 7. September 2016  
(OR. en)

12209/16  
ADD 2

COMPET 482  
ENV 583  
CHIMIE 47  
MI 574  
ENT 168  
SAN 324  
CONSOM 212

### ÜBERMITTLUNGSVERMERK

---

Absender:	Europäische Kommission
Eingangsdatum:	5. September 2016
Empfänger:	Generalsekretariat des Rates

---

Betr.:	VERORDNUNG (EU) .../... DER KOMMISSION vom XXX zur Änderung - zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt - des Anhangs der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)
--------	---

---

Die Delegationen erhalten in der Anlage das Dokument D045907/02.

---

Anl.: D045907/02

(19) In Teil C werden die folgenden Kapitel angefügt:

## **„C.47 Toxizitätsprüfung an Fischen im frühen Entwicklungsstadium**

### **EINLEITUNG**

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 210 (2013). Mithilfe von Prüfungen an Fischen in frühen Entwicklungsstadien sollen die letalen und subletalen Wirkungen von Chemikalien auf die geprüften Entwicklungsstadien und Tierarten bestimmt werden. Die Prüfungen liefern wertvolle Informationen für die Einschätzung der chronischen letalen und subletalen Wirkungen der Chemikalie auf andere Fischarten.
2. Die Prüfrichtlinie 210 basiert auf einem Vorschlag des Vereinigten Königreichs, der auf einer Tagung von OECD-Experten im November 1988 in Medmenham (Vereinigtes Königreich) erörtert und 2013 entsprechend den Erfahrungen bei der Anwendung der Prüfung sowie entsprechend den Empfehlungen eines OECD-Workshops über Toxizitätstests an Fischen, der im September 2010 stattfand, aktualisiert wurde (1).

### **PRINZIP DER PRÜFMETHODE**

3. Fische in frühen Entwicklungsstadien werden der in Wasser gelösten Prüfchemikalie in einer Reihe von Konzentrationen ausgesetzt. Durchflusssysteme werden bevorzugt, doch wenn diese nicht möglich sind, werden auch semistatische Systeme akzeptiert. Nähere Informationen sind dem *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures* zu entnehmen (2). Zu Beginn der Prüfung werden die befruchteten Eier in die Prüfkammern gesetzt. Die Dauer der Prüfung hängt bei jeder Tierart davon ab, wie lange die Kontrollfische brauchen, um ein juveniles Entwicklungsstadium zu erreichen. Die letalen und subletalen Wirkungen werden bewertet und mit den Kontrollwerten verglichen, um die LOEC (niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung) und somit i) die NOEC (Konzentration ohne beobachtete Wirkung) und/oder ii) den EC<sub>x</sub>-Wert (z. B. EC<sub>10</sub>, EC<sub>20</sub>) anhand eines Regressionsmodells zu bestimmen, um zu schätzen, welche Konzentration eine Veränderung der gemessenen Wirkung um x % hervorrufen würde. Die Protokollierung der Konzentrationen und Parameter, bei denen relevante Wirkungen auftreten, hängt vom jeweiligen Rechtsrahmen ab. Die Prüfkonzentrationen sollten die EC<sub>x</sub> einschließen, damit der EC<sub>x</sub>-Wert nicht extrapoliert werden muss, sondern durch Interpolation bestimmt werden kann (siehe Definitionen in Anlage 1).

### **ANGABEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE**

4. Mit dem Begriff „Prüfchemikalie“ wird das bezeichnet, was geprüft wird. Die Wasserlöslichkeit (siehe Kapitel A.6) und der Dampfdruck (siehe Kapitel A.4) der Prüfchemikalie sollten bekannt sein, und ein zuverlässiges Analyseverfahren für die Quantifizierung der Prüfchemikalie in den Prüflösungen mit bekannter und dokumentierter Wiederfindungsrate und Bestimmungsgrenze sollte vorhanden sein. Obwohl dies für die Durchführung der Prüfung nicht notwendig ist, können die Ergebnisse einer Prüfung auf akute Toxizität (siehe Kapitel C.1 oder C.49), die vorzugsweise mit den für diese Prüfung gewählten Arten durchgeführt wurde, nützliche Informationen liefern.
5. Wenn die Prüfmethode zur Prüfung eines Gemischs angewandt wird, sollte die Zusammensetzung des Gemischs so genau wie möglich charakterisiert werden, z. B. durch Angabe der chemischen Identität, des quantitativen Vorkommens und der stoffspezifischen Eigenschaften der Komponenten (wie oben erwähnt). Bevor die Prüfmethode zur gesetzlich vorgeschriebenen Prüfung eines Gemischs angewendet wird, sollte geprüft werden, ob sie für solche Zwecke geeignete Ergebnisse liefert.
6. Zu nützlichen Informationen zählen die Strukturformel, die Reinheit des Stoffs, die Wasserlöslichkeit, die Stabilität in Wasser, die Lichtbeständigkeit,  $pK_a$ ,  $P_{ow}$  und die Ergebnisse einer Prüfung auf leichte biologische Abbaubarkeit (z. B. Kapitel C.4 oder C.29).

## VALIDITÄT DER PRÜFUNG

7. Eine Prüfung wird als valide betrachtet, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:
  - Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs sollte während der gesamten Prüfung  $> 60 \%$  des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen;
  - die Wassertemperatur sollte während der Prüfung in den einzelnen Prüfkammern und an aufeinanderfolgenden Tagen zu keinem Zeitpunkt um mehr als  $\pm 1,5 \text{ }^\circ\text{C}$  schwanken und in den Temperaturbereichen liegen, die für die geprüfte Tierart vorgesehen sind (Anlage 2);
  - die Prüfkonzentrationen müssen analytisch bestimmt werden;
  - die Gesamtüberlebensrate der befruchteten Eier und nach dem Schlüpfen in den Kontrollen und, soweit zutreffend, in den Lösungsmittelkontrollen muss mindestens den in Anlage 2 festgesetzten Grenzwerten entsprechen.
8. Wird eine geringfügige Abweichung von den Validitätskriterien beobachtet, sollte geprüft werden, welche Folgen dies für die Zuverlässigkeit der Testdaten hat, und diese Erwägungen sollten in den Bericht aufgenommen werden. Wirkungen auf Überleben, Schlupferfolg oder Wachstum in der Lösungsmittelkontrolle im Vergleich zur

Negativkontrolle sollten angegeben und im Hinblick auf die Zuverlässigkeit der Testdaten erörtert werden.

## **BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE**

### **Prüfkammern**

9. Es können beliebige Gefäße aus Glas, Edelstahl oder einem anderen chemisch inerten Werkstoff verwendet werden. Da Silikon bekanntermaßen stark absorbierend auf lipophile Stoffe wirkt, sollte die Verwendung von Silikonschläuchen in Durchflussstudien sowie von Silikondichtungen in Kontakt mit Wasser z. B. durch den Einsatz von Aquarien aus Monoblockglas auf ein Minimum reduziert werden. Die Gefäße sollten so bemessen sein, dass ein hinreichendes Wachstum in der Kontrolle, die Erhaltung der Konzentration an gelöstem Sauerstoff (z. B. bei kleinen Fischarten wird dies bei 7 l Fassungsvermögen erreicht) und die Einhaltung der Besatzratenkriterien gemäß Nummer 19 gewährleistet sind. Es wird empfohlen, die Prüfkammern nach dem Zufallsprinzip in dem Prüfbereich anzuordnen. Einem randomisierten Blockkonzept, bei dem jede Behandlung in jedem Block vorhanden ist, einem vollständig randomisierten Konzept vorzuziehen. Die Prüfkammern sollten vor unerwünschten Störungen geschützt werden. Das Testsystem sollte vorzugsweise so lange mit den Konzentrationen der Prüfchemikalie konditioniert werden, dass die Aufrechterhaltung stabiler Expositionskonzentrationen nachgewiesen werden kann, bevor Prüforganismen eingesetzt werden.

### **Auswahl der Tierart**

10. Empfohlene Fischarten werden in Tabelle 1 genannt. Dies schließt die Verwendung anderer Arten zwar nicht aus, doch ist das Prüfverfahren unter Umständen anzupassen, um geeignete Prüfbedingungen zu schaffen. In diesem Fall sollten die Gründe für die Auswahl der Tierart und der Versuchsmethode dokumentiert werden.

### **Haltung der Zuchtfische**

11. Nähere Angaben, wie man die Zuchtfische unter zufriedenstellenden Bedingungen hält, sind Anlage 3 und den Literaturhinweisen (3) (4) (5) zu entnehmen.

### **Handhabung von befruchteten Eiern, Embryonen und Larven**

12. Befruchtete Eier, Embryonen und Larven können der Prüfchemikalie anfänglich innerhalb des Hauptgefäßes in kleineren Behältern aus Glas oder Edelstahl ausgesetzt werden, die an den Seiten und Enden mit Sieben versehen sind, damit die Prüflösung durch das Gefäß hindurchfließen kann. Einen wirbelfreien Durchfluss durch diese kleinen Gefäße kann man

dadurch herbeiführen, dass man diese an einem Arm aufhängt, der das Gefäß auf- und abbewegt, dabei jedoch die Organismen immer mit der Prüflösung bedeckt hält. Befruchtete Eier von Salmonidfischen können auf Einschüben oder Gittern gehältert werden, deren Öffnungen groß genug sind, dass die Larven nach dem Schlüpfen hindurchfallen können.

13. Werden Eierbehälter, Gitter oder Siebe verwendet, um die Eier innerhalb des Hauptprüfgefäßes zu halten, sollten diese Rückhaltevorrichtungen nach dem Schlüpfen der Larven entfernt werden (siehe Leitlinie in Anlage 3); Siebe sollten nur bleiben, um die Larven an der Flucht zu hindern. Müssen die Larven umgesetzt werden, sollten sie nicht der Luft ausgesetzt werden, und es sollten keine Netze verwendet werden, um Fische aus Eierbehältern zu entnehmen. Der Zeitpunkt für diese Umsetzung ist von Art zu Art unterschiedlich und sollte im Bericht dokumentiert werden. Ein Umsetzen ist auch nicht immer erforderlich.

### **Wasser**

14. Als Testwasser kann jedes beliebige Wasser verwendet werden, in dem die zu prüfende Art über einen längeren Zeitraum überleben und wachsen kann (siehe Anlage 4). Während der gesamten Prüfdauer sollte eine konstante Wasserqualität gewährleistet sein. Um sicherzustellen, dass das Verdünnungswasser das Prüfergebnis nicht übermäßig beeinflusst (beispielsweise durch Komplexierung der Prüfchemikalie) oder sich nachteilig auf die Leistung des Zuchtbestands auswirkt, sollten in Abständen Proben zur Analyse entnommen werden. Bei Verdünnungswasser von bekanntermaßen relativ stabiler Qualität sollten beispielsweise halbjährlich der Gehalt an Schwermetallen (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd und Ni), größeren Anionen und Kationen (z. B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ), Ammoniak, der Gesamtgehalt an chlorierten Pestiziden, der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) und der Schwebstoffgehalt bestimmt werden. Ist bekannt, dass die Wasserqualität schwankt, müssen die Messungen häufiger durchgeführt werden; wie häufig hängt davon ab, wie stark die Qualität schwankt. Einige chemische Merkmale eines akzeptablen Verdünnungswassers sind in Anlage 4 angegeben.

### **Prüflösungen**

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

geeignet erwiesen (3). Wenn jedoch die unter Nummer 19 angegebene Besatzrate eingehalten wird, ist eine geringere Durchsatzrate von z. B. 2 bis 3 Prüfkammervolumina möglich, um ein schnelles Entfernen des Futters zu verhindern.

16. Die Prüflösungen werden durch Verdünnung einer Stammlösung auf die gewünschten Konzentrationen eingestellt. Die Stammlösung sollte vorzugsweise durch einfaches Mischen oder Einrühren der Prüfchemikalie in das Verdünnungswasser mit mechanischen Mitteln (z. B. Rührwerk und/oder Ultraschall) hergestellt werden. Zur Herstellung einer Stammlösung in geeigneter Konzentration können Sättigungssäulen (Löslichkeitssäulen) oder passive Dosierungsmethoden (6) verwendet werden. Die Verwendung von Lösungsmittelträgern wird nicht empfohlen. Ist jedoch ein Lösungsmittel erforderlich, so sollte parallel eine Lösungsmittelkontrolle mit derselben Konzentration wie bei der Prüfchemikalie geprüft werden, d. h. das Lösungsmittelniveau sollte bei allen Konzentrationen und in der Lösungsmittelkontrolle gleich sein. Bei einigen Verdünnungssystemen kann dies technisch schwierig sein; hier sollte die Lösungsmittelkonzentration in der Lösungsmittelkontrolle der höchsten Lösungsmittelkonzentration in der Behandlungsgruppe entsprechen. Bei schwierig zu prüfenden Stoffen sollte das *OECD Guidance Document No. 23 on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures* herangezogen werden (2). Falls ein Lösungsmittel verwendet wird, hängt die Wahl von den chemischen Eigenschaften des Stoffs ab. Im *OECD Guidance Document No. 23* wird eine Höchstkonzentration von 100 µl/l empfohlen. Um eine potenzielle Wirkung des Lösungsmittels auf die gemessenen Endpunkte zu vermeiden (7), empfiehlt es sich, die Lösungsmittelkonzentration so gering wie möglich zu halten.
17. Bei einer semistatistischen Prüfung können zwei verschiedene Verfahren zur Erneuerung des Prüfmediums eingesetzt werden. Entweder werden neue Prüflösungen in sauberen Gefäßen hergestellt und überlebende Eier und Larven vorsichtig in die neuen Behälter umgesetzt oder die Prüforganismen bleiben in den Prüfgefäßen, während ein Teil (mindestens zwei Drittel) der Prüflösung bzw. des Kontrollvolumens ausgetauscht wird.

## VERFAHREN

### Expositionsbedingungen

#### *Dauer*

18. Die Prüfung sollte sobald wie möglich nach der Befruchtung der Eier beginnen. Die befruchteten Eier sollten vorzugsweise vor Beginn der Furchung der Keimscheibe oder sobald wie möglich nach diesem Stadium in die Prüflösung eingetaucht werden. Die Dauer

der Prüfung ist von der verwendeten Tierart abhängig. Einige Empfehlungen sind Anlage 2 zu entnehmen.

#### *Besatz*

19. Die Anzahl an befruchteten Eiern bei Beginn der Prüfung sollte zur Erfüllung von statistischen Anforderungen hinreichend groß sein. Die Eier sollten nach dem Zufallsprinzip auf die Behandlungen verteilt werden, und je Konzentration sollten mindestens 80 befruchtete Eier, zu gleichen Teilen auf mindestens vier parallele Prüfkammern aufgeteilt, verwendet werden. Die Besatzrate (Biomasse je Volumen an Prüflösung) sollte gering genug sein, dass während des Ei- und Larvenstadiums eine Konzentration an gelöstem Sauerstoff von mindestens 60 % des Luftsauerstoffsättigungswerts ohne Belüftung aufrechterhalten werden kann. Bei Durchflussprüfungen wurde eine Besatzrate von nicht mehr als 0,5 g/l Nassgewicht je 24 Stunden und nicht mehr als 5 g/l Lösung zu jeder Zeit empfohlen (3).

#### *Licht und Temperatur*

20. Fotoperiode und Wassertemperatur sind der geprüften Fischart anzupassen (siehe Anlage 2).

#### *Fütterung*

21. Futter und Fütterung sind von entscheidender Bedeutung. Wichtig ist, dass das für jedes Entwicklungsstadium geeignete Futter ab dem richtigen Zeitpunkt und in ausreichender Menge zur Unterstützung eines normalen Wachstums bereitgestellt wird. Die Fütterung sollte bei allen Replikaten ungefähr gleich sein, außer wenn es zur Berücksichtigung der Mortalität angepasst wird. Überschüssiges Futter und Exkremate sollten gegebenenfalls entfernt werden, um eine Ansammlung von Abfällen zu vermeiden. Ausführliche Fütterungspläne sind Anlage 3 zu entnehmen, doch zur Optimierung von Überlebensrate und Wachstum werden Futter und Fütterungspläne mit zunehmender Erfahrung verfeinert. Lebendfutter sorgt für eine bessere Ausgestaltung des Lebensumfelds und sollte daher anstelle von oder zusätzlich zu Trockenfutter oder gefrorenem Futter verwendet werden, wenn es für die betreffende Fischart und das jeweilige Entwicklungsstadium geeignet ist.

#### *Prüfkonzentrationen*

22. Normalerweise werden fünf Konzentrationen der Prüfchemikalie mit mindestens vier Replikaten pro Konzentration und einem konstanten Abstandsfaktor von maximal 3,2 benötigt. Falls Daten über die akute Toxizität vorliegen, die vorzugsweise an derselben Fischart und/oder durch einen Dosisfindungstest ermittelt wurden, sollten sie bei der Wahl des Bereichs an Prüfkonzentrationen berücksichtigt werden (1). Jedoch sollten bei der

Wahl des Bereichs an Prüfkonzentrationen alle Informationsquellen berücksichtigt werden, einschließlich Quellen wie z. B. *read across*, Daten zur akuten Toxizität bei Fischembryonen. Sollen lediglich empirische NOEC-Werte bestimmt werden, kann ein Limit-Test oder ein erweiterter Limit-Test mit weniger als fünf Konzentrationen als endgültiger Test akzeptabel sein. Die Verwendung von weniger als fünf Konzentrationen muss begründet werden. Höhere Konzentrationen der Prüfchemikalie als die LC<sub>50</sub> über 96 Stunden oder 10 mg/l, je nachdem, welche Konzentration niedriger ist, müssen nicht geprüft werden.

#### *Kontrollen*

23. Zusätzlich zur Reihe der Prüfchemikalienkonzentrationen sollten eine Verdünnungswasserkontrolle und gegebenenfalls eine Lösungsmittelkontrolle, die nur den Lösungsmittelträger enthält, durchgeführt werden (siehe Nummer 16).

#### **Häufigkeit von Analysen und Messungen**

24. Vor Beginn der Exposition ist sicherzustellen, dass das System zur Verteilung der Chemikalie auf alle Replikate einwandfrei funktioniert (z. B. durch Messung der Prüfkonzentrationen). Die erforderlichen Analysemethoden, einschließlich einer geeigneten Bestimmungsgrenze, sollten festgelegt werden, und die Stabilität der Chemikalie im Prüfsystem muss hinreichend bekannt sein. Zur Beschreibung der Exposition sind die Konzentrationen der Prüfchemikalie während der Prüfung in regelmäßigen Zeitabständen zu bestimmen. Mindestens fünf Bestimmungen sind notwendig. In Durchflusssystemen sollte die Prüfchemikalie mindestens einmal pro Woche in einem Replikat pro Konzentration analysiert werden, wobei systematisch zwischen den Replikaten abzuwechseln ist. Durch zusätzliche Analysen lässt sich die Qualität des Prüfergebnisses häufig verbessern. Es kann erforderlich sein, die Proben zu filtrieren (z. B. mit einer Porengröße von 0,45 µm) oder zu zentrifugieren, um Partikel zu entfernen und sicherzustellen, dass die Bestimmungen an der Prüfchemikalie in echter Lösung vorgenommen werden. Um die Adsorption der Prüfchemikalie zu verringern, sollten die Filter vor der Verwendung gesättigt werden. Werden die gemessenen Konzentrationen nicht innerhalb von 80 bis 120 % der Nominalkonzentration gehalten, so sollten die Konzentrationen, die Wirkungen hervorrufen, bestimmt und im Fall von Durchflussprüfungen im Verhältnis zum arithmetischen Mittel der Konzentration (zur Berechnung des arithmetischen Mittels siehe Anlage 6 der Prüfmethode C.20 (8)) und im Fall von semistatischen Prüfungen im Verhältnis zum geometrischen Mittel der gemessenen Konzentrationen ausgedrückt werden (siehe Kapitel 5 im *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures* (2)).



25. Während der Prüfung sind in allen Prüfgefäßen der gelöste Sauerstoff, der pH-Wert und die Temperatur mindestens wöchentlich sowie der Salzgehalt und die Härte, falls relevant, am Anfang und Ende der Prüfung zu messen. Es wird empfohlen, dass die Temperatur in mindestens einem Prüfgefäß kontinuierlich überwacht wird.

### Beobachtungen

26. **Stadium der Embryonalentwicklung:** Das Embryonalstadium zu Beginn der Exposition gegenüber der Prüfchemikalie sollte so genau wie möglich überprüft werden. Dies kann mithilfe einer repräsentativen Probe von Eiern erfolgen, die in geeigneter Form aufbewahrt und gereinigt wurden.
27. **Schlüpfen und Überleben:** Beobachtungen zum Schlüpfen und Überleben sollten zumindest einmal pro Tag erfolgen, und die jeweiligen Zahlen sollten protokolliert werden. Ist in einem frühen Stadium der Embryonalentwicklung Schimmelbefall bei Eiern zu beobachten (z. B. an Tag 1 oder 2 der Prüfung), sollten diese Eier gezählt und entfernt werden. Tote Embryonen, Larven und Jungfische sollten sofort nach Feststellung entfernt werden, da sie sich rasch zersetzen und durch die anderen Fische zerlegt werden können. Bei der Entfernung ist äußerste Sorgfalt angezeigt, um benachbarte Eier/Larven nicht körperlich zu beschädigen. Je nach Fischart und Entwicklungsstadium gelten unterschiedliche Kriterien zur Bestimmung des Todes:
- bei befruchteten Eiern: insbesondere in den frühen Stadien ein deutlich erkennbarer Verlust an Lichtdurchlässigkeit und eine Veränderung der Färbung, hervorgerufen durch Gerinnung und/oder Ausfällung von Eiweiß, was zu einem weiß-opaken Aussehen führt;
  - bei Embryonen, Larven und Jungfischen: fehlende Körperbewegung und/oder fehlende Atembewegung und/oder fehlender Herzschlag und/oder fehlende Reaktion auf mechanische Reize.
28. **Abnormes Aussehen:** Die Anzahl der Larven oder Jungfische, die eine abnorme Körperform aufweisen, sollte in angemessenen Abständen in Abhängigkeit von der Dauer der Prüfung und der Art der beschriebenen Abnormalität protokolliert werden. Zu beachten ist, dass abnorme Larven und Jungfische auch von Natur aus auftreten und bei einigen Arten in der Größenordnung von mehreren Prozent bei den Kontrollen liegen können. Bei so schwerwiegenden Fehlbildungen mit den entsprechenden abnormen Verhaltensweisen, dass der Organismus erheblich leidet und keine Erholung mehr eintritt, kann dieser aus der Prüfung entfernt werden. Solche Tiere sollten getötet und bei der anschließenden Datenanalyse als Sterbefälle behandelt werden. Bei den meisten in dieser Prüfmethode empfohlenen Arten wurde eine normale Embryonalentwicklung dokumentiert (9) (10) (11) (12).

29. **Abnormes Verhalten:** Abnormitäten, z. B. Hyperventilation, unkoordiniertes Schwimmen, atypische Ruhe und atypisches Fressverhalten, sollten in angemessenen Abständen in Abhängigkeit von der Dauer der Prüfung protokolliert werden (z. B. einmal täglich bei Warmwasserarten). Diese Auswirkungen lassen sich zwar nur schwer quantifizieren, können aber bei der Interpretation von Mortalitätsdaten helfen.
30. **Gewicht:** Am Ende der Prüfung werden alle überlebenden Fische mindestens auf Replikatbasis gewogen (wobei die Anzahl der Tiere im Replikat und das mittlere Gewicht pro Tier angegeben wird): das Nassgewicht (trocken getupft) wird bevorzugt, jedoch kann auch das Trockengewicht angegeben werden (13).
31. **Länge:** Am Ende der Prüfung wird die Länge der einzelnen Fische gemessen. Empfohlen wird die Messung der Gesamtlänge; kommt es jedoch zu Schwanzflossenfäule oder Flossenerosion, kann die Standardlänge herangezogen werden. Bei allen Fischen in einer bestimmten Prüfung sollte dieselbe Methode angewandt werden. Die Fische können z. B. entweder mit einem Messschieber, einer Digitalkamera oder einem geeichten Okularmikrometer gemessen werden. Die typischen Mindestlängen sind in Anlage 2 festgelegt.

## DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

### Auswertung der Ergebnisse

32. Der Versuchsplan und die gewählte Statistikmethode sollten eine ausreichende statistische Aussagekraft (mindestens 80 %) besitzen, damit Änderungen von biologischer Bedeutung bei den Endpunkten erkannt werden können, für die eine NOEC anzugeben ist. Die Angabe der Konzentrationen und Parameter, bei denen relevante Wirkungen auftreten, kann vom jeweiligen Rechtsrahmen abhängen. Ist eine  $EC_x$  anzugeben, sollten der Versuchsaufbau und das gewählte Regressionsmodell es erlauben, die  $EC_x$  so zu schätzen, dass i) das für die  $EC_x$  angegebene 95 %-Konfidenzintervall keine Null enthält und nicht übermäßig breit ist, ii) das 95 %-Konfidenzintervall für den vorhergesagten Mittelwert bei der  $EC_x$  nicht den Mittelwert der Kontrolle enthält, und iii) das Regressionsmodell keinen signifikanten *Lack-of-Fit* gegenüber den Daten aufweist. Bei beiden Ansätzen muss die prozentuale Änderung bei jedem Endpunkt festgestellt werden, der nachgewiesen oder geschätzt werden muss. Der Versuchsaufbau sollte entsprechend angepasst werden. Wenn die obigen Bedingungen für die Bestimmung der  $EC_x$  nicht erfüllt sind, sollte der NOEC-Ansatz angewandt werden. Da es unwahrscheinlich ist, dass derselbe Prozentsatz bei allen Endpunkten zutrifft oder dass ein durchführbarer Versuch geplant werden kann, der diese Kriterien bei allen Endpunkten erfüllt, sollte man sich bei der Versuchsplanung auf die Endpunkte konzentrieren, die für den jeweiligen Versuch von Bedeutung sind. Die

Flussdiagramme und Leitlinien für die statistische Vorgehensweise bei jedem Ansatz sind den Anlagen 5 und 6 zu entnehmen und können bei der Auswertung der Daten und bei der Wahl der am besten geeigneten statistischen Prüfung oder des zu verwendenden Modells als Leitlinie herangezogen werden. Es können andere statistische Ansätze angewandt werden, sofern sie wissenschaftlich begründet sind.

33. Streuungen innerhalb jeder Reihe von Replikaten müssen durch Varianzanalyse oder Kontingenztabellenverfahren analysiert werden, und es müssen geeignete statistische Analysemethoden basierend auf dieser Analyse angewandt werden. Für einen Mehrfachvergleich zwischen den Ergebnissen bei den einzelnen Konzentrationen und den Ergebnissen der Kontrollen werden der Jonckheere-Terpstra-Test (Step-Down) oder der Williams-Test bei kontinuierlichen Wirkungen und der Cochran-Armitage-Test (Step-Down) bei quantalen Wirkungen, die einer monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung entsprechen und keine Hinweise auf eine extrabinomiale Varianz zeigen, empfohlen (14). Sind Hinweise auf eine extrabinomiale Varianz vorhanden, wird die Rao-Scott-Abwandlung des Cochran-Armitage-Tests (15) (16) oder der Williams- oder Dunnett-Test (nach einer Arkussinus-Quadratwurzeltransformation) oder der auf Replikatanteile angewandte Jonckheere-Terpstra-Test empfohlen. Entsprechen die Daten keiner monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung, können die Dunnett- oder Dunn- oder Mann-Whitney-Methode bei kontinuierlichen Wirkungen und der exakte Test nach Fisher bei quantalen Wirkungen hilfreich sein (14) (17) (18). Bei der Anwendung jeder statistischen Methode oder jedes statistischen Modells muss darauf geachtet werden, dass die Anforderungen der Methode bzw. des Modells erfüllt werden (z. B. Schätzung der Variabilität von Kammer zu Kammer und Berücksichtigung bei der Versuchsplanung oder dem verwendeten Modell). Die Normalität der Daten ist zu bewerten. In Anlage 5 wird angegeben, wie die Residuen einer ANOVA zu behandeln sind. Anlage 6 enthält zusätzliche Erwägungen zum Regressionsansatz. Zur Einhaltung der Anforderungen eines statistischen Tests sollten Transformationen in Betracht gezogen werden. Jedoch erfordern Transformationen, die die Anpassung eines Regressionsmodells ermöglichen, große Sorgfalt, da beispielsweise eine 25 %ige Änderung bei der nicht transformierten Wirkung nicht einer 25 %igen Änderung bei einer transformierten Wirkung entspricht. In allen Analysen bildet die Prüfkammer und nicht der einzelne Fisch die Analyse- und Versuchseinheit, und sowohl die Hypothesentests als auch die Regression sollten dies widerspiegeln (3) (14) (19) (20).

### **Prüfbericht**

34. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

*Prüfchemikalie:*

**Einkomponentiger Stoff:**

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar usw. (einschließlich des Gehalts an organischem Kohlenstoff, falls zutreffend)

**Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:**

- so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten

***Gepriüfte Fischart:***

- wissenschaftliche Bezeichnung, Stamm, Herkunft und Art der Sammlung der befruchteten Eier sowie anschließende Handhabung

***Prüfbedingungen:***

- angewandtes Prüfverfahren (z. B. semistatisches oder Durchflussverfahren, Besatz);
- Fotoperiode(n);
- Auslegung der Prüfung (z. B. Anzahl der Prüfkammern und Replikate, Anzahl an Eiern je Replikat, Material und Größe der Prüfkammer (Höhe, Breite, Volumen), Wasservolumen pro Prüfkammer);
- Methode zur Herstellung von Stammansätzen und Häufigkeit der Erneuerung (falls verwendet, sind der Lösungsvermittler und seine Konzentration anzugeben);
- Methode zur Dosierung der Prüfchemikalie (z. B. Pumpen, Verdünnungssysteme);
- Wiederfindungsrate der Methode und nominelle Prüfkonzentrationen, Bestimmungsgrenze, Mittel der gemessenen Werte mit ihren Standardabweichungen in den Prüfgefäßen sowie das Verfahren, durch das diese ermittelt wurden, sowie Nachweise dafür, dass sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfchemikalie in echter Lösung beziehen;

- Eigenschaften des Verdünnungswassers: pH-Wert, Härte, Temperatur, Konzentration des gelösten Sauerstoffs, Restchlor (falls gemessen), gesamter organischer Kohlenstoff (falls gemessen), Schwebstoffe (falls gemessen), Salzgehalt des Prüfmediums (falls gemessen) sowie alle sonstigen durchgeführten Messungen;
- Wasserqualität innerhalb der Prüfgefäße: pH-Wert, Härte, Temperatur und Konzentration des gelösten Sauerstoffs;
- ausführliche Angaben zur Fütterung (z. B. Art des Futters, Herkunft, Fütterungsmenge und -häufigkeit).

*Ergebnisse, einzeln (oder auf Replikbasis) sowie als Mittelwert und gegebenenfalls Variationskoeffizient für die folgenden Endpunkte angeben:*

- Nachweis, dass die Kontrollen den allgemeinen Standard bezüglich der Annehmbarkeit der Überlebensraten für die geprüfte Art erfüllen (Anlage 2);
  - Daten zur Mortalität in jedem Stadium (Embryo, Larve und Jungfisch) sowie Gesamtmortalität;
  - Tage bis zum Schlüpfen, Anzahl der täglich geschlüpften Larven und Ende des Schlüpfens;
  - Anzahl der gesunden Fische am Ende der Prüfung;
  - Angaben zur Länge (entweder Standard- oder Gesamtlänge angeben) und zum Gewicht der überlebenden Tiere;
  - Vorkommen, Beschreibung und Anzahl morphologischer Abnormitäten, soweit zutreffend;
  - Vorkommen, Beschreibung und Anzahl von Auswirkungen auf das Verhalten, soweit zutreffend;
  - Ansatz der statistischen Analyse (Regressionsanalyse oder Varianzanalyse) und Auswertung der Daten (angewandter statistischer Test oder angewandtes Modell);
  - NOEC (*No Observed Effect Concentration*) für jede bewertete Wirkung;
  - LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*) (bei  $p = 0,05$ ) für jede bewertete Wirkung;

- $EC_x$  für jede bewertete Wirkung, falls zutreffend, und Konfidenzintervalle (z. B. 90 % oder 95 %) und ein Diagramm des angepassten Modells, das für deren Berechnung benutzt wurde, die Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die Formel des Regressionsmodells, die geschätzten Modellparameter und deren Standardfehler.

*Eine eventuelle Abweichung von der Prüfmethode.*

*Erörterungen der Ergebnisse, einschließlich etwaiger Einflüsse von Abweichungen von der Prüfmethode auf das Ergebnis der Prüfung.*

**Tabelle 1:** Für die Prüfung empfohlene Fischarten

SÜSSWASSER	FLUSSMÜNDUNGS- und SALZWASSER
<u><i>Oncorhynchus mykiss</i></u> Regenbogenforelle	<u><i>Cyprinodon variegatus</i></u> Edelsteinkärpfling
<u><i>Pimephales promelas</i></u> Dickkopfelnitz	<u><i>Menidia sp.</i></u> Gezeiten-Ährenfisch
<u><i>Danio rerio</i></u> Zebrabärbling	
<u><i>Oryzias latipes</i></u> Japanischer Reiskärpfling	

## LITERATURHINWEISE

- (1) OECD (2012), *Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 171*, OECD, Paris.
- (2) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23*, OECD Paris.
- (3) ASTM (1988), *Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes*. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 ff.
- (4) Brauhn, J.L. und R.A. Schoettger (1975), *Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011*, Duluth, Minnesota.
- (5) Brungs, W.A. und B.R. Jones (1977), *Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061*, Duluth, Minnesota.
- (6) Adolfsson-Erici, et al. (2012), *A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests*, *Chemosphere* 86, 593-599.
- (7) Hutchinson, T.H. et al. (2006), *Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology*, 76, 69-92.
- (8) Kapitel C.20, *Daphnia magna*-Reproduktionstest.
- (9) Hansen, D.J. und P.R. Parrish (1977), *Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.
- (10) Kimmel, H. B. et al. (1995), *Stages of embryonic development of the zebrafish*. *Developmental Dynamics*, 203:253-310.
- (11) Gonzalez-Doncel, M. et al. (2005), *A quick reference guide to the normal development of Oryzias latipes (Teleostei, Adrinichthyidae)* *Journal of Applied Ichthyology*, 20:1-14.

- (12) Devlin, E.W. et al. (1996), *Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque*. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C.
- (13) Oris, J.T., S.C. Belanger und A.J. Bailer, (2012), *Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test*, *Environmental Toxicology and Chemistry* 31; 2, 370-376.
- (14) OECD (2006). *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, *Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54*, OECD, Paris.
- (15) Rao, J.N.K. und A.J. Scott (1992), *A simple method for the analysis of clustered binary data*, *Biometrics* 48, 577-585.
- (16) Rao, J.N.K. und A.J. Scott (1999), *A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data*, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.
- (17) Dunnett C.W. (1955), *A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control*, *Journal of American Statistical Association*, 50, 1096--1121.
- (18) Dunnett C.W. (1964), *New tables for multiple comparisons with a control*. *Biometrics*, 20, 482-491.
- (19) Rand, G.M. und S.R. Petrocelli (1985), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Hemisphere Publication Corporation, New York.
- (20) McClave, J.T., J.H. Sullivan und J.G. Pearson (1980). *Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data*, *Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium*, ASTM, Philadelphia.



## Anlage 1

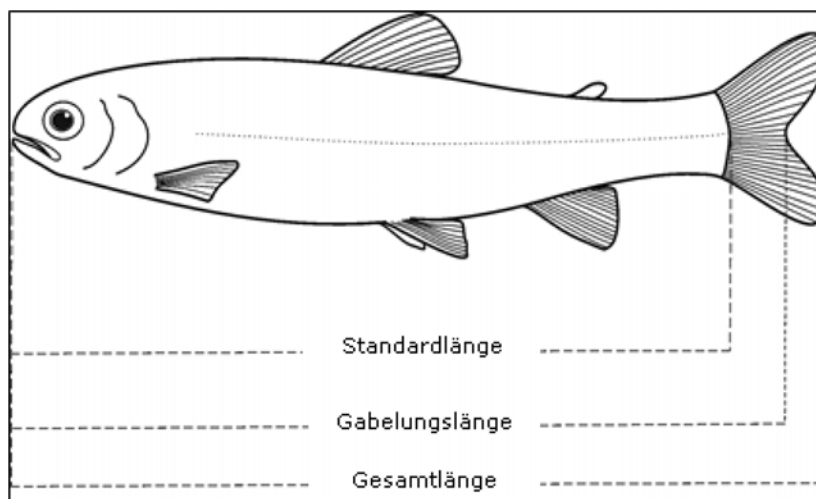
### DEFINITIONEN

**Chemikalie:** Stoff oder Gemisch.

**EC<sub>x</sub>:** (Konzentration mit einer Wirkung von x %) die Konzentration, die innerhalb einer gegebenen Expositionsdauer im Vergleich zur Kontrolle eine Wirkung von x % auf die Prüforganismen kommt. Eine EC<sub>50</sub> beispielsweise ist die Konzentration, bei der davon ausgegangen wird, dass sie bei 50 % einer exponierten Population während einer bestimmten Expositionsdauer eine Wirkung auf einen Endpunkt der Prüfung hat.

**Gabelungslänge:** die Länge von der Spitze des Fischmauls bis zum Ende der mittleren Schwanzflossenstrahlen; wird bei Fischen verwendet, bei denen das Ende der Wirbelsäule schwer zu bestimmen ist ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org))

**Gesamtlänge:** die Länge von der Spitze des Fischmauls bis zur Spitze des längeren Lappens der Schwanzflosse; wird gewöhnlich mit entlang der Mittellinie zusammengehaltenen Lappen gemessen. Es wird in gerader Linie gemessen, nicht entlang der Körperkrümmung. ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org))



**Abbildung 1:** Beschreibung der verschiedenen verwendeten Längen

**IUPAC:** International Union of Pure and Applied Chemistry.

**Lowest observed effect concentration (LOEC):** die niedrigste geprüfte Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der sich im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Wirkung beobachten lässt (bei  $p < 0,05$ ). Alle Prüfkonzentrationen oberhalb der LOEC müssen jedoch eine schädigende Wirkung haben, die den bei der LOEC beobachteten Wirkungen entspricht oder größer ist. Können diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden, muss ausführlich erklärt werden, wie die LOEC (und damit auch die NOEC) ausgewählt wurde. Weitere Hinweise sind den Anlagen 5 und 6 zu entnehmen.

**No observed effect concentration (NOEC):** die Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, die im Vergleich zur Kontrolle innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums keine statistisch signifikante Wirkung ( $p < 0,05$ ) hat.

**Prüfchemikalie:** Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

**SMILES:** Simplified Molecular Input Line Entry Specification.

**Standardlänge:** die Länge eines Fisches, gemessen von der Spitze des Fischmauls bis zum hinteren Ende des letzten Wirbels oder bis zum hinteren Ende des mittellateralen Teils der Hypuralplatte. Einfach ausgedrückt, wird bei diesem Maß die Schwanzflosse nicht mitgemessen ([www.fishbase.org](http://www.fishbase.org))

**UVCB-Stoffe:** Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

## Anlage 2

### PRÜFBEDINGUNGEN, DAUER UND ÜBERLEBENSKRITERIEN FÜR EMPFOHLENE FISCHARTEN

FISCHART	PRÜFBEDINGUNGEN			EMPFOHLENE DAUER DER PRÜFUNG	Typische mittlere Mindestgesamtlänge der Kontrollfische am Ende der Prüfung (mm) <sup>(1)</sup>	ÜBERLEBENSRATE IN DER KONTROLLE (Minimum)	
	Temperatur (°C)	Salzgehalt (‰/‰)	Fotoperiode (Std.)			Schlupferfolg	Nach dem Schlüpfen
<b>Süßwasser</b>							
<u><i>Oncorhynchus mykiss</i></u> Regenbogenforelle	10 ± 1,5 <sup>(2)</sup>		12 - 16 <sup>(3)</sup>	2 Wochen nach freiem Fressen der Kontrollfische (oder 60 Tage nach Schlüpfen)	40	75 %	75 %
<u><i>Pimephales promelas</i></u> Dickkopfelritze	25 ± 1,5		16	32 Tage ab Beginn der Prüfung (oder 28 Tage nach dem Schlüpfen)	18	70 %	75 %
<u><i>Danio rerio</i></u> Zebrabärbling	26 ± 1,5		12 - 16 <sup>(4)</sup>	30 Tage nach dem Schlüpfen	11	70 %	75 %
<u><i>Oryzias latipes</i></u> Japanischer Reiskärpfling	25 ± 2		12 - 16 <sup>(4)</sup>	30 Tage nach dem Schlüpfen	17	80 %	80 %
<b>Flussmündungswasser und Salzwasser</b>							
<u><i>Cyprinodon variegatus</i></u> Edelsteinkärpfling	25 ± 1,5	15-35 <sup>(5)</sup>	12 - 16 <sup>(4)</sup>	32 Tage ab Beginn der Prüfung (oder 28 Tage nach dem Schlüpfen)	17	75 %	80 %
<u><i>Menidia sp.</i></u> Gezeiten-Ährenfisch	22 - 25	15-35 <sup>(5)</sup>	13	28 Tage	20	80 %	60 %



Legende:

- 1) Die typische mittlere Mindestgesamtlänge ist zwar kein Validitätskriterium, jedoch sollten Abweichungen unterhalb des angegebenen Werts sorgfältig im Hinblick auf die Empfindlichkeit der Prüfung untersucht werden. Die mittlere Mindestgesamtlänge wird von einer Auswahl der zum gegenwärtigen Zeitpunkt vorliegenden Daten abgeleitet.
- 2) Der jeweils geprüfte Regenbogenforellenstamm muss möglicherweise bei anderen Temperaturen gehalten werden. Der Zuchtbestand muss bei derselben Temperatur gehalten werden wie die Eier. Nach Erhalt der Eier von einem kommerziellen Züchter ist nach dem Eintreffen eine kurze Anpassung (z. B. 1-2 Stunden) an die Prüftemperatur notwendig.
- 3) Dunkelheit für Larven bis eine Woche nach dem Schlüpfen, außer wenn sie überprüft werden, dann gedämpfte Beleuchtung während der gesamten Prüfung (12-16 Stunden Fotoperiode)<sup>(4)</sup>.
- 4) Bei gegebenen Prüfbedingungen sollten die Lichtverhältnisse konstant sein.
- 5) Darf bei keiner Prüfung um mehr als  $\pm 2 \text{ ‰}$  schwanken.

**Anlage 3**

**LEITLINIE ZUR FÜTTERUNG UND HANDHABUNG VON ZUCHT- UND PRÜFTIEREN DER EMPFOHLENE ARTEN**

FISCHART	FUTTER*					UMSETZZEIT- PUNKT NACH DEM SCHLÜPFEN	ZEIT BIS ZUR ERSTEN FÜTTERUNG
	Zuchtfische	Frisch geschlüpfte Larven	Jungfische		Häufigkeit		
			Typ	Startfutter für Regenbogenforellen, BSN			
<b>Süßwasser:</b>							
<u><i>Oncorhynchus mykiss</i></u> Regenbogenforelle	Forellenfutter	kein Futter <sup>(a)</sup>	Startfutter für Regenbogenforellen, BSN	2-4 Fütterungen pro Tag	14-16 Tage nach dem Schlüpfen oder beim Aufschwimmen (fakultativ)	19 Tage nach dem Schlüpfen oder beim Aufschwimmen	
<u><i>Pimephales promelas</i></u> Dickkopflritze	BSN, Flockenfutter, FBS	BSN	BSN48, Flockenfutter	2-3-mal täglich	bei Schlupfrate von 90 %	2 Tage nach dem Schlüpfen	
<u><i>Danio rerio</i></u> Zebrabärbling	BSN, Flockenfutter	Handelsübliches Larvenfutter, Protozoa <sup>(b)</sup> , Protein <sup>(c)</sup>	BSN48, Flockenfutter,	BSN einmal täglich; Flockenfutter 2-mal täglich	bei Schlupfrate von 90 %	2 Tage nach dem Schlüpfen	
<u><i>Oryzias latipes</i></u> Japanischer Reiskarpfing	Flockenfutter	BSN, Flockenfutter (oder Protozoa oder Rädertierchen)	BSN48, Flockenfutter (oder Rädertierchen)	BSN einmal täglich; Flockenfutter 2-mal täglich <u>oder</u> Flockenfutter und Rädertierchen einmal täglich	nicht zutreffend	6-7 Tage nach dem Laichen	
<b>Flussmündungs- und Salzwasser:</b>							
<u><i>Cyprinodon variegatus</i></u> Edelsteinkarpfing	BSN, Flockenfutter, FBS	BSN	BSN48	2-3 Fütterungen pro Tag	nicht zutreffend	1 Tag nach dem Schlüpfen/Aufschwim- men	
<u><i>Menidia sp.</i></u>	BSN48, Flockenfutter	BSN	BSN48	2-3 Fütterungen pro Tag	nicht zutreffend	1 Tag nach dem Schlüpfen/Aufschwim- men	

Gezeiten-Ährenfisch					men
---------------------	--	--	--	--	-----

Legende:

\* Futter sollte bis zur Sättigung gegeben werden. Überschüssiges Futter und Exkremente sollten erforderlichenfalls entfernt werden, um eine Ansammlung von Abfällen zu vermeiden.

FBS Frozen Brine Shrimps (gefrorene Artemia), adulte Artemia sp

BSN Brine Shrimp Nauplii (Artemianauplien), frisch geschlüpft

BSN48 Brine Shrimp Nauplii (Artemianauplien), 48 Stunden alt

a) Larven mit Dottersack benötigen kein Futter

b) filtriert aus gemischter Kultur

c) Granulate aus Fermentationsprozess

#### Anlage 4

### CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS

<b>Komponente</b>	<b>Höchstkonzentration</b>
Partikel	5 mg/l
Gesamter organischer Kohlenstoff	2 mg/l
Nicht ionisierter Ammoniak	1 µg/l
Restchlor	10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden und polychlorierten Biphenylen	50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	25 ng/l
Aluminium	1 µg/l
Arsen	1 µg/l
Chrom	1 µg/l
Cobalt	1 µg/l
Kupfer	1 µg/l
Eisen	1 µg/l
Blei	1 µg/l
Nickel	1 µg/l
Zink	1 µg/l
Cadmium	100 ng/l
Quecksilber	100 ng/l
Silber	100 ng/l



## Anlage 5

### LEITLINIE FÜR DIE STATISTISCHE ANALYSE DER NOEC-BESTIMMUNG

#### Allgemeines

Analyseeinheit ist das Replikatgefäß. Bei kontinuierlichen Messungen, wie z. B. Größe, sollte der Mittelwert oder Median der Replikate berechnet werden, und diese Replikatwerte sind die zu analysierenden Daten. Die Aussagekraft der durchgeführten Prüfungen sollte nachgewiesen werden, vorzugsweise auf der Grundlage einer historischen Datenbank für jedes Labor. Die Größenordnung der Wirkung, die bei einer statistischen Aussagekraft von 75-80 % festgestellt wird, sollte für jeden Endpunkt bei dem zu verwendenden statistischen Test angegeben werden.

In den Datenbanken, die zum Zeitpunkt der Entwicklung dieser Prüfmethode verfügbar sind, ist die Aussagekraft, die im Rahmen der empfohlenen statistischen Verfahren möglich ist, angegeben. Ein Labor sollte nachweisen, dass es diese geforderte statistische Aussagekraft erreichen kann, indem es entweder eine eigene Analyse der Teststärke anstellt oder nachweist, dass der Variationskoeffizient (VK) bei jeder Wirkung nicht über dem 90. Perzentil der bei der Ausarbeitung der Prüfrichtlinie herangezogenen Variationskoeffizienten liegt. Diese Variationskoeffizienten sind in Tabelle 1 angegeben. Sind nur Replikat-Mittelwerte oder -Mediane verfügbar, kann der Variationskoeffizient innerhalb der Replikate ignoriert werden.

**Tabelle 1:** 90. Perzentil der Variationskoeffizienten für ausgewählte Süßwasserarten

<b>Spezies</b>	<b>Wirkung</b>	<b>VK_zwischen Replikaten</b>	<b>VK_innenhalb von Replikaten</b>
Regenbogenforelle	Länge	17,4	9,8
	Gewicht	10,1	28
Dickkopfelritze	Länge	16,9	13,5
	Gewicht	11,7	38,7
Zebrabärbling	Länge	43,7	11,7
	Gewicht	11,9	32,8

Bei fast allen statistischen Tests zur Bewertung von Labor-Toxizitätsstudien geht es um den Vergleich zwischen Behandlungsgruppen und Kontrollen. Aus diesem Grund ist es nicht

angezeigt, vor einem Dunnett- oder Williams-Test einen statistisch signifikanten ANOVA-F-Test oder vor einem Jonckheere-Terpstra-, Mann-Whitney- oder Dunn-Test einen statistisch signifikanten Kruskal-Wallis-Test zu verlangen (Hochberg und Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson et al. 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

Der Dunnett-Test beinhaltet eine integrierte Multiplizitätsanpassung, und durch die Anwendung des F-Tests als Referenz werden die Falsch-Positiv- und Falsch-Negativ-Raten negativ beeinflusst. Ebenso erhalten der Williams- (Step-Down) und Jonckheere-Terpstra-Test unter Verwendung eines Signifikanzwerts von 0,05 bei jedem Schritt eine Falsch-Positiv-Rate von insgesamt 5 %, wobei diese Rate und die Aussagekraft der Tests durch Verwendung des F-Tests oder Kruskal-Wallis-Tests als Referenz negativ beeinflusst werden. Der Mann-Whitney- und Dunn-Test müssen hinsichtlich der Multiplizität angepasst werden und die Bonferroni-Holm-Korrektur wird empfohlen.

Im Dokument OECD (2006) ist eine ausführliche Erörterung der meisten Empfehlungen zur Hypothesentestung und zur Überprüfung der diesen Tests zugrunde liegenden Annahmen sowie eine umfassende Bibliographie zu finden.

### **Behandlung der Kontrollen bei Verwendung eines Lösungsmittels**

Wird ein Lösungsmittel verwendet, sollte sowohl eine Verdünnungswasserkontrolle als auch eine Lösungsmittelkontrolle einbezogen werden. Die beiden Kontrollen sollten in Bezug auf jede Wirkung verglichen und für die statistische Analyse miteinander kombiniert werden, falls kein signifikanter Unterschied zwischen ihnen festgestellt wird. Ansonsten sollte die Lösungsmittelkontrolle für die NOEC-Bestimmung oder  $EC_x$ -Schätzung verwendet und die Verdünnungswasserkontrolle nicht verwendet werden. Siehe Einschränkung der Validitätskriterien (Nummer 7).

Für Länge, Gewicht, Anteil an ausgeschlüpften Eiern, Larvenmortalität oder abnorme Larven sowie den ersten oder letzten Schlüpf- oder Aufschwimmtag sollten die Verdünnungswasserkontrolle und die Lösungsmittelkontrolle unter Verwendung eines Signifikanzwerts von 0,05 mit einem T-Test oder Mann-Whitney-Test verglichen werden, wobei alle Behandlungsgruppen außer Acht gelassen werden. Die Ergebnisse dieser Tests sollten angegeben werden.

### **Größenmessungen (Länge und Gewicht)**

Die einzelnen Fischlängen- und Fischgewichtswerte können normalverteilt oder logarithmisch normalverteilt sein. In beiden Fällen tendieren die Mittelwerte der Replikate zu

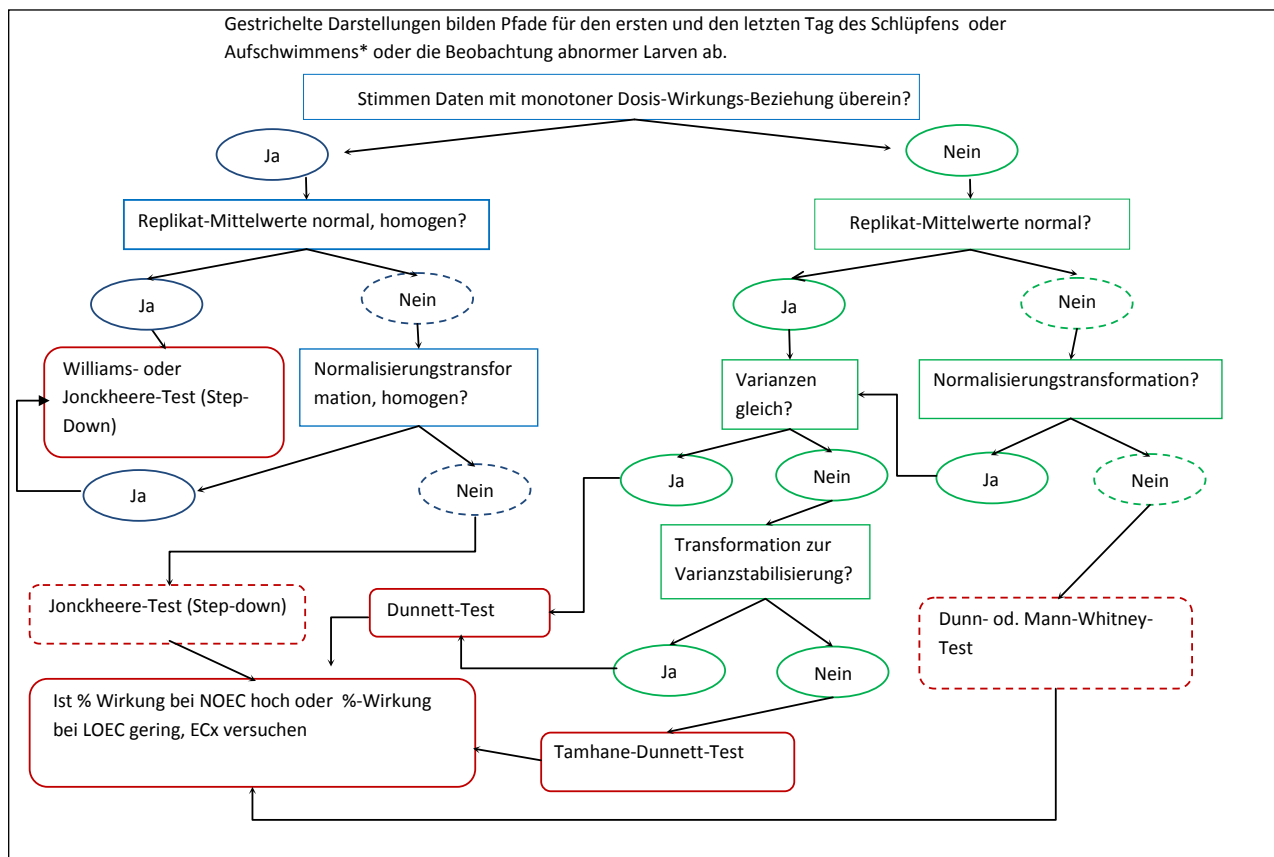
einer Normalverteilung entsprechend dem Zentralen Grenzwertsatz, was durch Daten aus mehr als 100 ELS-Studien an drei Süßwasserarten bestätigt wurde. Wenn die Daten oder historischen Datenbanken auf eine logarithmische Normalverteilung bei individuellen Fischgrößenwerten hindeuten, kann der mittlere Logarithmus der Replikate der einzelnen Fischwerte berechnet werden, und die Daten für die Analyse können dann die Antilogarithmen dieser mittleren Logarithmen der Replikate sein.

Die Daten sollten auf Übereinstimmung mit einer Normalverteilung und die Einhaltung der Varianzhomogenität überprüft werden. Zu diesem Zweck sollten die Residuen eines ANOVA-Modells mit der Konzentration als einzige erläuternde Variable verwendet werden. Die visuelle Bestimmung anhand von Streudiagrammen und Histogrammen oder Stamm-Blatt-Diagrammen stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar. Alternativ kann ein formaler Test wie z. B. Shapiro-Wilk oder Anderson-Darling durchgeführt werden. Die Einhaltung der Varianzhomogenität kann anhand einer visuellen Überprüfung desselben Streudiagramms oder formal durch einen Levene-Test bewertet werden. Nur parametrische Tests (z. B. Williams, Dunnett) müssen hinsichtlich Normalität oder Varianzhomogenität bewertet werden.

Etwaige Ausreißer und deren Auswirkung auf die Analyse sollten beachtet werden. Der Ausreißertest nach Tukey und die visuelle Überprüfung der oben beschriebenen Residuendiagramme können herangezogen werden. Ferner ist zu beachten, dass es sich bei Beobachtungen um ganze Replikate handelt, sodass ein Ausreißer nur nach sorgfältiger Abwägung in der Analyse unberücksichtigt bleiben sollte.

Die statistischen Tests, bei denen die Merkmale des Versuchsplans und die biologischen Erwartungen genutzt werden, sind Step-Down-Trendtests, wie z. B. Williams und Jonckheere-Terpstra. Bei den Tests wird von einer monotonen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ausgegangen, und die Daten sollten auf Übereinstimmung mit dieser Annahme überprüft werden. Dies kann visuell anhand eines Streudiagramms der Replikat-Mittelwerte im Verhältnis zur Prüfkonzentration erfolgen. Dieses Streudiagramm sollte mit einem linearen Diagramm überlagert werden, bei dem die nach Replikatprobengröße gewichteten Konzentrationsmittelwerte miteinander verbunden werden. Eine starke Abweichung dieses linearen Diagramms von der Monotonie würde darauf hindeuten, dass möglicherweise andere Tests als Trendtests verwendet werden sollten. Alternativ können formale Tests verwendet werden. Bei einem einfachen linearen Test werden die linearen und quadratischen Kontraste der Konzentrationsmittelwerte berechnet. Wenn der quadratische Kontrast signifikant und der lineare Kontrast nicht signifikant ist, deutet dies auf ein mögliches Monotonieproblem hin, das anhand von Diagrammen näher untersucht werden sollte. Wenn Normalität oder Varianzhomogenität möglicherweise ein Problem darstellen, können diese Kontraste aus in Rangfolge transformierten Daten abgeleitet werden. Alternative Verfahren wie beispielsweise der Monotonietest nach Bartholomew können zwar verwendet werden,

erhöhen aber die Komplexität.



**Abbildung 2:** NOEC-Flussdiagramm für Größenmessungen (Länge und Gewicht)

\*Diese Wirkungen erfüllen nie die Annahmen für parametrische Analysen oder Modelle.

Die NOEC wird durch eine Step-Down-Anwendung des Williams- oder Jonckheere-Terpstra-Tests bestimmt, außer wenn die Daten die Anforderungen dieser Tests nicht erfüllen. Nähere Informationen über diese Verfahren sind OECD (2006) zu entnehmen. Bei Daten, die die Anforderungen eines Step-Down-Trendtests nicht erfüllen, kann der Dunnett- oder der Tamhane-Dunnett-Test (T3) angewandt werden, die beide Anpassungen hinsichtlich der Multiplizität enthalten. Bei diesen Tests wird von Normalität und im Fall von Dunnett von Varianzhomogenität ausgegangen. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, kann der nichtparametrische Test nach Dunn angewandt werden. Nähere Informationen zu all diesen Tests sind OECD (2006) zu entnehmen. Abbildung 2 zeigt eine Übersicht als Entscheidungshilfe für die Wahl des am besten geeigneten Tests.

## Schlupferfolg und Überlebensrate der Larven

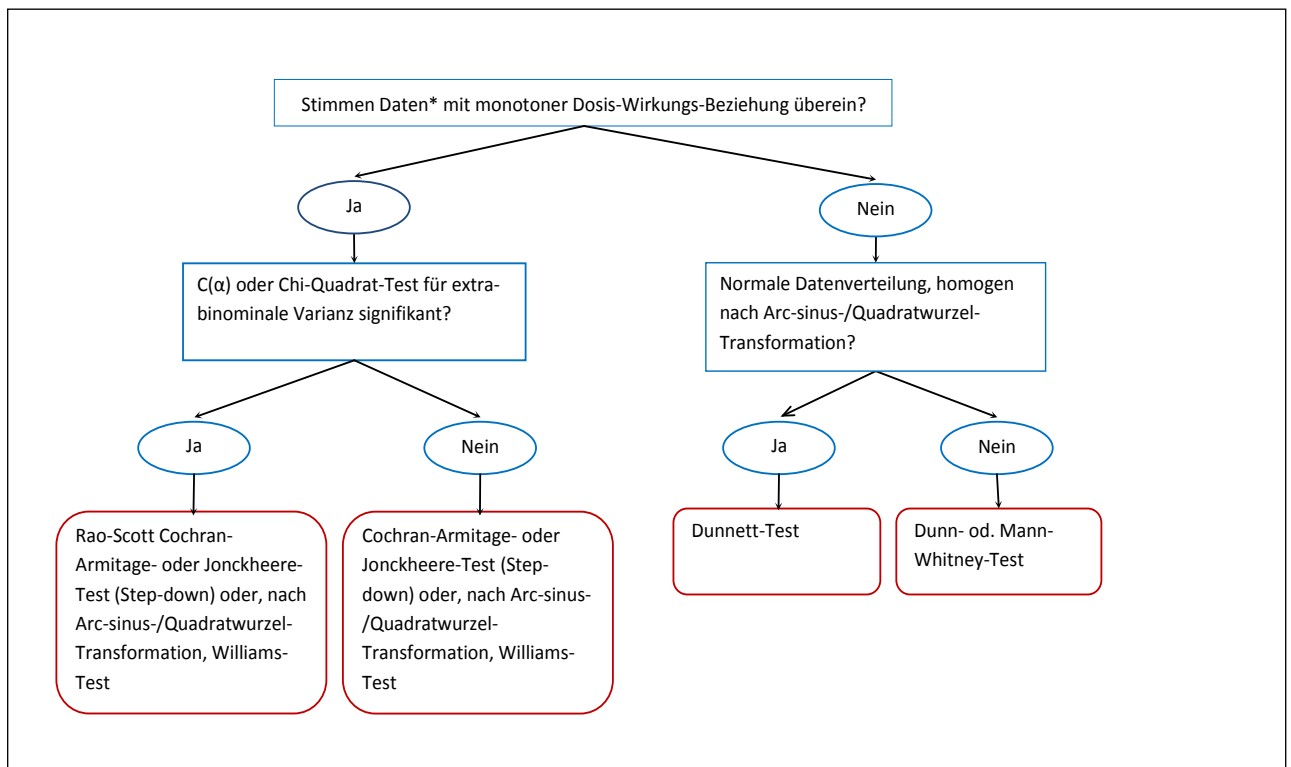
Die Daten beziehen sich auf die Anteile an ausgeschlüpften Eiern oder an überlebenden Larven in den einzelnen Replikaten. Diese Anteile sollten in Bezug auf extrabinomiale Varianz überprüft werden, die bei solchen Messungen zwar üblich ist, aber nicht generell auftritt. Das Flussdiagramm in Abbildung 3 dient als Orientierung für die Auswahl des Tests; ausführliche Beschreibungen sind dem Text zu entnehmen.

Im Allgemeinen kommen zwei Tests zur Anwendung. Hierbei handelt es sich um den Tarone-C( $\alpha$ )-Test (Tarone, 1979) und den Chi-Quadrat-Test, die jeweils separat bei jeder Prüfkonzentration angewandt werden. Wird auch in nur einer Prüfkonzentration extrabinomiale Varianz festgestellt, dann sollten dementsprechende Methoden angewandt werden.

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^m \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1 - \hat{p})} - \sum_{j=1}^m n_j}{\{2 \sum_{j=1}^m n_j (n_j - 1)\}^{1/2}}$$

**Formel 1:** Tarone-C( $\alpha$ )-Test (Tarone 1979)

Hierbei gilt:  $\hat{p}$  ist der mittlere Anteil bei einer bestimmten Konzentration,  $m$  ist die Anzahl der Replikatgefäße,  $n_j$  ist die Anzahl der Versuchssubjekte in Replikat  $j$  und  $x_j$  ist die Anzahl der reagierenden Versuchssubjekte in diesem Replikat, z. B. nicht geschlüpft oder tot. Der Test wird auf jede Konzentration separat angewandt. Dieser Test kann als angepasster Chi-Quadrat-Test angesehen werden, jedoch haben von Tarone durchgeführte Limited-Power-Simulationen gezeigt, dass er eine stärkere Aussagekraft besitzt als ein Chi-Quadrat-Test.



**Abbildung 3:** NOEC-Flussdiagramm für Schlupferfolg und Larvenmortalität

\* Die zu analysierenden Daten sind die Anteile in jedem Replikat.

Gibt es keine signifikanten Hinweise auf eine extrabinomiale Varianz, kann der Cochran-Armitage-Test (Step-Down) angewandt werden. Bei diesem Test werden Replikate ignoriert. Wenn daher solche Hinweise vorliegen, wird die Rao-Scott-Anpassung des Cochran-Armitage-Tests (RSCA) empfohlen, bei der Replikate, Replikatgrößen und extrabinomiale Varianz berücksichtigt werden. Zu alternativen Tests zählen die Williams- und Jonckheere-Terpstra-Tests (Step-Down) sowie der Dunnett-Test, wie bei den Größenmessungen beschrieben. Diese Tests gelten unabhängig davon, ob eine extrabinomiale Varianz vorliegt oder nicht, besitzen aber eine etwas geringere Aussagekraft (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao und Scott 1992, 1999, Fung et al. 1994, 1996).

### Erster oder letzter Schlüpf- oder Aufschwimmtag

Das Ergebnis ist eine ganze Zahl, die den Versuchstag angibt, an dem die betreffende

Beobachtung bei einem bestimmten Replikatgefäß festgestellt wird. Der Wertebereich ist im Allgemeinen sehr begrenzt und umfasst häufig hohe Anteile von verbundenen Werten, z. B. in der Form, dass der erste Schlüpftag in allen Kontrollreplikaten und vielleicht in ein oder zwei der niedrigen Prüfkonzentrationen identisch ist. Parametrische Tests wie z. B. der Williams- und der Dunnett-Test sind für solche Daten ungeeignet. Außer wenn Hinweise auf eine erhebliche Nicht-Monotonie vorliegen, ist der Jonckheere-Terpstra-Test (Step-Down) ein leistungsfähiges Instrument, um die Wirkungen der Prüfchemikalie nachzuweisen. Ansonsten kann der Dunn-Test angewandt werden.

### **Abnormitäten von Larven**

Das Ergebnis ist die Anzahl an Larven, bei denen irgendeine Art von Abnormität festgestellt wird. Die Inzidenz ist häufig gering. Außerdem zeigen sich z. T. die gleichen Probleme wie beim ersten Schlüpftag sowie eine unregelmäßige Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Wenn die Daten zumindest grob einen monotonen Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ergeben, stellt der Jonckheere-Terpstra-Test (Step-Down) ein leistungsfähiges Instrument zum Nachweis der Wirkungen dar. Andernfalls kann der Dunn-Test angewandt werden.

## Literaturhinweise

Agresti, A. (2002); *Categorical Data Analysis*, zweite Auflage, Wiley, Hoboken.

Dunnnett C.W. (1955); *A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control*, *J. American Statistical Association* 50, 1096-1121.

Dunn O.J. (1964); *Multiple Comparisons Using Rank Sums*, *Technometrics* 6, 241-252.

Dunnnett C.W. (1964); *New tables for multiple comparisons with a control*, *Biometrics* 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); *Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data*, *Risk Analysis* 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); *A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay*, *Canadian Journal of Statistics* 24, 431-454.

Hochberg, Y. und A. C. Tamhane (1987); *Multiple Comparison Procedures*, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); *Multiple Comparisons: Theory and Methods*; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A.R. (1954); *A distribution-free k-sample test against ordered alternatives*, *Biometrika* 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

OECD (2006). *Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment, No. 54*. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.



Rao J.N.K. und Scott A.J. (1992) - *A simple method for the analysis of clustered binary data*, *Biometrics* 48, 577-585.

Rao J.N.K. und Scott A.J. (1999) - *A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data*, *Statistics in Medicine* 18, 1373-1385.

Robertson T., Wright F.T. und Dykstra R.L. (1988); *Order restricted statistical inference*, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); *Testing the goodness of fit of the Binomial distribution*, *Biometrika* 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); *A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control*, *Biometrics* 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); *The comparison of several dose levels with a zero dose control*, *Biometrics* 28, 519-531.

Williams D.A. (1975); *The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology*, *Biometrics* 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); *Some inference procedures for monotonically ordered normal means*, *Biometrika* 64, 9-14.

## Anlage 6

### LEITLINIE FÜR STATISTISCHE REGRESSIONSANALYSEN

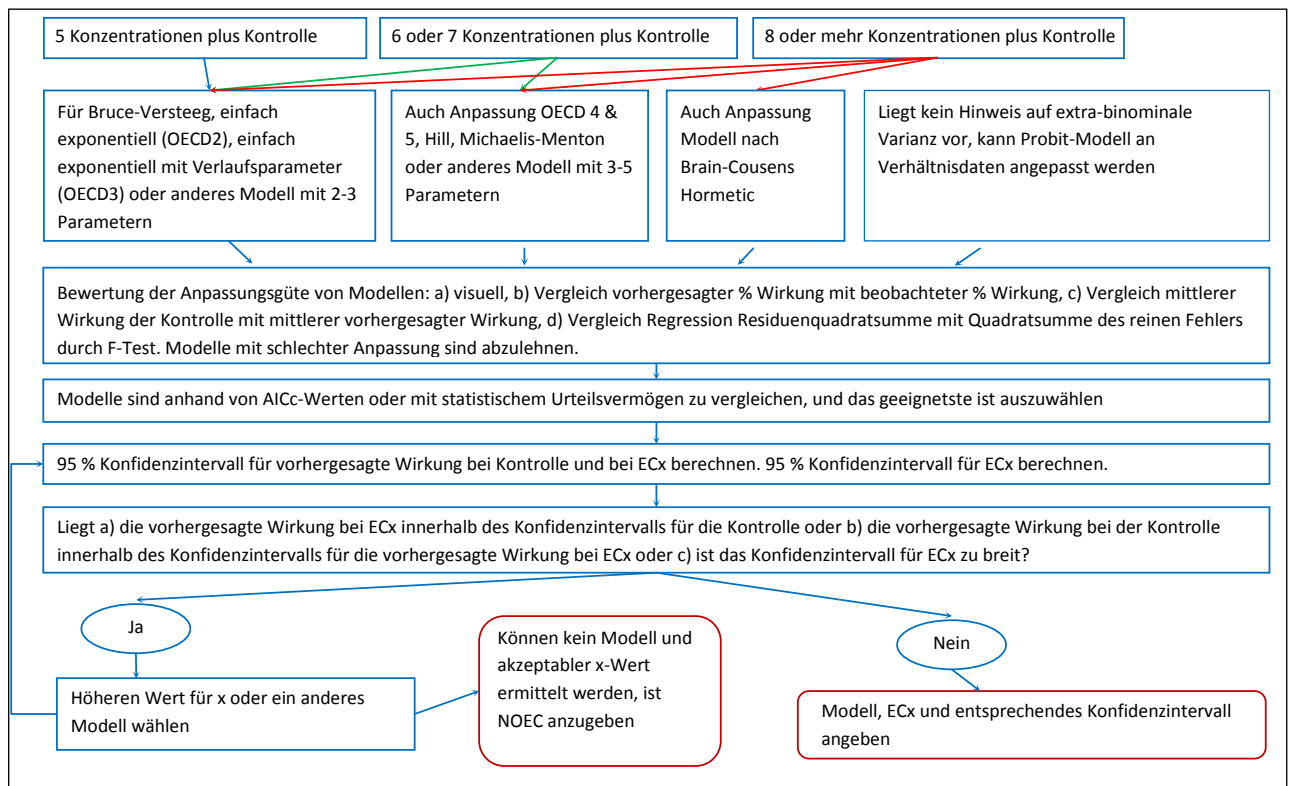
#### Allgemeines

Die zur Anpassung eines Modells verwendeten Beobachtungen sind die Mittelwerte von Länge und Gewicht je Replikat oder der Anteile ausgeschlüpfter Eier und toter Larven in jedem Replikat (OECD 2006).

Im Allgemeinen wird eine gewichtete Regression unter Verwendung der Replikat-Probengröße als Gewichtung empfohlen. Jedoch sind auch andere Gewichtungen möglich, wie z. B. die Gewichtung nach vorhergesagter mittlerer Wirkung oder eine Kombination dieser Gewichtung mit der Gewichtung nach Replikat-Probengröße. Von der Gewichtung mit dem Kehrwert der Varianz in der Probe bei einer bestimmten Konzentration wird abgeraten (Bunke et al. 1999, Seber and Wild, 2003, Motulsky und Christopoulos 2004, Huet et al. 2003).

Bei der Transformation der Wirkungen vor der Analyse sollte die Unabhängigkeit der Beobachtungen erhalten bleiben. Ferner sollten die ECx und die Grenzen ihres Konfidenzintervalls in den ursprünglichen und nicht in den transformierten Maßeinheiten ausgedrückt werden. Beispielsweise entspricht eine 20 %ige Änderung des Logarithmus der Länge nicht einer 20 %igen Änderung der Länge (Lyles et al. 2008, Draper und Smith 1999).

Das Flussdiagramm in Anlage 4 zeigt einen Überblick über die ECx-Schätzungen. Die Einzelheiten werden nachfolgend beschrieben.



**Abbildung 4:** Flussdiagramm für die Schätzung der  $EC_x$  für die mittlere Länge, das mittlere Gewicht und den mittleren Anteil an geschlüpften Eiern oder toten Larven je Replikat (Erläuterungen im Text)

### Erwägungen zum Schlüpfen der Eier und zur Larvenmortalität

Im Hinblick auf das Schlüpfen der Eier und die Larvenmortalität empfiehlt sich normalerweise die Anpassung eines Modells mit abnehmendem Kurvenverlauf, außer wenn wie nachfolgend beschrieben ein Probit-Modell angepasst wird. Das heißt, dass der Anteil an Eiern, die nicht schlüpfen, oder an Larven, die sterben, modelliert werden sollte. Der Grund hierfür liegt darin, dass die  $EC_x$  eine Konzentration ist, bei der eine Änderung auftritt, die  $x\%$  der mittleren Wirkung der Kontrolle entspricht. Wenn  $5\%$  der Kontrolleier nicht schlüpfen und das Nichtschlüpfen modelliert wird, dann bezeichnet die  $EC_{20}$  eine Konzentration, bei der eine Änderung von  $20\%$  der  $5\%$  nicht geschlüpften Kontrolleier auftritt, d. h. eine Änderung von  $0,2 * 0,05 = 0,01$  oder um 1 Prozentpunkt auf  $6\%$  nicht geschlüpfte Eier. Eine solch geringfügige Änderung kann anhand der verfügbaren Daten nicht sinnvoll geschätzt werden und ist biologisch ohne Bedeutung. Würde hingegen der Anteil an geschlüpften Eiern modelliert, so würde der Anteil in den Kontrollen in diesem Beispiel  $95\%$  betragen, und eine  $20\%$ ige Verringerung gegenüber dem Mittelwert der

Kontrolle würde eine Änderung von  $0,95 * 0,2 = 0,18$  bedeuten, d. h. der Schlupferfolg würde von 95 % auf 77 % (= 95-18) zurückgehen. Die Konzentration, bei der diese Wirkung auftritt, kann bestimmt werden und wäre vermutlich von größerem Interesse. Bei Größenmessungen tritt dieses Problem nicht auf, wenngleich nachteilige Auswirkungen auf die Größe im Allgemeinen eine Verringerung der Größe bedeuten.

### **Modelle für Größe (Länge oder Gewicht) und Schlupferfolg oder Überlebensrate der Larven**

Abgesehen vom Hormesis-Modell von Brain-Cousens werden all diese Modelle in OECD (2006) beschrieben und empfohlen. Die Modelle OECD 2 bis 5 werden auch für die Ökotoxizitätsversuche in Slob (2002) erläutert. Selbstverständlich gibt es zahlreiche andere Modelle, die sinnvoll sein könnten. In Bunke et al. (1999) werden zahlreiche Modelle aufgeführt, die hier nicht genannt sind, und es gibt zahlreiche Verweise auf andere Modelle. Die nachfolgend aufgeführten Modelle werden als besonders geeignet für Ökotoxizitätsversuche empfohlen und häufig verwendet.

#### *Bei fünf Prüfkonzentrationen plus Kontrolle*

- Bruce-Versteeg
- Einfach exponentiell (OECD 2)
- Exponentiell mit Formparameter (OECD 3)
- Einfach exponentiell mit Untergrenze (OECD 4)

#### *Bei sechs oder mehr Prüfkonzentrationen plus Kontrolle*

- Exponential mit Formparameter und Untergrenze (OECD 5)
- Michaelis-Menten
- Hill

Wenn sichtbare Anzeichen von Hormesis vorhanden sind (unwahrscheinlich bei Schlupferfolg oder Überleben der Larven, jedoch manchmal bei Größenbeobachtungen festzustellen)

- Brain-Cousens Hormetic; Brain und Cousens (1989)

### **Alternative Modelle für nicht geschlüpfte Eier und Larvenmortalität**

- Liegen keine Hinweise auf extrabinomiale Varianz vor, können Modelle mit ansteigendem Kurvenverlauf für diese Wirkungen durch (logistische) Probit-Modelle angepasst werden; die Inzidenz der Kontrolle wird in der Modellanpassung geschätzt. Dies ist nicht die bevorzugte Methode, da das Individuum und nicht das Replikat als Analyseeinheit ausgewertet wird (Morgan 1992, O'Hara Hines und Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

### **Anpassungsgüte eines einzelnen Modells**

- Visueller Vergleich der beobachteten und der vorhergesagten prozentualen Abnahme bei jeder Prüfkonzentration (Motulsky und Christopoulos 2004, Draper und Smith 1999).
- Vergleich des mittleren Fehlerquadrats der Regression mit dem reinen mittleren Fehlerquadrat anhand eines F-Tests (Draper und Smith 1999).
- Überprüfung, ob jeder Term in dem Modell signifikant von Null abweicht (d. h. Bestimmung, ob alle Modellterme wichtig sind) (Motulsky and Christopoulos 2004).
- Diagramme der Residuen aus der Regression im Verhältnis zur Prüfkonzentration, eventuell auf einer logarithmischen Skala der Konzentration. Dieses Diagramm sollte kein Muster ergeben; die Punkte sollten zufällig um eine waagerechte Linie auf Nullhöhe verstreut sein.
- Die Daten sollten wie in Anlage 5 beschrieben hinsichtlich Normalität und Varianzhomogenität bewertet werden.
- Darüber hinaus sollte die Normalität der Residuen des Regressionsmodells anhand der Methoden, die in Anlage 5 für die Residuen der ANOVA beschrieben werden, bewertet werden.

### **Vergleich der Modelle**

- Anwendung der AICc-Werte nach Akaike. Kleinere AICc-Werte bedeuten eine höhere Anpassungsgüte, und wenn  $AICc(B) - AICc(A) \geq 10$ , ist Modell A mit ziemlicher Sicherheit besser als Modell B (Motulsky und Christopoulos (2004)).
- Visueller Vergleich der beiden Modelle in Bezug darauf, inwieweit sie die obigen Modellkriterien erfüllen.
- Es wird empfohlen, das Sparsamkeitsprinzip anzuwenden, wobei das einfachste Modell, das den Daten hinreichend gut entspricht, verwendet werden sollte (Ratkowsky 1993, Lyles et al., 2008).

## Qualität der $EC_x$ -Bestimmung

Das Konfidenzintervall für die  $EC_x$  sollte nicht zu breit sein. Es ist statistisches Urteilsvermögen erforderlich, um zu entscheiden, wie breit das Konfidenzintervall sein darf, damit die  $EC_x$  noch nützlich ist. Simulationen von Regressionsmodellen mit Anpassung an Daten zu Schlupferfolg und Größe zeigen, dass etwa 75 % der Konfidenzintervalle für die  $EC_x$  ( $x=10, 20$  oder  $30$ ) höchstens zwei Prüfkonzentrationen umfassen. Dies liefert eine Leitlinie dafür, was akzeptabel und erreichbar ist. Zahlreiche Autoren bekräftigen, dass für alle Modellparameter Konfidenzintervalle angegeben werden müssen und dass breite Konfidenzintervalle bei Modellparametern auf inakzeptable Modelle schließen lassen (Ott und Longnecker 2008, Alvord und Rossio 1993, Motulsky und Christopoulos 2004, Lyles et al. 2008, Seber and Wild 2003, Bunke et al. 1999, Environment Canada 2005).

Das Konfidenzintervall der  $EC_x$  (oder jedes anderen Modellparameters) sollte nicht Null enthalten (Motulsky and Christopoulos 2004). Dies ist die Regression, die dem signifikanten Mindestunterschied entspricht, der häufig in Hypothesentestungsansätzen angeführt wird (z. B. Wang et al. 2000). Dies entspricht ferner dem Konfidenzintervall für die mittleren Wirkungen bei der LOEC, wobei der Mittelwert der Kontrolle nicht darin enthalten ist. Es stellt sich die Frage, ob die Schätzungen der Parameter wissenschaftlich plausibel sind. Wenn z. B. das Konfidenzintervall für  $y_0 \pm 20\%$  beträgt, ist keine  $EC_{10}$ -Schätzung plausibel. Wenn das Modell eine 20%ige Wirkung bei der Konzentration C vorhersagt und die maximale beobachtete Wirkung bei C und geringeren Konzentration 10% beträgt, dann ist die  $EC_{20}$  nicht plausibel (Motulsky und Christopoulos 2004, Wang et al. 2000, Environment Canada 2005).

Die  $EC_x$  sollte keine Extrapolation außerhalb des Bereichs positiver Konzentrationen erfordern (Draper und Smith 1999, OECD 2006). Beispielsweise könnte eine allgemeine Leitlinie sein, dass die  $EC_x$  maximal etwa 25% unter der niedrigsten geprüften Konzentration oder über der höchsten geprüften Konzentration liegen sollte.

## Literaturhinweise

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed res.* 29: 93-96.

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); *Modelling Binary Data*, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); *Modelling Survival Data in Medical Research*, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); *Applied Regression Analysis*, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); *Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests*, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); *Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples*, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November ; 29(6): 878–886.

Morgan, B.J.T. (1992); *Analysis of Quantal Response Data*, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OECD (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.



## C.48 Kurzzeit-Reproduktionstest an Fischen

### EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 229 (2012). Die Entwicklung und Validierung eines Fischtests, mit dem endokrin aktive Chemikalien nachgewiesen werden können, geht auf die Befürchtung zurück, dass in der Umwelt vorhandene Chemikalien aufgrund ihrer Interaktion mit dem endokrinen System die Gesundheit von Mensch und Natur gefährden. 1998 hat die OECD vorrangig mit der Änderung bestehender und der Entwicklung neuer Leitlinien für Screening-Tests und die Untersuchung potenziell endokriner Disruptoren begonnen. Ein Teil dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer Prüfrichtlinie für das Screening von Chemikalien mit Wirkung auf das endokrine System von Fischen. Der Kurzzeit-Reproduktionstest an Fischen wurde im Rahmen laborübergreifender Untersuchungen an ausgewählten Chemikalien umfassend validiert, um die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Tests für den Nachweis von Chemikalien mit Auswirkung auf die Reproduktion von Fischen durch verschiedene Mechanismen, einschließlich endokriner Modalitäten, zu demonstrieren (1) (2) (3) (4) (5). Alle Endpunkte der OECD-Prüfrichtlinie wurden an Dickkopfelritzen und eine Teilmenge der Endpunkte an Japanischen Reiskärpflingen (d. h. Vitellogenin und sekundäre Geschlechtsmerkmale) und Zebraabräblingen (d. h. Vitellogenin) validiert. Die Validierungsarbeit wurde einem Peer-Review durch eine Gruppe von Experten, die von den nationalen Koordinatoren des OECD Prüfrichtlinien-Programms ernannt wurden (6), und eine unabhängige Gruppe von Experten, die von der US-Umweltschutzbehörde (US-EPA) beauftragt wurde (29), unterzogen. Der Test ist nicht dafür vorgesehen, spezifische endokrinschädigende Wirkmechanismen zu identifizieren, denn die getesteten Fische besitzen eine intakte Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HHG- Achse), die auf unterschiedlichen Ebenen auf Chemikalien, die auf die HHG-Achse einwirken, reagieren kann.
2. Die vorliegende Prüfmethode entspricht einem In-vivo-Screening-Assay, bei dem geschlechtsreife männliche und weibliche Fische gemeinsam gehalten und für einen begrenzten Teil ihres Lebenszyklus (21 Tage) einer Chemikalie ausgesetzt werden. Nach dieser 21-tägigen Exposition werden bei männlichen und weiblichen Fischen zwei Biomarker-Endpunkte als Indikatoren einer endokrinen Wirkung der Prüfchemikalie

gemessen; diese Endpunkte sind Vitellogenin und sekundäre Geschlechtsmerkmale. Vitellogenin wird bei Dickkopflritzen, bei Japanischen Reiskörpflingen und bei Zebrabärblingen, die sekundären Geschlechtsmerkmale werden bei Dickkopflritzen und Japanischen Reiskörpflingen gemessen. Darüber hinaus wird die quantitative Fruchtbarkeit während der Prüfung täglich überwacht. Ferner werden Gonaden konserviert. Anhand der Histopathologie kann die Reproduktionsleistung der Versuchstiere bewertet und der evidenzbasierten Bewertung anderer Endpunkte hinzugefügt werden.

3. Dieser Bioassay dient dem In-vivo-Screening der Reproduktion und seine Anwendung ist im Zusammenhang mit dem *OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals* (30) zu sehen. In diesem konzeptionellen Rahmen wird der Kurzzeit-Reproduktionstest an Fischen auf Stufe 3 als In-vivo-Test vorgeschlagen, um Daten über ausgewählte endokrine Mechanismen/Wirkungspfade zu erhalten.

## **AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN**

4. Vitellogenin (VTG) wird gewöhnlich von der Leber weiblicher oviparer Vertebraten in Reaktion auf im Blutkreislauf zirkulierendes endogenes Östrogen produziert. VTG ist ein Vorläufer von Eidotterproteinen und wandert, einmal in der Leber produziert, über die Blutbahn zum Eierstock, wo es aufgenommen und von sich entwickelnden Eiern modifiziert wird. Vitellogenin ist im Plasma noch nicht geschlechtsreifer weiblicher und männlicher Fische kaum nachweisbar, da sich bei diesen noch nicht genügend zirkulierendes Östrogen gebildet hat. Die Leber kann Vitellogenin jedoch in Reaktion auf eine exogene Östrogenstimulation synthetisieren und absondern.
5. Die Messung der VTG-Konzentration ermöglicht den Nachweis von Chemikalien mit unterschiedlichen östrogenen Wirkungsweisen. Östrogen-wirksame Chemikalien können durch Messung der VTG-Induktion bei männlichen Fischen nachgewiesen werden, was in wissenschaftlichen Veröffentlichungen mit Peer Review umfassend dokumentiert wurde (z. B. (7)). VTG-Induktion wurde auch nach Exposition gegenüber aromatisierbaren Androgenen nachgewiesen (8) (9). Eine Reduktion des im Körper weiblicher Tiere zirkulierenden Östrogens, beispielsweise durch Hemmung der Aromatase, die endogenes Androgen in das natürliche Östrogen  $17\beta$ -Östradiol umwandelt, bewirkt eine Verringerung der VTG-Konzentration, die zum Nachweis von Chemikalien mit aromatasemhemmenden Eigenschaften verwendet wird (10) (11). Die biologische Relevanz der VTG-Reaktion

nach einer Östrogen-/Aromatasehemmung ist erwiesen und wurde umfassend dokumentiert. Die VTG-Produktion bei weiblichen Tieren kann aber auch durch allgemeine Toxizität und nichtendokrine toxische Wirkungsweisen (z. B. durch Hepatotoxizität) beeinflusst werden.

6. Für Routinemessungen haben sich verschiedene standardisierte Verfahren bewährt, so der artspezifische ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), bei dem das in kleinen Blut- oder Leberproben einzelner Fische produzierte VTG immundiagnostisch quantifiziert wird (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18). Die VTG-Messungen werden an Blutproben und/oder Kopf-/Schwanz-Homogenaten von Dickkopfelritzen und Zebrabärblingen sowie an Leberproben Japanischer Reiskarpfinge vorgenommen. Bei Japanischen Reiskarpfingen besteht eine ausgeprägte Korrelation zwischen dem im Blut und in der Leber gemessenen VTG (19). Anlage 6 enthält Empfehlungen für Verfahren zur Entnahme von Proben für VTG-Analysen. Kits für Vitellogenin-Messungen sind allgemein erhältlich; sie sollten auf einem validierten artspezifischen ELISA beruhen.
7. Sekundäre Geschlechtsmerkmale männlicher Fische bestimmter Arten sind äußerlich sichtbar und quantifizierbar und reagieren auf zirkulierende Mengen endogen wirkender Androgene. Dies gilt für Dickkopfelritzen und für Japanische Reiskarpfinge, nicht aber für Zebrabärblinge, die keine quantifizierbaren sekundären Geschlechtsmerkmale besitzen. Weibliche Tiere behalten die Fähigkeit bei, sekundäre männliche Geschlechtsmerkmale zu entwickeln, wenn sie in Wasser androgen wirksamen Chemikalien ausgesetzt werden. In der Fachliteratur wird auf mehrere Studien hingewiesen, die diese Art von Reaktion bei Dickkopfelritzen (20) und Japanischen Reiskarpfingen (21) belegen. Ein Rückgang sekundärer Geschlechtsmerkmale bei männlichen Fischen sollte aufgrund der geringen statistischen Aussagekraft mit Vorsicht interpretiert werden; jede Wertung sollte sich auf Expertenurteile und die Beweiskraft der Daten stützen. Zebrabärblinge sind für diesen Test nur begrenzt geeignet, da quantifizierbare sekundäre Geschlechtsmerkmale fehlen, die auf androgen wirksame Chemikalien reagieren könnten.
8. Bei Dickkopfelritzen ist die Zahl der Laichknoten („Nuptialtuberkel“) am Maul weiblicher Fische Hauptindikator einer exogenen Androgenexposition. Wichtigster Marker einer exogenen Exposition gegenüber androgen wirkenden Chemikalien bei weiblichen Japanischen Reiskarpfingen ist die Zahl der Papillenprozesse. Die Anlagen 5A und 5B enthalten Empfehlungen für Verfahren zur Bewertung von Geschlechtsmerkmalen bei Dickkopfelritzen bzw. Japanischen Reiskarpfingen.

9. Der 21-Tage-Test an Fischen umfasst die Bewertung der quantitativen Eiproduktion und die Konservierung der Gonaden für die optionale histopathologische Untersuchung. Einige Regierungsbehörden fordern diesen Endpunkt eventuell für eine vollständigere Bewertung der Reproduktionsleistung der Versuchstiere oder in Fällen, in denen Vitellogenin und die sekundären Geschlechtsmerkmale nicht auf die Exposition gegenüber der Chemikalie reagiert haben. Obwohl einige Endpunkte stark diagnostisch sind (z. B. VTG-Induktion bei männlichen Tieren und Tuberkelbildung bei weiblichen Tieren), sind nicht alle Endpunkte (z. B. Fruchtbarkeit und Histopathologie der Gonaden) in dem Test auf die Identifizierung spezifischer zellulärer Wirkmechanismen ausgerichtet. Vielmehr erlaubt die Reihe der Beobachtungen insgesamt Rückschlüsse auf mögliche endokrine Störungen und bildet somit eine Leitlinie für weitere Tests. Obwohl die Fruchtbarkeit nicht endokrinspezifisch ist, ist sie aufgrund ihrer nachgewiesenen Empfindlichkeit bei bekannten Chemikalien mit endokriner Wirkung (5) ein wichtiger zu berücksichtigender Endpunkt; wenn die Fruchtbarkeit und andere Endpunkte nicht betroffen sind, kann leichter geschlossen werden, dass eine Verbindung wahrscheinlich keine endokrine Wirkung hat. Ist die Fruchtbarkeit allerdings betroffen, stellt dies in Rückschlüssen bei evidenzbasierten Bewertungen einen erheblichen Beitrag dar. Diese Prüfmethode enthält auch eine Leitlinie für die Auswertung der Daten und die Akzeptanz der Testergebnisse.
10. Definitionen der in dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe sind Anlage 1 zu entnehmen.

## **PRINZIP DER PRÜFMETHODE**

11. Beim Assay werden geschlechtsreife männliche und weibliche Fische in Prüfgefäßen gemeinsam einer Prüfchemikalie ausgesetzt. Da die Tiere ausgewachsen und geschlechtsreif sind, kann leicht zwischen den Geschlechtern unterschieden und folglich eine geschlechtsspezifische Analyse der einzelnen Endpunkte vorgenommen werden, und die Sensitivität gegenüber exogenen Chemikalien ist gewährleistet. Bei Testende wird das Geschlecht der Fische durch makroskopische Untersuchung der Gonaden nach bauchseitiger Öffnung des Abdomens mit einer Schere bestimmt. Anlage 2 fasst die wichtigsten Bedingungen des Bioassays zusammen. Der Test wird gewöhnlich mit einer Auswahl an Fischen aus einer Laichpopulation begonnen; seneszente Tiere sollten nicht verwendet werden. Der Abschnitt über die Auswahl der Fische enthält Hinweise zum Alter und zur Geschlechtsreife der Fische. Der Test wird mit drei Konzentrationen der Prüfchemikalie und einer Wasserkontrolle sowie erforderlichenfalls einer

Lösungsmittelkontrolle durchgeführt. Bei Zebrabärblingen werden je Konzentration zwei Gefäße oder Replikate verwendet (jedes Gefäß mit fünf männlichen und fünf weiblichen Fischen). Bei Dickkopfelritzen werden je Konzentration vier Gefäße oder Replikate verwendet (jedes Gefäß mit zwei männlichen und vier weiblichen Fischen). Damit soll dem Territorialverhalten männlicher Dickkopfelritzen Rechnung getragen und gleichzeitig hinreichende Aussagekraft gewährleistet werden. Bei Japanischen Reiskärpflingen werden je Konzentration vier Gefäße oder Replikate verwendet (jedes Gefäß mit drei männlichen und drei weiblichen Fischen). Die Exposition erfolgt über einen Zeitraum von 21 Tagen; die Fische werden an Tag 21 nach Beginn der Exposition beprobt. Die quantitative Fruchtbarkeit wird täglich überwacht.

12. Am Tag der Beprobung (Tag 21) sind alle Tiere möglichst schmerzfrei zu töten. Bei Dickkopfelritzen und Japanischen Reiskärpflingen werden sekundäre Geschlechtsmerkmale gemessen (siehe Anlagen 5A und 5B). Zur Bestimmung der VTG-Konzentration werden von Zebrabärblingen und Dickkopfelritzen Blutproben entnommen; alternativ kann die VTG-Konzentration bei Zebrabärblingen auch anhand von Kopf- und Schwanzproben ermittelt werden (Anlage 6). Bei Japanischen Reiskärpflingen werden zur VTG-Analyse Leberproben entnommen (Anlage 6). Gonaden werden entweder im Ganzen oder seziiert für die potenzielle histopathologische Bewertung konserviert (22).

## **GÜLTIGKEITSKRITERIEN**

13. Die Testergebnisse sind gültig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:
  - Die Mortalität in den Wasser- (oder Lösungsmittel-)kontrollen darf am Ende der Exposition höchstens 10 % betragen;
  - die Konzentration an gelöstem Sauerstoff sollte während der gesamten Exposition mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen;
  - die Wassertemperatur der Prüfgefäße sollte während der Exposition zu keinem Zeitpunkt um mehr als  $\pm 1,5$  °C schwanken und bei einer Toleranz von 2 °C in dem Temperaturbereich liegen, der für die Testspezies vorgesehen ist (Anlage 2);
  - es muss belegt werden, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie in der Lösung mit einer Toleranz von  $\pm 20$  % bezogen auf die gemessenen Mittelwerte aufrechterhalten wurden;

- es muss nachgewiesen werden, dass die Fische in allen Replikaten vor Einleitung der Exposition gegenüber der Chemikalie und in den Kontrollreplikaten während des Tests aktiv laichen.

## **BESCHREIBUNG DER METHODE**

### **Apparatur**

14. Übliche Laborausrüstung und insbesondere die folgenden Geräte:
  - a. Sauerstoff- und pH-Messgeräte;
  - b. Geräte zur Messung von Wasserhärte und Alkalität;
  - c. geeignete Apparaturen zur Temperaturregelung und einer möglichst kontinuierlichen Überwachung;
  - d. Becken aus chemisch inertem Material und mit für das empfohlene Besatzverhältnis und die empfohlene Besatzdichte geeignetem Fassungsvermögen (siehe Anlage 2);
  - e. Laichsubstrat für Dickkopfelritzen und Zebraärblinge (für Einzelheiten siehe Anlage 4);
  - f. Waage mit angemessener Genauigkeit ( $\pm 0,5$  mg).

### **Wasser**

15. Als Testwasser kann jedes beliebige Wasser verwendet werden, in dem die Testspezies über einen längeren Zeitraum überleben und wachsen können. Während der gesamten Testdauer sollte eine konstante Wasserqualität gewährleistet sein. Der pH-Wert des Wassers sollte im Bereich 6,5 bis 8,5 liegen und im Test um nicht mehr als  $\pm 0,5$  pH-Einheiten schwanken. Um sicherzustellen, dass das Verdünnungswasser das Testergebnis nicht übermäßig stark beeinflusst (beispielsweise durch Komplexierung der Prüfchemikalie), sind regelmäßige Proben zu analysieren. Das Wasser ist auf Schwermetalle (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd und Ni), dominante Anionen und Kationen (z. B.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und  $\text{SO}_4^{2-}$ ), Pestizide (z. B. den Gesamtgehalt an

phosphororganischen und chlororganischen Pestiziden), den gesamten organischen Kohlenstoff und suspendierte Feststoffe zu untersuchen (beispielsweise alle drei Monate, wenn bekannt ist, dass das Wasser qualitativ gesehen relativ konstant ist). Ist die Wasserqualität nachweislich mindestens ein Jahr lang konstant geblieben, so können die Analysen seltener durchgeführt und die Abstände zwischen den Analysen verlängert werden (beispielsweise auf sechs Monate). Einige chemische Merkmale akzeptablen Verdünnungswassers sind in Anlage 3 aufgeführt.

## **Prüflösungen**

16. Die Prüflösungen werden durch Verdünnung einer Stammlösung in den gewünschten Konzentrationen zubereitet. Die Stammlösung sollte möglichst durch einfaches mechanisches Vermischen oder Schütteln (z. B. durch Rühren oder mit Ultraschall) der Prüfchemikalie in Verdünnungswasser hergestellt werden. Zur Herstellung einer Stammlösung in geeigneter Konzentration können Sättigungssäulen (Löslichkeitssäulen) verwendet werden. Die Verwendung von Lösungsmittelträgern wird nicht empfohlen. Ist jedoch ein Lösungsmittel erforderlich, so sollte zeitgleich in derselben Lösungsmittelkonzentration wie bei der chemischen Behandlung eine Lösungsmittelkontrolle verwendet werden. Bei schwierig zu prüfenden Chemikalien sollte das *OECD Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures* herangezogen werden (23). Welches Lösungsmittel zu verwenden ist, hängt von den chemischen Eigenschaften des Stoffs oder Gemischs ab. Der OECD-Leitfaden empfiehlt höchstens 100 µl/l; dieser Wert sollte eingehalten werden. In einer kürzlich durchgeführten Untersuchung (24) wurde jedoch auf weitere Bedenken hinsichtlich der Verwendung von Lösungsmitteln in Tests zur Prüfung endokriner Wirkungen verwiesen. Daher sollte die Lösungsmittelkonzentration (wenn überhaupt ein Lösungsmittel verwendet werden muss) so weit wie technisch möglich minimiert werden (je nach physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfchemikalie).
17. Für die Prüfung ist ein Durchflusssystem zu verwenden. Ein solches System gibt kontinuierlich eine Stammlösung der Prüfchemikalie ab und verdünnt diese (z. B. mit einer Dosierpumpe, einem Proportionalverdünner oder einer Sättigungsvorrichtung), damit unterschiedliche Konzentrationen in die Prüfkammern gelangen. Die Durchflussraten von Stammlösungen und Verdünnungswasser sind während der Prüfung regelmäßig – vorzugsweise täglich – zu kontrollieren und dürfen während der Prüfung um höchstens 10 % schwanken. Insbesondere sind Kunststoffleitungen aus minderwertigem Material

oder sonstige Materialien zu vermeiden, die biologisch aktive Chemikalien enthalten könnten. Bei der Auswahl des Materials für das Durchflusssystem ist eine mögliche Adsorption der Prüfchemikalie an das Material zu berücksichtigen.

### **Halten der Fische**

18. Die zu prüfenden Fische sollten aus einer Laborpopulation stammen, vorzugsweise aus einem einzelnen Bestand, der mindestens zwei Wochen vor dem Test bei ähnlicher Wasserqualität und ähnlichen Lichtverhältnissen wie im Test akklimatisiert wurde. Besatz(verhältnis) und Besatzdichte (Definitionen siehe Anlage 1) müssen der jeweils verwendeten Art entsprechen (siehe Anlage 2).
19. Nach einer 48-stündigen Akklimatisierung werden die Mortalitäten erfasst; dabei gelten die folgenden Kriterien:
  - Bei Mortalitäten von mehr als 10 % der Population innerhalb von sieben Tagen: Die gesamte Charge verwerfen.
  - Bei Mortalitäten zwischen 5 und 10 % der Population: Akklimatisierung der Fische für weitere sieben Tage; wenn die Mortalität auch in den zusätzlichen sieben Tagen noch über 5 % liegt: Die gesamte Charge verwerfen.
  - Bei Mortalitäten von weniger als 5 % der Population innerhalb sieben Tagen wird die Charge akzeptiert.
20. Während der Akklimatisierung, der Präexposition und der eigentlichen Exposition sollten die Fische nicht gegen Krankheiten behandelt werden.

### **Präexposition und Auswahl der Fische**

21. Eine ein- bis zweiwöchige Präexposition wird empfohlen; dabei werden die Fische in prüfgefäßähnliche Becken gesetzt. Während der gesamten Haltungsdauer und während der Exposition werden die Fische ad libitum gefüttert. Die Expositionsphase beginnt mit sexuell dimorphen adulten, aktiv laichenden Fischen aus einer Laborpopulation geschlechtsreifer Tiere (z. B. mit deutlichen sekundären Geschlechtsmerkmalen bei Dickkopfelritzen und bei Japanischen Reiskärpflingen). Als Faustregel (nur im Kontext der Beobachtung des tatsächlichen Reproduktionsstatus einer bestimmten Charge von Fischen anzuwenden) gilt, dass Dickkopfelritzen ca. 20 ( $\pm$  2) Wochen alt sein sollten, vorausgesetzt, sie wurden während ihrer gesamten Lebensdauer bei einer Temperatur von  $25 \pm 2$  °C gehalten. Unter denselben Bedingungen sollten Japanische Reiskärpflinge etwa



16 ( $\pm$  2) Wochen alt sein. Zebrabärblinge sollten etwa 16 ( $\pm$  2) Wochen alt sein, sofern sie während ihres gesamten Lebens bei  $26 \pm 2$  °C gehalten wurden. Die Eiproduktion sollte während der Präexpositionphase täglich bewertet werden. Es wird empfohlen, das Laichen in allen Replikatgefäßen vor der Einleitung der Expositionsphase des Tests zu beobachten. In dieser Phase kann nicht festgelegt werden, wie viele Eier pro Tag produziert werden sollten, doch im Allgemeinen werden bei jeder Tierart durchschnittlich  $> 10$  Eier/Weibchen/Tag beobachtet. Um eine ausgewogene Verteilung der Replikate sicherzustellen, sollten sie den verschiedenen Versuchsebenen nach einem randomisierten Blockkonzept entsprechend der Eiproduktion zugeordnet werden.

## **VERSUCHSPLAN**

22. Für den Test sind drei Konzentrationen der Prüfchemikalie, eine Kontrolle (Wasser) und erforderlichenfalls eine Lösungsmittelkontrolle zu verwenden. Die Daten können analysiert werden, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlungs- und Kontrollreaktion festzustellen. Diese Analysen dienen eher der Feststellung, ob die Chemikalie in weiteren Langzeittests auf unerwünschte Wirkungen (nämlich Überleben, Entwicklung, Wachstum und Reproduktion) untersucht werden muss, als der Verwendung für Risikobewertungen (25).
23. Bei den Zebrabärblingen werden an Tag 21 der Prüfung männliche und weibliche Tiere aus jeder Konzentrationsgruppe (jedes der beiden Replikate enthält fünf männliche und fünf weibliche Fische) und aus der/den Kontrollgruppe(n) für die Untersuchung auf Vitellogenin beprobt. Bei den Japanischen Reiskarpfingen werden an Tag 21 der Prüfung männliche und weibliche Tiere aus jeder Konzentrationsgruppe (jedes der beiden Replikate enthält drei männliche und drei weibliche Fische) und aus der/den Kontrollgruppe(n) für die Untersuchung auf Vitellogenin und sekundäre Geschlechtsmerkmale beprobt. Bei den Dickkopfelritzen werden an Tag 21 der Exposition männliche und weibliche Tiere (jedes der vier Replikate enthält zwei männliche und vier weibliche Fische) und aus der/den Kontrollgruppe(n) für die Untersuchung auf Vitellogenin und sekundäre Geschlechtsmerkmale beprobt. Die Fruchtbarkeit muss quantitativ bewertet werden, und die Gonadengewebe sollten erforderlichenfalls im Ganzen fixiert oder für eine potenzielle histopathologische Bewertung seziiert werden.

## **Auswahl der Prüfkonzentrationen**

24. Für die Zwecke dieser Prüfung sollte die höchste Prüfkonzentration auf die in einem Vorversuch bestimmte oder aus anderen Toxizitätsdaten hervorgehende höchste noch verträgliche Konzentration (Maximum Tolerated Concentration, MTC) oder auf 10 mg/l oder auf den Höchstwert der Wasserlöslichkeit festgesetzt werden, je nachdem, welcher Wert der niedrigere ist. Der MTC-Wert gilt als die höchste Prüfkonzentration der Chemikalie, bei der die Mortalität weniger als 10 % beträgt. Dieser Ansatz geht davon aus, dass empirische Daten zur akuten Toxizität oder sonstige Toxizitätsdaten vorliegen, anhand deren der MTC-Wert bestimmt werden kann. Die Schätzung des MTC-Wertes kann ungenau sein und setzt in der Regel Fachkenntnis voraus.
25. Benötigt werden drei Testkonzentrationen mit einem konstanten Abstandsfaktor von maximal 10 und eine Verdünnungswasserkontrolle (sowie bei Bedarf eine Lösungsmittelkontrolle). Empfohlen werden Abstandsfaktoren zwischen 3,2 und 10.

## **VERFAHREN**

### **Auswahl und Wiegen der Testfische**

26. Wichtig ist, dass die Gewichtsunterschiede der Fische zu Beginn der Prüfung möglichst gering sind. Für geeignete Größenbereiche für die empfohlenen Tierarten siehe Anlage 2. Bei der gesamten Charge der in dieser Prüfung verwendeten Fische sollte bei männlichen und weiblichen Tieren das individuelle Gewicht möglichst im Bereich von  $\pm 20\%$  des arithmetischen Mittelgewichts der Fische gleichen Geschlechts liegen. Um das Mittelgewicht zu bestimmen, wird empfohlen, vor der Prüfung eine Teilprobe des Fischbestands zu wiegen.

### **Expositionsbedingungen**

#### *Dauer*

27. Der Test dauert 21 Tage nach vorheriger Präexposition. Es wird eine ein- bis zweiwöchige Präexposition empfohlen.

#### *Fütterung*

28. Die Fische werden ad libitum so oft mit geeignetem Futter (Anlage 2) versorgt, wie es für eine normale Entwicklung der Tiere nötig ist. Dabei ist darauf zu achten, dass es nicht zu

einer Vermehrung von Mikroorganismen und nicht zu einer Eintrübung des Wassers kommt. Im Allgemeinen kann die Tagesration auf zwei oder drei gleiche Portionen verteilt werden, die in mindestens dreistündigem Abstand zu verabreichen sind. Insbesondere an Wochenenden kann eine einzige, größere Ration gegeben werden. 12 Stunden vor der Probenahme/Sektion sollten die Fische nicht mehr gefüttert werden.

29. Das Fischfutter ist auf Verunreinigungen wie chlororganische Pestizide, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und polychlorierte Biphenyle (PCB) zu untersuchen. Futter mit erhöhtem Gehalt an Phytoöstrogenen, die die Testreaktion auf bekannte Östrogenagonisten (z. B. 17- $\beta$ -Östradiol) beeinträchtigen würden, darf nicht verwendet werden.
30. Nicht aufgenommenes Futter und Fäkalien sind mindestens zweimal wöchentlich aus den Prüfgefäßen zu entfernen (etwa durch vorsichtiges Absaugen vom Beckenboden).

#### *Licht und Temperatur*

31. Fotoperiode und Wassertemperatur sind der Testspezies anzupassen (siehe Anlage 2).

### **Häufigkeit der Analysen und Messungen**

32. Vor Beginn der Exposition ist zu überprüfen, ob die Chemikalienbeschickung einwandfrei funktioniert. Es dürfen ausschließlich anerkannte Analysemethoden angewandt werden, und die Stabilität der Chemikalie im Prüfsystem muss hinreichend bekannt sein. Während des Tests sind die Konzentrationen der Prüfchemikalie in regelmäßigen Zeitabständen wie folgt zu bestimmen: Die Zuflussmengen der Verdünnungslösung und der Stammlösung der Prüfchemikalie sind regelmäßig – vorzugsweise täglich, jedoch mindestens zweimal wöchentlich – zu kontrollieren und sollten während des gesamten Tests um maximal 10 % schwanken. Die tatsächlichen Konzentrationen der Prüfchemikalie sollten zu Beginn des Tests in allen Gefäßen und danach wöchentlich gemessen werden.
33. Die Ergebnisse sollten auf gemessenen Konzentrationen basieren. Wurde die Konzentration der Chemikalienlösung während der gesamten Prüfung jedoch zufriedenstellend innerhalb der nominellen Konzentration ( $\pm 20\%$ ) gehalten, so können sich die Ergebnisse auf die nominalen oder die gemessenen Werte beziehen.
34. Unter Umständen müssen die Proben gefiltert (z. B. mit Filtern einer Porengröße von  $0,45\ \mu\text{m}$ ) oder zentrifugiert werden. Erforderlichenfalls ist Zentrifugierung vorzuziehen.

Prüfchemikalien, die sich nachweislich nicht an Filter adsorbieren, können auch filtriert werden.

35. Während der Prüfung sollten bei allen Prüfgefäßen mindestens einmal wöchentlich der gelöste Sauerstoff, die Temperatur und der pH-Wert gemessen werden. Die Gesamthärte und die Gesamtkalkalität sollten in den Kontrollen und in einem Gefäß mit höchster Testkonzentration ebenfalls mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Es wird empfohlen, dass die Temperatur in mindestens einem Prüfgefäß kontinuierlich überwacht wird.

### **Beobachtungen**

36. Im Laufe oder am Ende des Tests sind verschiedene allgemeine Reaktionen (z. B. Überleben) sowie biologische Reaktionen (z. B. VTG-Gehalt) zu bestimmen. Die Fruchtbarkeit muss täglich quantitativ überwacht werden. Die Messung und Auswertung dieser Endpunkte und die Verwendbarkeit der Ergebnisse werden im Folgenden erläutert.

#### *Überleben*

37. Die Fische sind während des Tests täglich zu kontrollieren; Todesfälle sind zu protokollieren und tote Fische so bald wie möglich zu entfernen. Tote Fische dürfen weder in Kontroll- noch in Prüfgefäße eingesetzt werden. Das Geschlecht der im Test gestorbenen Fische wird durch makroskopische Gonadenuntersuchung bestimmt.

#### *Verhalten und Aussehen*

38. Jegliches anomale Verhalten (gemessen an den Kontrollen) ist zu protokollieren. Dies gilt für Anzeichen allgemeiner Toxizität ebenso wie für Hyperventilation, unkoordinierte Schwimmbewegungen, Gleichgewichtsverluste und atypische Apathie oder ungewöhnliches Fressverhalten. Zudem sind äußerliche Auffälligkeiten (z. B. Blutungen oder Verfärbungen) aufzuzeichnen. Derartige Anzeichen einer toxischen Wirkung sind bei der Datenauswertung insoweit sorgfältig zu berücksichtigen, als sie auf Konzentrationen hinweisen können, bei denen die Biomarker endokriner Wirkungen keine zuverlässigen Rückschlüsse gestatten. Diese Verhaltensauffälligkeiten können auch wertvolle qualitative Informationen liefern, an denen sich künftige Fischtests orientieren können. Bei Dickkopfelnritzen wurde unter Einwirkung von Androgenen beispielsweise aggressives Territorialverhalten bei normalen Männchen oder maskulinisierten Weibchen beobachtet.

Bei Zebrabärblingen hemmen Östrogene oder Anti-Androgene das typische Paarungs- und Laichverhalten bei einsetzender Morgendämmerung.

39. Da sich verschiedene äußere Merkmale (in erster Linie die Farbe) beim Hantieren der Fische rasch verändern können, sind qualitative Beobachtungen vor der Entnahme von Fischen aus dem Prüfsystem wichtig. Bisherige Erfahrungen mit Dickkopfelritzen führen zu dem Schluss, dass einige endokrin wirkende Chemikalien anfangs zu Veränderungen der folgenden äußeren Merkmale führen: Körperfarbe (hell oder dunkel), Farbmusterung (Auftreten vertikaler Streifen) und Körperform (im Kopf- oder Schwanzbereich). Daher muss im Laufe und am Ende des Tests das äußere Erscheinungsbild der Fische kontrolliert werden.

#### *Fruchtbarkeit*

40. Die Laichmengen sollten täglich für jedes Replikat protokolliert werden. Die Eiproduktion sollte als Anzahl Eier pro überlebendem weiblichen Tier pro Tag auf für jedes Replikat protokolliert werden. Die Eier werden täglich aus den Prüfkammern genommen. Die Laichsubstrate sollten für Dickkopfelritzen und Zebrabärblinge so in die Prüfkammern gelegt werden, dass die Fische unter normalen Bedingungen laichen können. Anlage 4 enthält weitere Informationen zu den empfohlenen Laichsubstraten für Zebrabärblinge (Anlage 4A) und Dickkopfelritzen (Anlage 4B). Bei Reiskärpflingen wird die Bereitstellung eines Laichsubstrats nicht als notwendig erachtet.

#### *Schmerzfreies Töten*

41. An Tag 21, d. h. bei Ablauf der Expositionsdauer, sind die Fische mit angemessenen Mengen Tricain (Tricainmethansulfonat, Metacain, MS-222 (CAS 886-86-2), 100-500 mg/l gepuffert mit 300 mg/l NaHCO<sub>3</sub> (Natriumbicarbonat, CAS 144-55-8) zu töten, um Schleimhautreizungen zu begrenzen. Anschließend wird zur VTG-Bestimmung Blut oder Gewebe entnommen, wie im Abschnitt über Vitellogenin beschrieben.

#### *Untersuchung sekundärer Geschlechtsmerkmale*

42. Manche endokrin wirkende Chemikalien können Veränderungen spezifischer sekundärer Geschlechtsmerkmale (Anzahl Laichknoten („Nuptialtuberkel“) bei männlichen Dickkopfelritzen oder bei männlichen Japanischen Reiskärpflingen) zur Folge haben. Insbesondere Chemikalien mit bestimmten Wirkungsweisen können bei Tieren des jeweils anderen Geschlechts zu Anomalien der sekundären Geschlechtsmerkmale führen. So

können Androgenrezeptor-Agonisten wie Trenbolon, Methyltestosteron und Dihydrotestosteron bewirken, dass weibliche Dickkopfelritzen ausgeprägten Laichausschlag („Nuptialtuberkel“) entwickeln oder dass bei weiblichen Japanischen Reiskärpflingen Papillenprozesse auftreten (11) (20) (21). Außerdem wurde berichtet, dass Östrogenrezeptor-Agonisten dazu führen können, dass sich die Zahl der Laichknoten und die Größe des dorsalen Nackenaufwuchses bei adulten männlichen Dickkopfelritzen verringern (26) (27). Diese wesentlichen morphologischen Beobachtungen können auch eine qualitativ und quantitativ wertvolle Informationsgrundlage für potenzielle künftige Fischtests liefern. Anzahl und Größe der Laichknoten bei Dickkopfelritzen und Papillenprozesse bei Japanischen Reiskärpflingen können entweder direkt oder – bequemer – an konservierten Exemplaren gezählt werden. Die Anlagen 5A und 5B enthalten Empfehlungen für Verfahren zur Beurteilung sekundärer Geschlechtsmerkmale bei Dickkopfelritzen bzw. Japanischen Reiskärpflingen.

#### *Vitellogenin (VTG)*

43. Das für die VTG-Bestimmung erforderliche Blut wird mit einem heparinisierten Mikrohämatokrit-Kapillarröhrchen aus der Schwanzarterie/-vene oder alternativ durch Herzpunktion mit einer Spritze entnommen. Je nach Größe der Fische werden bei Dickkopfelritzen 5-60 µl und bei Zebrabärblingen 5-15 µl Blut (jeweils pro Fisch) benötigt. Das Plasma wird durch Zentrifugieren vom Blut getrennt und mit Proteasehemmern bis zur Vitellogenin-Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Alternativ kann bei Japanischen Reiskärpflingen die Leber verwendet werden. Bei Zebrabärblingen kommen Kopf-/Schwanz-Homogenate als Gewebematerial für die VTG-Analyse in Betracht (Anlage 6). Die VTG-Messung sollte nach einer validierten homologen ELISA-Methode mit homologem VTG-Standard und homologen Antikörpern erfolgen. Empfohlen werden Methoden, mit denen kleinste VTG-Gehalte (wenige ng/ml Plasma oder ng/mg Gewebe, die der Hintergrundkonzentration bei nicht exponierten männlichen Fischen entsprechen) ermittelt werden können.
44. Die Qualitätskontrolle der VTG-Analyse erfolgt anhand von Standards, Blindproben und zumindest Doppelanalysen. Für jede ELISA-Methode ist ein Test auf Matrixeffekte (Effekte der Probenverdünnung) vorzunehmen, um den Mindestverdünnungsfaktor zu ermitteln. Alle für VTG-Analysen verwendeten ELISA-Platten müssen zumindest auch folgende Proben für die Qualitätskontrolle enthalten: sechs Kalibrierstandards für den gesamten Bereich der erwarteten VTG-Konzentrationen und eine nicht spezifische

Binding-Assay-Blindprobe (doppelt zu analysieren). Die Absorption dieser Blindproben sollte weniger als 5 % der maximalen Absorption des Kalibrierstandards betragen. Von jeder Verdünnung sind mindestens zwei Aliquoten (Muldenduplikate) zu analysieren. Duplikatmulden mit über 20 % Differenz sollten ein zweites Mal analysiert werden.

45. Der Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) für Kalibrierkurven sollte größer als 0,99 sein. Eine hohe Korrelation reicht jedoch nicht aus, um in allen Bereichen Konzentrationen adäquat vorabzuschätzen. Neben der Notwendigkeit einer hinreichend hohen Korrelation für die Kalibrierkurve sollten alle aus der Kalibrierkurve errechneten Konzentrationen der einzelnen Standards im Bereich von 70-120 % der jeweiligen nominellen Konzentration liegen. Wenn die nominellen Konzentrationen tendenziell von der Regressionsgeraden abweichen (beispielsweise bei niedrigeren Konzentrationen), muss die Kalibrierkurve möglicherweise in niedrige und hohe Bereiche aufgeteilt oder ein nicht lineares Modell für die Absorptionsdaten verwendet werden. Bei geteilten Kurven muss der Korrelationskoeffizient  $R^2$  bei beiden Segmenten  $> 0,99$  sein.
46. Als Nachweisgrenze wird die Konzentration des niedrigsten Analysestandards bezeichnet; die Quantifizierungsgrenze ist die Konzentration des niedrigsten Analysestandards multipliziert mit dem niedrigsten Verdünnungsfaktor.
47. An den Tagen, an denen VTG-Analysen stattfinden, ist eine mit einem Inter-Assay-Referenzstandard hergestellte Anreicherungsprobe zu analysieren (Anlage 7). Das Verhältnis der erwarteten zur gemessenen Konzentration ist zusammen mit den Ergebnissen der an diesem Tag durchgeführten Testreihen aufzuzeichnen.

#### *Histopathologische Bewertung der Gonaden*

48. Zur Untersuchung des Zielorgans auf der HPG-Achse nach der Exposition gegenüber der Chemikalie kann von einigen Regulierungsbehörden die histopathologische Bewertung der Gonaden gefordert werden. Hierzu werden die Gonaden entweder im Ganzen oder seziiert fixiert. Ist die Histopathologie erforderlich, wird bei der Untersuchung der endokrinen Wirkung der Prüfchemikalie nach spezifischen endokrinbezogenen Reaktionen an den Gonaden gesucht. Zu diesen diagnostischen Wirkungen gehören im Wesentlichen das Auftreten von testikulären Oozyten, Leydig-Zell-Hyperplasie, verminderte Dotterbildung, vermehrte Spermatogonien und perifollikuläre Hyperplasie. Andere Läsionen der Gonaden wie z. B. Atresie, testikuläre Degeneration und Veränderungen der Reifestufen können verschiedene Ursachen haben. Im Leitfaden zur Histopathologie von Fischgonaden werden

Verfahren angegeben, die beim Sezieren, Fixieren und Schneiden sowie bei der histopathologischen Bewertung der Gonaden angewandt werden (22).

## **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

### **Auswertung von Biomarkerreaktionen durch Varianzanalyse (ANOVA)**

49. Um die potenzielle Aktivität einer Chemikalie zu ermitteln, werden die Wirkungen in den Prüf- und in den Kontrollgefäßen mittels Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Wird eine Lösungsmittelkontrolle verwendet, sollten Verdünnungswasser und Lösungsmittelkontrollen zur Bestimmung des jeweiligen Endpunkts nach geeigneten Methoden statistisch analysiert werden. Für Leitlinien zur Verwendung der Daten über Verdünnungswasser und Lösungsmittelkontrollen für die anschließende statistische Analyse siehe OECD 2006c (28). Alle Daten zu biologischen Reaktionen sind nach Geschlechtern zu analysieren und aufzuzeichnen. Sind die Voraussetzungen für parametrische Methoden nicht erfüllt, d. h. keine Normalverteilung (z. B. Shapiro-Wilk-Test) oder heterogene Varianz (Bartlett-Test oder Levene-Test), sollte vor der ANOVA eine Datentransformation zur Varianzhomogenisierung in Betracht gezogen oder eine gewichtete ANOVA durchgeführt werden. Bei nicht monotonen Dosis-Wirkungs-Beziehungen kann der (parametrische) Dunnett-Test (Paarvergleiche) oder ein (nicht parametrischer) Mann-Whitney-Test mit Anpassung nach Bonferroni durchgeführt werden. Andere statistische Tests kommen ebenfalls in Betracht (z. B. ein Jonckheere-Terpstra- oder ein Williams-Test), wenn die Dosis-Wirkungs-Beziehung annähernd monoton ist. Das statistische Flussdiagramm in Anlage 8 soll die Auswahl des jeweils am besten geeigneten statistischen Tests erleichtern. Für weitere Informationen siehe OECD-Dokument *Current Approaches to Statistical Analysis of Ecotoxicity Data* (28).

### **Testergebnisse**

50. Die Versuchsdaten sollten Folgendes umfassen:

#### *Prüfinstitut:*

- verantwortliche Mitarbeiter und ihre jeweiligen Zuständigkeiten im Rahmen der Prüfung;
- jedes Labor muss seine Eignung anhand repräsentativer Chemikalien nachweisen.



*Prüfchemikalie:*

- Charakterisierung der Prüfchemikalie;
- physikalischer Zustand und physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Methode und Häufigkeit der Herstellung von Prüfkonzentrationen;
- Angaben zur Stabilität und zur biologischen Abbaubarkeit.

*Lösungsmittel:*

- Charakterisierung des Lösungsmittels (Beschaffenheit und verwendete Konzentration);
- Gründe für die Wahl des jeweiligen Lösungsmittels (wenn nicht nur Wasser als Lösungsmittel verwendet wird).

*Versuchstiere:*

- Art und Stamm;
- Bezugsquelle und Angaben zur jeweiligen Bezugsanlage;
- Alter der Fische zu Beginn der Prüfung und Reproduktions-/Laichstatus;
- Angaben zum Akklimatisierungsverfahren;
- Körpergewicht der Fische zu Beginn der Exposition (aus einer Teilprobe des Fischbestands).

*Prüfbedingungen:*

- angewandte Prüfmethode (Testtyp, Besatz(verhältnis), Besatzdichte usw.);
- Methode für die Herstellung der Stammlösungen und Durchflussrate;
- nominelle Prüfkonzentrationen, wöchentlich gemessene Konzentrationen der Prüflösungen und angewandte Analyseverfahren, mittlere Messwerte und Standardabweichungen in den Prüfgefäßen sowie Nachweis, dass sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfchemikalie in echter Lösung beziehen;

- Merkmale des Verdünnungswassers (pH-Wert, Härte, Alkalität, Temperatur, Konzentration an gelöstem Sauerstoff, Restchlorgehalt, Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff und suspendierten Feststoffen und andere ermittelte Messwerte);
- Wasserqualität in den Prüfgefäßen: pH-Wert, Härte, Temperatur und Konzentration des gelösten Sauerstoffs;
- detaillierte Angaben zur Fütterung (Art des Futters, Bezugsquelle/Herkunft, verfütterte Menge und Häufigkeit der Fütterung sowie, soweit vorhanden, Analysen zur Feststellung etwaiger Schadstoffe (z. B. PCB, PAH und chlororganische Pestizide).

### *Ergebnisse*

- Nachweis, dass die Kontrollen die Akzeptanzkriterien der Prüfung erfüllen;
- Daten zu Mortalitäten für Prüfkonzentrationen und Kontrolle;
- angewandte statistische Analysemethoden, Datenauswertung und Gründe für die Wahl der angewandten Methoden;
- Daten zu biologischen Beobachtungen (deutliche morphologische Änderungen u. a. der sekundären Geschlechtsmerkmale, Eiproduktion und VTG-Konzentration);
- Ergebnisse der Datenanalysen, vorzugsweise in tabellarischer und in grafischer Form;
- ungewöhnliche Reaktionen der Fische sowie jegliche sichtbare Wirkungen der Prüfchemikalie.

### **LEITLINIEN FÜR DIE AUSWERTUNG UND AKZEPTANZ DER TESTERGEBNISSE**

51. Dieser Abschnitt enthält Empfehlungen für die Auswertung der Testergebnisse für die gemessenen Endpunkte. Die Ergebnisse sind mit Vorsicht zu interpretieren, wenn die Prüfchemikalie eindeutig toxisch wirkt oder den Allgemeinzustand der Versuchstiere verschlechtert.
52. Bei der Festlegung der Bandbreite der Prüfchemikalienkonzentrationen ist darauf zu achten, dass die für eine aussagekräftige Datenauswertung höchste noch verträgliche Konzentration nicht überschritten wird. Wichtig ist dabei, dass bei mindestens einer

Konzentration keine Anzeichen einer toxischen Wirkung festgestellt werden. Krankheitssymptome und Anzeichen toxischer Wirkungen sind gründlich zu untersuchen und aufzuzeichnen. Beispielsweise kann die VTG-Produktion bei weiblichen Tieren auch durch allgemeine Toxizität und nichtendokrine toxische Wirkungsweisen (z. B. durch Hepatotoxizität) beeinträchtigt werden. Die Wirkungsauswertung lässt sich jedoch durch andere Konzentrationen untermauern, die nicht durch systemische Toxizität beeinträchtigt werden.

53. Um Testergebnisse als gültig anerkennen zu können, müssen bestimmte Aspekte berücksichtigt werden. Als Faustregel gilt, dass sich die VTG-Konzentrationen in Kontrollgruppen männlicher und weiblicher Fische bei Dickkopfelritzen und bei Zebraabärblingen in etwa um mindestens drei Größenordnungen und bei Japanischen Reiskarpfingen in etwa um mindestens eine Größenordnung unterscheiden müssen. Für Beispiele für den Konzentrationsbereich bei Kontroll- und Behandlungsgruppen siehe Validierungsberichte (1) (2) (3) (4). Hohe VTG-Konzentrationen bei männlichen Kontrollfischen könnten die Aussagekraft der Prüfung und ihre Fähigkeit zum Nachweis schwacher Östrogen-Agonisten beeinträchtigen. Und niedrige VTG-Konzentrationen bei weiblichen Kontrollfischen könnten die Aussagekraft der Prüfung und ihre Fähigkeit zum Nachweis von Aromatasehemmern und Östrogen-Antagonisten beeinträchtigen. Diese Leitlinie beruht auf diesen Validierungsstudien.
54. Bei der Quantifizierung der Eiproduktion können starke Schwankungen auftreten [der Variationskoeffizient kann zwischen 20 und 60 % schwanken], was die Fähigkeit der Prüfung zum Nachweis einer erheblichen Verringerung der Eiproduktion um weniger als 70 %, wenn sich der Variationskoeffizient 50 % oder mehr nähert, beeinträchtigt. Ist der Variationskoeffizient auf niedrigere Werte (ca. 20-30 %) begrenzt, hat die Prüfung eine akzeptable Aussagekraft (80 %) für den Nachweis einer Verringerung der Eiproduktion um 40-50 %. Der für Dickkopfelritzen verwendete Versuchsplan, der vier Replikate je Behandlungsstufe umfasst, sollte eine bessere Aussagekraft für den Endpunkt „Fruchtbarkeit“ gewährleisten als ein Versuchsplan mit nur zwei Replikaten.
55. Führt ein Labor die Prüfung zum ersten Mal durch oder wurden wesentliche Änderungen vorgenommen (beispielsweise Änderungen des Fischstammes oder der Bezugsquelle), sollte eine technische Eignungsprüfung durchgeführt werden. Nach Möglichkeit sollten Chemikalien verwendet werden, die ein breites Spektrum an Wirkungsweisen oder Wirkungen auf mehrere Test-Endpunkte abdecken. Die Labors werden aufgefordert, für männliche und weibliche Tiere eigene historische Kontrolldaten zu sammeln und eine

positive Kontrollchemikalie (z. B. 17 $\beta$ -Östradiol in einer Konzentration von 100 ng/l oder einen bekannten schwachen Agonisten) auf östrogene Wirkung mit erhöhter VTG-Konzentration in männlichen Fischen, eine positive Kontrollchemikalie (z. B. Fadrozol oder Prochloraz in einer Konzentration von 300  $\mu$ g/l) auf Aromatasehemmung mit reduzierter VTG-Konzentration in weiblichen Fischen und eine positive Kontrollchemikalie (z. B. 17 $\beta$ -Trenbolon in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/l) auf androgene Wirkung und resultierender Induktion sekundärer Geschlechtsmerkmale bei weiblichen Dickkopfelnritzen und weiblichen Japanischen Reiskärpflingen zu prüfen. Diese Daten können insgesamt mit verfügbaren Daten aus den Validierungsstudien (1) (2) (3) verglichen werden, um die Eignung des jeweiligen Labors sicherzustellen.

56. Grundsätzlich gelten VTG-Messungen als positiv, wenn eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung der VTG-Konzentration in männlichen Fischen oder eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduzierung bei weiblichen Fischen zumindest bei der höchsten geprüften Dosis im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt wird und keine Anzeichen einer allgemeinen Toxizität vorliegen. Ein positives Ergebnis wird auch durch Nachweis einer biologisch plausiblen Beziehung zwischen der Dosis und der Wirkungskurve bestätigt. Wie bereits erläutert, muss eine Reduzierung der VTG-Konzentration nicht unbedingt endokrinen Ursprungs sein. Ein positives Ergebnis sollte jedoch grundsätzlich als In-vivo-Nachweis einer endokrinen Wirkung ausgelegt werden und zur Klärung weitere Untersuchungen nach sich ziehen.
57. Die Regulierungsbehörden können eine Histopathologie der Gonaden verlangen, um die Reproduktionsfähigkeit der Versuchstiere zu bestimmen und eine evidenzbasierte Bewertung der Testergebnisse zu ermöglichen. Eine solche Histopathologie der Gonaden muss u. U. nicht durchgeführt werden, wenn entweder VTG oder die sekundären Geschlechtsmerkmale positiv sind (d. h. VTG-Zunahme oder -Abnahme oder Induktion sekundärer Geschlechtsmerkmale).

## LITERATURHINWEISE

- (1) OECD (2006a). *Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A)*. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 60.
- (2) OECD (2006b). *Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B)*. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 61, Paris.
- (3) OECD (2007). *Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances*. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 78, Paris.
- (4) Owens JW (2007). *Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay*. CEFIC LRI Project, Endocrine. <http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects> (accessed 18/09/08).
- (5) US EPA (2007). *Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report*. 15. Dezember 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 ff.
- (6) OECD (2008). *Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report*. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 94, Paris.
- (7) Sumpter J.P. und S. Jobling (1995). *Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment*. *Environmental Health Perspectives*; 103 Suppl 7:173-8 Review.
- (8) Pawlowski S., et al. (2004). *Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)*

- determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*; 68(3):277-91.
- (9) Andersen L., et al. (2006). *Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio)*. *Aquatic Toxicology*; 76(3-4):343-52.
- (10) Ankley G.T., et al. (2002). *Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas)*. *Toxicological Sciences*; 67(1):121-30.
- (11) Panter G.H., et al. (2004). *Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development*. *Aquatic Toxicology*; 70(1):11-21.
- (12) Parks L.G., et al. (1999). *Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 123(2):113-25.
- (13) Panter G.H., et al. (1999). *Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals*. CEFIC-EMSG-Forschungsbericht AQ001. CEFIC, Brüssel, Belgien.
- (14) Fenske M., et al. (2001). *Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals*. *Comp. Biochem. Phys. C* 129 (3): 217-232.
- (15) Holbech H., et al. (2001). *Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology*; 130: 119-131
- (16) Rose J., et al. (2002). *Vitellogenin induction by 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio)*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 531-539.

- (17) Brion F., et al. (2002). *Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)*. *Environmental Toxicology and Chemistry*; Vol. 21: 1699-1708.
- (18) Yokota H., et al. (2001). *Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes)*. *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.
- (19) Tatarazako N., et al. (2004). *Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka*. *Journal of Health Science* 50:301-308.
- (20) Ankley G.T., et al. (2003). *Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow*. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 22(6): 1350-60.
- (21) Seki M., et al. (2004). *Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes)*. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 23(3):774-81.
- (22) OECD (2010). *Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology*. *OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123*, Paris.
- (23) OECD (2000) *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*. *Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23*. Paris
- (24) Hutchinson T.H., et al. (2006a). *Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review*. *Review. Aquatic Toxicology*, 76; 69-92.
- (25) Hutchinson T.H., et al. (2006b). *Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as „signposts,“ not „traffic lights,“ in risk assessment*. *Environmental Health Perspectives*; 114 Suppl 1:106-14.
- (26) Miles-Richardson S.R., et al. (1999). *Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas)*. *Aquat. Toxicol.* 47, 129-145.

- (27) Martinovic D., et al. (2008). *Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem.* 27, 478-488.
- (28) OECD (2006c), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54*, OECD, Paris.
- (29) US EPA (2008), *Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay*, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 S.
- (30) OECD (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150*, OECD, Paris.



## Anlage 1

### ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN

**Besatz:** Verhältnis des Nassgewichts der Fische zum Wasservolumen.

**Besatzdichte:** Anzahl Fische je Wasservolumen.

**Chemikalie:** Stoff oder Gemisch.

**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

**HPG-Achse:** Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse.

**MTC:** Maximum Tolerated Concentration, höchste noch verträgliche Konzentration, etwa 10 % des LC<sub>50</sub>-Werts.

**Prüfchemikalie:** Stoff oder Gemisch, der bzw. das nach dieser Prüfmethode getestet wird.

**VK:** Variationskoeffizient.

**VTG:** Vitellogenin ist ein Phospholipoglycoprotein-Vorläufer für Eidotterprotein, das in der Regel bei geschlechtlich aktiven weiblichen Tieren aller eierlegenden Arten vorkommt.

## Anlage 2

### VERSUCHSBEDINGUNGEN FÜR DEN FISCH-SCREENING-TEST ZUR BESTIMMUNG ENDOKRINER WIRKUNGEN

<b>1. Empfohlene Arten</b>	<b>Dickkopfritze (<i>Pimephales promelas</i>)</b>	<b>Japanischer Reiskarpfing (<i>Oryzias latipes</i>)</b>	<b>Zebrafärbing (<i>Danio rerio</i>)</b>
2. Testtyp	Durchflusssystem	Durchflusssystem	Durchflusssystem
3. Wassertemperatur	25 ± 2 °C	25 ± 2 °C	26 ± 2 °C
4. Beleuchtung	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)	Leuchtstofflampen (breites Spektrum)
5. Lichtintensität	10-20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540-1000 lx oder 50-100 ft-c (Laborqualität)	10-20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540-1000 lx oder 50-100 ft-c (Laborqualität)	10-20 µE/m <sup>2</sup> /s, 540-1000 lx oder 50-100 ft-c (Laborqualität)
6. Fotoperiode (Morgen-/Abenddämmerungsphasen optional; nicht unbedingt erforderlich)	16 Std. Licht, 8 Std. Dunkelheit	12-16 Std. Licht, 12-8 Std. Dunkelheit	12-16 Std. Licht, 12-8 Std. Dunkelheit
7. Besatz	< 5 g/l	< 5 g/l	< 5 g/l
8. Größe der Prüfkammern	10 l (mind.)	2 l (mind.)	5 l (mind.)
9. Volumen der Testlösung	8 l (mind.)	1,5 l (mind.)	4 l (mind.)
10. Erneuerung der Testlösungen	Mindestens 6-mal täglich	Mindestens 5-mal täglich	Mindestens 5-mal täglich
11. Alter der Testorganismen	Siehe Nummer 21	Siehe Nummer 21	Siehe Nummer 21

12. Ungefähres Nassgewicht der adulten Fische (g)	Weibchen: $1,5 \pm 20 \%$ Männchen: $2,5 \pm 20 \%$	Weibchen: $0,35 \pm 20 \%$ Männchen: $0,35 \pm 20 \%$	Weibchen: $0,65 \pm 20 \%$ Männchen: $0,4 \pm 20 \%$
13. Anzahl Fische pro Prüfgefäß	6 (2 Männchen, 4 Weibchen)	6 (3 Männchen, 3 Weibchen)	10 (5 Männchen, 5 Weibchen)
14. Anzahl der Behandlungen	= 3 (sowie entsprechende Kontrollen)	= 3 (sowie entsprechende Kontrollen)	= 3 (sowie entsprechende Kontrollen)

## Anlage 2 (Fortsetzung)

15. Anzahl Gefäße je Behandlung	Mindestens 4	Mindestens 4	Mindestens 2
16. Anzahl der Fische je Testkonzentration	16 adulte Weibchen und 8 Männchen (4 Weibchen und 2 Männchen pro Replikatgefäß)	12 adulte Weibchen und 12 Männchen (3 Weibchen und 3 Männchen pro Replikatgefäß)	10 adulte Weibchen und 10 Männchen (5 Weibchen und 5 Männchen pro Replikatgefäß)
17. Fütterungsregime	Lebende oder tiefgefrorene adulte Salinenkrebse oder Salinenkrebs-Nauplien zwei- bis dreimal täglich (ad libitum), handelsübliches Futter oder beides in Kombination	Salinenkrebs-Nauplien zwei- bis dreimal täglich (ad libitum), handelsübliches Futter oder beides in Kombination	Salinenkrebs-Nauplien zwei- bis dreimal täglich (ad libitum), handelsübliches Futter oder beides in Kombination
18. Belüftung	Keine, es sei denn, der Gehalt an gelöstem Sauerstoff fällt unter eine Luftsättigung von 60 %	Keine, es sei denn, der Gehalt an gelöstem Sauerstoff fällt unter eine Luftsättigung von 60 %	Keine, es sei denn, der Gehalt an gelöstem Sauerstoff fällt unter eine Luftsättigung von 60 %
19. Verdünnungswasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser oder entchlortes Leitungswasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser oder entchlortes Leitungswasser	Sauberes Oberflächen- oder Brunnenwasser oder rekonstituiertes Wasser oder entchlortes Leitungswasser
20. Präexposition	möglichst 7-14 Tage	möglichst 7-14 Tage	möglichst 7-14 Tage
21. Expositionsdauer	21 Tage	21 Tage	21 Tage
22. Biologische Endpunkte	- Überleben - Verhalten - Fruchtbarkeit - sekundäre Geschlechtsmerkmale - VTG - optional Histopathologie der Gonaden	- Überleben - Verhalten - Fruchtbarkeit - sekundäre Geschlechtsmerkmale - VTG - optional Histopathologie der Gonaden	- Überleben - Verhalten - Fruchtbarkeit - VTG - optional Histopathologie der Gonaden
23. Akzeptanz des Tests	Gelöster Sauerstoff $\geq 60$ % Sättigung; mittlere Temperatur $25 \pm 2$ °C;	Gelöster Sauerstoff $\geq 60$ % Sättigung; mittlere Temperatur $25 \pm 2$ °C;	Gelöster Sauerstoff $\geq 60$ % Sättigung; mittlere Temperatur $26 \pm 2$ °C;

90 %ige Überlebensrate der Fische in den Kontrollen; gemessene Testkonzentrationen innerhalb von 20 % der mittleren Messwerte je Behandlungsstufe.

90 %ige Überlebensrate der Fische in den Kontrollen; gemessene Testkonzentrationen innerhalb von 20 % der mittleren Messwerte je Behandlungsstufe.

90 %ige Überlebensrate der Fische in den Kontrollen; gemessene Testkonzentrationen innerhalb von 20 % der mittleren Messwerte je Behandlungsstufe.

### Anlage 3

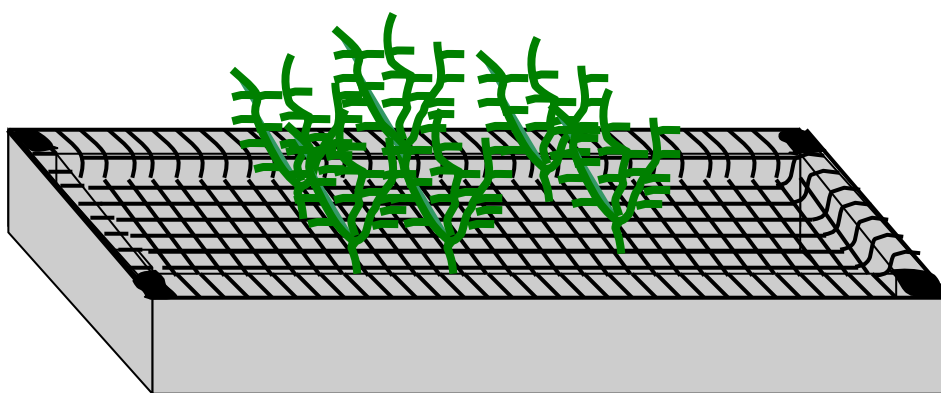
#### CHEMISCHE MERKMALE EINES GEEIGNETEN VERDÜNNUNGSWASSERS

BESTANDTEIL	KONZENTRATIONEN
Partikel	< 20 mg/l
Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff	< 2 mg/l
Nichtionisierter Ammoniak	< 1 µg/l
Restchlor	< 10 µg/l
Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen	< 50 ng/l
Gesamtgehalt an organischem Chlor	< 25 ng/l

## Anlage 4A

### LAICHSUBSTRAT FÜR ZEBRABÄRBLINGE

**Laichschale:** beliebige Instrumentenschale aus Glas, beispielsweise 22 x 15 x 5,5 cm (L x B x T), abgedeckt mit abnehmbarem Maschendrahtgitter aus Edelstahl (Maschenweite 2 mm); das Gitter sollte die Schale unterhalb des Randes komplett abdecken.



Auf dem Gitter das Laichsubstrat fixieren. Dabei eine Struktur gewährleisten, in die sich die Fische zurückziehen können. Geeignet sind beispielsweise Aquarienpflanzen aus grünem Kunststoff. (Hinweis: Eine mögliche Adsorption der Prüfchemikalie an das Kunststoffmaterial muss in diesem Fall berücksichtigt werden.) Das Kunststoffmaterial in einer ausreichenden Menge warmen Wassers waschen, um sicherzustellen, dass etwa vorhandene Chemikalien ausgetrieben werden und nicht in das Testwasser gelangen. Bei Verwendung von Materialien aus Glas ist sicherzustellen, dass die Fische weder verletzt noch bei heftigen Schwimmbewegungen eingeeignet werden.

Der Abstand zwischen der Schale und den Glasscheiben muss mindestens 3 cm betragen, damit die Laichablage nicht außerhalb der Schale erfolgt. Die in die Schale abgelegten Eier fallen durch das Gitter und können 45-60 Minuten nach Einschalten der Beleuchtung entnommen werden. Die transparenten Eier haften nicht aneinander an und können bei

transversaler Beleuchtung leicht gezählt werden. Bei fünf Weibchen pro Gefäß gelten bis zu 20 Eier/Tag als wenig, bis zu 100 Eier/Tag als mittel und über 100 Eier/Tag als viel. Die Laichschale herausnehmen, die Eier einsammeln und die Laichschale wieder in das Prüfgefäß stellen – entweder so spät wie möglich am Abend oder sehr früh am Morgen. Bis zum erneuten Einstellen darf höchstens eine Stunde vergehen, da der vom Laichsubstrat ausgehende Reiz dazu führen kann, dass es zu ungewöhnlichen Zeitpunkten zu Paarung und Laichablage kommt. Wird die Laichschale dennoch später in das Prüfbecken gestellt, so sollte dies frühestens 9 Stunden nach dem Einschalten der Beleuchtung geschehen. Zu diesem späten Tageszeitpunkt erfolgt keine Laichablage mehr.

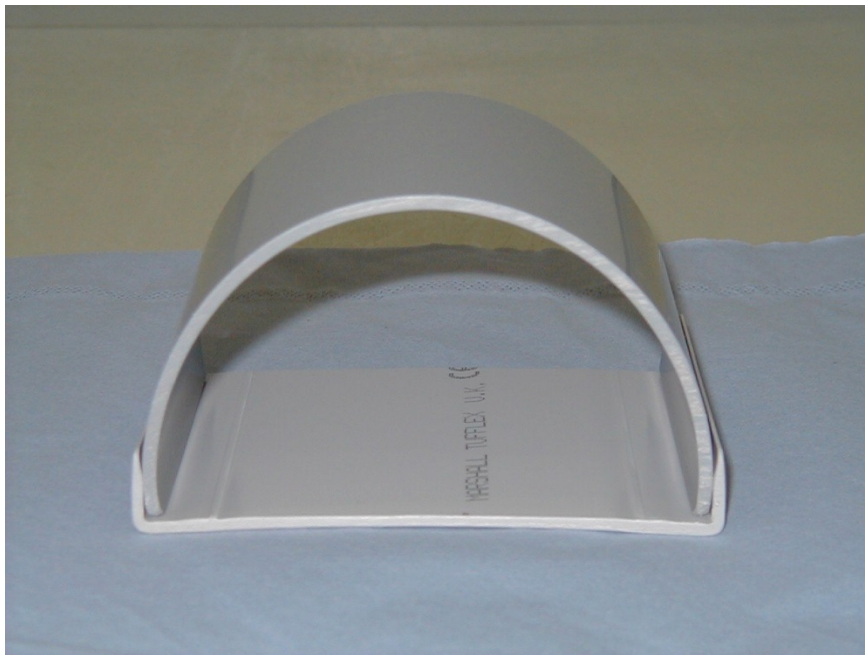


## Anlage 4B

### **LAICHSUBSTRAT FÜR DICKKOPFELRITZEN**

Zwei oder drei kombinierte Platten und Schalen aus Kunststoff/Keramik/Glas oder Edelstahl als Laichunterlage in die Prüfkammern (z. B. 80 mm lange graue halbrunde Rinnen, aufgesetzte auf eine gebördelte, 130 mm lange Schale) stellen (siehe Abbildung). Gut akklimatisierte PVC- oder Keramikschalen haben sich als Laichunterlage bewährt (Thorpe et al., 2007).

Die Platten anrauen, um die Haftung zu verbessern. Wenn nicht erwiesen ist, dass die Eier zuverlässig an der Laichunterlage haften, die Schalen außerdem mit einem Gitter abdecken, damit die Fische nicht an herabgefallene Eier gelangen.



Die Unterlage soll alle Eier aufnehmen können, die nicht an der Plattenoberfläche haften bleiben und folglich auf den Boden des Beckens fallen (sowie alle Eier, die direkt auf der flachen Kunststoffunterlage abgelegt werden). Alle Laichunterlagen sind vor Gebrauch mindestens 12 Stunden mit Verdünnungswasser zu spülen, um etwa vorhandene Schadstoffe

auszutreiben.

Thorpe, K.L., Benstead, R., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R., 2007. An *optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas**. *Aquatic Toxicology*, 81, 90-98.

## Anlage 5A

### **BEWERTUNG DER SEKUNDÄREN GESCHLECHTSMERKMALE BEI DICKKOPFELRITZEN ZUM NACHWEIS BESTIMMTER CHEMIKALIEN MIT ENDOKRINER WIRKUNG**

#### **Überblick**

Für Tests zum Nachweis endokriner Disruptoren potenziell wichtige äußere Merkmale bei adulten Dickkopfelritzen sind die Körperfarbe (hell/dunkel), die Farbmusterung (Vorhandensein oder Nichtvorhandensein senkrechter Streifen), die Körperform (Kopf- und Rumpfform, abdominale Distension) sowie spezifische sekundäre Geschlechtsmerkmale (Zahl und Größe der Laichknoten (Nuptialtuberkel), Größe des dorsalen Nackenaufwuchses und des Ovipositors).

Laichauschlag (Nuptialtuberkel) tritt am Kopf (dorsaler Aufwuchs) paarungsbereiter männlicher Dickkopfelritzen auf, gewöhnlich beidseitig symmetrisch (Jensen et al. 2001). Bei weiblichen Kontrollfischen sowie juvenilen männlichen und weiblichen Fischen zeigen sich keine Tuberkel (Jensen et al. 2001). Um die Augen und zwischen den Nasenöffnungen männlicher Tiere können sich bis zu acht Tuberkel bilden. Die meisten und größten Tuberkel finden sich in zwei parallelen Reihen unmittelbar unter den Nasenöffnungen und über dem Maul. Bei vielen Fischen befinden sich Tuberkelgruppierungen auch unterhalb des Unterkiefers; die in unmittelbarer Nähe des Mauls befindlichen Tuberkel treten gewöhnlich als einzelnes Paar auf; ventral können sich Gruppen von bis zu vier Tuberkeln entwickeln. In der Regel bilden sich selten mehr als 30 Tuberkel (typischerweise 18-28; Jensen et al. 2001). Zumeist (quantitativ gesehen) entwickeln sich Nuptialtuberkel als einzelne, verhältnismäßig runde Ausstülpungen, deren Höhe in etwa ihrem Radius entspricht. Die meisten paarungsbereiten Männchen weisen zumindest auch einige Tuberkel auf, die derart groß und auffällig sind, dass sie als Einzelstrukturen kaum noch erkennbar sind.

Einige Arten endokrin wirkender Chemikalien können beim jeweils anderen Geschlecht zu anomalen sekundären Geschlechtsmerkmalen führen. So können Androgenrezeptor-Agonisten wie  $17\alpha$ -Methyltestosteron oder  $17\beta$ -Trenbolon bewirken, dass sich bei weiblichen Dickkopfelritzen Nuptialtuberkel bilden (Smith 1974; Ankley et al. 2001; 2003), während Östrogenrezeptor-Agonisten bei männlichen Tieren zu einer Verringerung der Anzahl oder Größe der Tuberkel führen können (Miles-Richardson et al. 1999; Harries et al. 2000).

Laichausschlag bei Dickkopfelritzen wird nachstehend nach Verfahren charakterisiert, wie sie im Labor der US-amerikanischen Umweltschutzbehörde (Environmental Protection Agency) in Duluth, MN, üblich sind. Spezifische Produkte und/oder Geräte können durch verfügbare vergleichbare Materialien ersetzt werden.

Eine Sichtprüfung erfolgt am besten unter einem beleuchteten Vergrößerungsglas oder einem beleuchteten Stereomikroskop mit Dreifach-Vergrößerung. Die Fische dorsal mit der vorderen Körperhälfte nach vorne zeigend (d. h. Kopf zum Betrachter hin) untersuchen.

- Fisch mit der vorderen Körperhälfte nach vorne zeigend und in Bauchlage in eine kleine Petrischale (z. B. 100 mm Durchmesser) legen. Sucher scharf einstellen, damit die Tuberkel erkennbar werden. Fisch vorsichtig und langsam von einer Seite auf die andere drehen, um die Areale mit Tuberkeln zu bestimmen. Tuberkel zählen und einstufen.
- Untersuchung an der ventralen Kopfseite wiederholen; dazu den Fisch mit der dorsalen vorderen Körperhälfte nach vorne zeigend in die Petrischale legen.
- Die Untersuchung sollte pro Fisch nicht länger als 2 Minuten dauern.

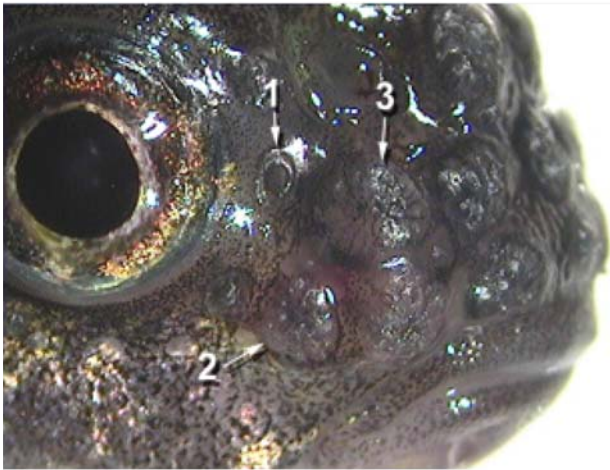
### **Zählen und Einstufen der Laichknoten (Nuptialtuberkel)**

Zur Bewertung der Ausprägung des Laichausschlags bei adulten Dickkopfelritzen wurden sechs Areale identifiziert. Zur Darstellung der Region und der Zahl vorhandener Tuberkel wurde eine Vorlage (Formular) entwickelt (siehe Ende dieser Anlage). Die Zahl der Tuberkel aufzeichnen, und die Tuberkel der Größe nach wie folgt einstufen: 0 – keine Tuberkel, 1 – präsent, 2 – vergrößert und 3 – ausgeprägt (Abb. 1).

Bewertung 0 bedeutet, dass keine Tuberkel vorhanden sind. Bewertung 1 – Tuberkel präsent - betrifft jeden Knoten, bei dem eine einzelne Ausstülpung in etwa dem Radius des Knotens entspricht. Bewertung 2 – vergrößerter Tuberkel - betrifft Knoten mit sternförmig ausgebildetem Gewebe, das sich in der Regel durch eine große Grundfläche mit von der Mitte ausgehenden Rillen oder Furchen auszeichnet. Nach oben sind die Tuberkel häufig stärker gezackt, können aber auch abgerundet sein. Bewertung 3 – ausgeprägter Laichausschlag - bedeutet in der Regel, dass das Areal verhältnismäßig groß und abgerundet und weniger strukturiert ist. Manchmal verschmelzen diese Tuberkel entlang einer oder mehrerer Regionen (B, C und D; s. u.). Farbe und Form sind ähnlich wie bei Bewertung 2, was manchmal die Unterscheidung erschwert. Eine Einstufung nach diesem System ergibt bei normalen männlichen Kontrollexemplaren mit 18-20 Tuberkeln einen Gesamtwert von <

50 Tuberkeln (Jensen et al. 2001).

## Abbildung 1



Die tatsächliche Anzahl Tuberkel kann bei bestimmten Fischen größer sein als es das Formularfeld für das einzustufende Ausschlagareal zulässt. In diesem Fall können rechts oder links neben dem betreffenden Feld zusätzliche Einstufungen angegeben werden. Die Vorlage muss daher nicht unbedingt Symmetrie aufzeigen. Eine weitere Methode zur Veranschaulichung paarweise auftretender oder vertikal auf der horizontalen Ebene des Mauls verbundener Tuberkel besteht in der doppelten Markierung zweier Einstufungen innerhalb eines einzigen Feldes.

### Darzustellende Tuberkelregionen:

A – Augenregion: Dorsal bis ventral um den vorderen Augenrand; in der Regel viele Tuberkel bei geschlechtsreifen männlichen Kontrollexemplaren; bei weiblichen Kontrollexemplaren nicht präsent; in der Regel paarweises Auftreten (jeweils ein Tuberkel in der Nähe des Auges) bzw. Einzelvorkommen bei androgen-exponierten weiblichen Tieren.

B – Nasenregion zwischen Nasengruben (Sensorkanalporen): bei männlichen Kontrollexemplaren in der Regel paarweises Auftreten in stärkerer Ausprägung (2 – vergrößert - oder 3 – stark ausgeprägt); bei weiblichen Kontrollexemplaren nicht präsent, jedoch vereinzelt Vorkommen bei androgen-exponierten weiblichen Tieren.

C – Nasenregion unmittelbar vor den Nasengruben, parallel zum Maul: in der Regel vergrößert oder stark ausgeprägt bei geschlechtsreifen männlichen Kontrollexemplaren; bei

weniger entwickelten männlichen Tieren oder androgen-exponierten weiblichen Tieren präsent oder vergrößert.

D – Maulregion (entlang der Maullinie): bei männlichen Kontrollexemplaren in der Regel ausgeprägt; bei weiblichen Kontrollexemplaren nicht präsent; bei androgen-exponierten weiblichen Tieren können jedoch Tuberkel vorkommen.

E – Unterkieferregion (nahe am Maul): gewöhnlich klein und gepaart; bei männlichen Kontroll- oder exponierten Fischen unterschiedlich ausgeprägt.

F – Rumpfregeion (ventral zu E): in der Regel klein und gepaart; bei männlichen Kontrollexemplaren und androgen-exponierten weiblichen Tieren präsent.

## Literaturhinweise

- (1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. *Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (Pimephales promelas)*. *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.
- (2) Ankley, G.T., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Kahl, M.D., Korte, J.J., Hornung, M.W., Henry, T.R., Denny, J.S., Leino, R.L., Wilson, V.S., Cardon, M.C., Hartig, P.C., Gray, E.L. 2003. *Effects of the androgenic growth promoter 17- $\beta$  trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow*. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.
- (3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. *Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas)*. *Environ Sci Technol* 34:3003-3011.
- (4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. *Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas)*. *Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.
- (5) Kahl, M.D., Jensen, K.M., Korte, J.J., Ankley, G.T. 2001. *Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow*. *J Fish Biol* 59:515-523.

- (6) Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P. 1999. *Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas)*. *Aquat Toxicol* 47:129-145.
- (7) Smith, R.J.F. 1974. *Effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas)*. *Can J Zool* 52:1031-1038.

**Vorlage:**

**ID** \_\_\_\_\_ **Einstufung des Laichausschlags (Nuptialtuberkel)**  
**Datum**\_\_ 1 – präsent  
**Gesamtbewertung** \_\_\_\_\_ 2 – vergrößert  
 3 – ausgeprägt

	<b>A</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>
--	----------	-----------	-----------	-----------	-----------

	<b>B</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>
--	----------	-----------	-----------	-----------	-----------

	<b>C</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>
	<b>D</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>

		<b>E</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	
		<b>F</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>	<b>X1</b>



## Anlage 5B

### **BEWERTUNG DER SEKUNDÄREN GESCHLECHTSMERKMALE BEI JAPANISCHEN REISKÄRPFLINGEN ZUM NACHWEIS BESTIMMTER CHEMIKALIEN MIT ENDOKRINER WIRKUNG**

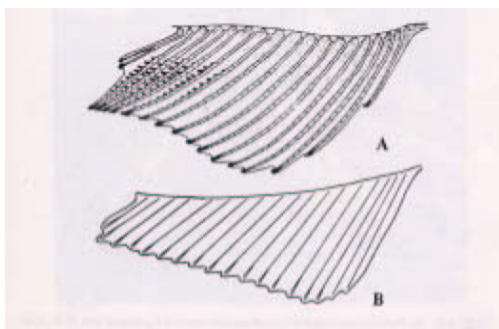
Im Folgenden wird die Messung von Papillenprozessen\* als sekundäre Geschlechtsmerkmale Japanischer Reiskarpfinge (*Oryzias latipes*) beschrieben.

\* Zu Papillenprozessen kommt es in der Regel nur bei adulten männlichen Tieren; betroffen sind Flossenstrahlen ab dem zweiten bis zum siebten oder achten Strahl, gezählt ab dem hinteren Ende der Afterflosse (Abb. 1 und 2). Am ersten Flossenstrahl (gezählt ab dem hinteren Ende der Afterflosse) kommen die Papillenprozesse selten vor. Das nachstehend beschriebene Standardarbeitsverfahren (SOP) umfasst die Messung von Papillenprozessen am ersten Flossenstrahl (bei diesem SOP ab dem hinteren Ende der Afterflosse gezählt).

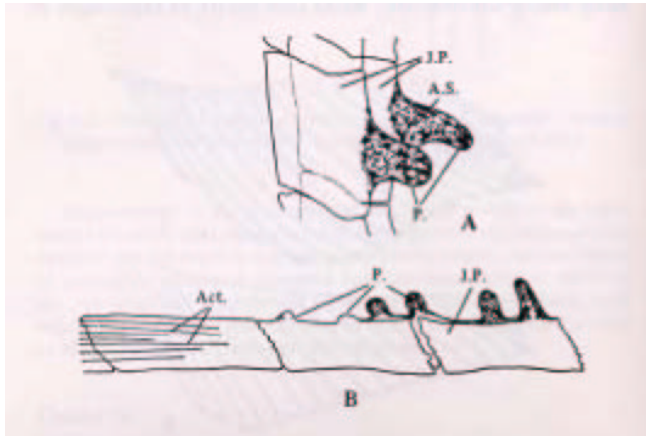
- (1) Nach Ausräumung der Leber (Anlage 6) den Fisch in ein konisches Rohr mit etwa 10 ml 10%igem neutral gepuffertem Formalin legen (Kopf nach oben, Schwanz nach unten). Wenn die Gonaden in einer anderen Lösung als 10%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert werden, den Körper zwischen dem vorderen Bereich der Afterflosse und dem After mit einer Rasierklinge transversal durchtrennen, ohne die Genitalpapillen und die eigentlichen Gonaden zu beschädigen (Abb. 3). Den Fisch mit der kranialen Seite in die Fixierlösung legen, um die Gonaden zu konservieren; die Schwanzseite in die 10%ige neutral gepufferte Formalinlösung legen (s. o.).
- (2) Nach Einlegen des Fisches in 10 %iges neutral gepuffertes Formalin den vorderen Bereich der Afterflosse mit einer Pinzette fassen und für etwa 30 Sekunden spreizen, um die Afterflosse offen zu halten. Beim Greifen mit einer Pinzette einige Flossenstrahlen im vorderen Bereich vorsichtig mitfassen, um Kratzer auf den Papillen zu vermeiden.
- (3) Nach dem Spreizen der Afterflosse für etwa 30 Sekunden den Fisch bis zur Messung der Papillenprozesse in 10 %igem neutral gepuffertem Formalin bei Raumtemperatur aufbewahren. (Die Messung frühestens nach 24-stündiger Fixierung vornehmen.)

Messung

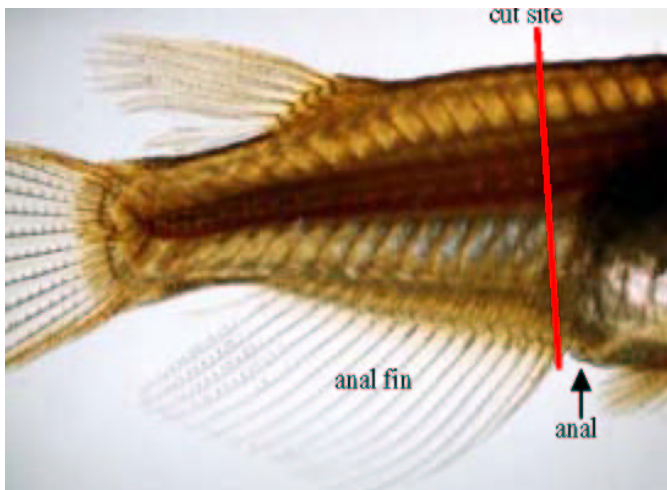
- (1) Nach Fixieren des Fischkörpers in 10 %iger neutral gepufferter Formalinlösung für mindestens 24 Stunden die Körper aus dem konischen Rohr nehmen; das Formalin mit Filterpapier (oder Papiertüchern) abtupfen.
- (2) Den Fisch mit der Bauchseite nach oben legen. Die Afterflosse mit einer kleinen Sezierschere vorsichtig abtrennen (vorzugsweise mit etwas Pterygiophorgewebe).
- (3) Den vorderen Teil der abgetrennten Afterflosse mit einer Pinzette aufnehmen und mit einigen Tropfen Wasser auf einem Glasträger fixieren. Die Afterflosse mit einem Deckglas abdecken. Beim Fassen mit der Pinzette darauf achten, dass die Papillen nicht zerkratzt werden.
- (4) Die verbundenen Flossenplatten mit Papillenprozessen mit Hilfe des Zählers unter einem Biomikroskop (aufrechtes oder Inversmikroskop) zählen. Papillenprozesse liegen vor, wenn am hinteren Rand der verbundenen Platte kleine Papillenbildungen zu erkennen sind. Die Zahl der verbundenen Platten mit Papillenprozessen für jeden einzelnen Flossenstrahl auf dem Arbeitsblatt vermerken (z. B. erster Flossenstrahl: 0, zweiter Flossenstrahl: 10, dritter Flossenstrahl: 12 usw.); die Summe dieser Zahlen, aufgeschlüsselt nach Fischen, in den Excel-Kalkulationsbogen eingetragen. Falls erforderlich, die Afterflosse fotografieren und die Zahl der verbundenen Flossenplatten mit Papillenprozessen auf dem Foto ermitteln.
- (5) Nach der Messung die Afterflosse zur Konservierung und Aufbewahrung in das unter Nummer 1 beschriebene konische Rohr legen.



**Abb. 1:** Schaubild zur Veranschaulichung der an Form und Größe der Afterflosse erkennbaren Geschlechtsunterschiede; A - männlich; B - weiblich. Oka, T. B., 1931. *On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish.* J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



**Abb. 2:** A - Prozesse auf verbundenen Afterflossenplatten. J.P. - verbundene Platte; A.S. - axialer Bereich; P - Prozess. B - Distales Ende des Flossenstrahls; Actinotrichien (Act.) an der Spitze; Oka, T. B., 1931. *On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish.* J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.



**Abb. 3:** Foto eines Fischkörpers mit Schnittstelle bei Fixierung der Gonaden in einer anderen Fixierlösung als 10%iges neutral gepuffertes Formalin. In diesem Fall wird der restliche Körper zwischen der vorderen Region der Afterflosse und dem After mit einer Rasierklinge (rote Linie) abgetrennt; die Kopfseite des Fisches wird in die Fixierlösung für Gonaden, die Schwanzseite in 10%iges neutral gepuffertes Formalin gelegt.

## Anlage 6

### **EMPFOHLENE VERFAHREN FÜR DIE ENTNAHME VON PROBEN FÜR DIE VITELLOGENIN-ANALYSE**

Es ist darauf zu achten, dass es nicht zu Kreuzkontaminationen zwischen den VTG-Proben männlicher und weiblicher Tiere kommt.

#### **Verfahren 1A: Dickkopfritze, Blutentnahme aus der Schwanzvene/-arterie**

Nach der Betäubung den Schwanzansatz mit einem Skalpell teilweise durchtrennen und mit einem heparinisierten Mikrohämatokrit-Kapillarröhrchen aus der Schwanzvene/-arterie Blut entnehmen. Nach der Blutentnahme das Plasma schnell durch 3-minütige Zentrifugierung mit 15 000 g (bzw. alternativ 10 min. mit 15 000 g bei einer Temperatur von 4 °C) isolieren. Soweit erwünscht, kann nach der Zentrifugierung der Hämatokritwert (in %) ermittelt werden. Anschließend das Plasma aus dem Mikrohämatokrit-Röhrchen entnehmen und in einem Zentrifugenröhrchen mit 0,13 Einheiten Aprotinin (einem Protease-Inhibitor) bei -80 °C aufbewahren, bis die VTG-Konzentration bestimmt werden kann. Je nach (geschlechtsabhängiger) Größe der Dickkopfritze können pro Fisch in der Regel 5-60 µl Plasma entnommen werden (Jensen et al. 2001).

#### **Verfahren 1B: Dickkopfritze, Blutentnahme aus dem Herzen**

Alternativ kann Blut auch durch Herzpunktion mittels heparinierter Spritze (1000 Einheiten Heparin pro ml) entnommen werden. Das Blut anschließend in Eppendorf-Röhrchen (auf Eis) geben und zentrifugieren (5 min, 7000 g, Raumtemperatur). Das Plasma in saubere Eppendorf-Röhrchen füllen (in Aliquoten, wenn das Plasmavolumen dies zulässt), umgehend auf -80 °C einfrieren und bis zur Analyse aufbewahren (Panter et al., 1998).

#### **Verfahren 2A: Japanische Reiskärpflinge, Exzision der Leber**

*Entnahme der Prüffische aus dem Prüfbecken*

- (1) Testfische mit dem kleinen Löffelsieb aus dem Prüfbecken nehmen. Dabei darauf achten, dass die Fische nicht in andere Becken fallen.

- (2) Die Fische grundsätzlich in nachstehender Reihenfolge entnehmen: Kontrolle, (gegebenenfalls) Lösungsmittelkontrolle, niedrigste Konzentration, mittlere Konzentration, höchste Konzentration und Positivkontrolle. Außerdem aus einem Prüfbecken zunächst alle männlichen Tiere entnehmen, dann die weiblichen.
- (3) Anhand der äußerlichen (sekundären) Geschlechtsmerkmale (z. B. Form der Afterflosse) das Geschlecht der Fische bestimmen.
- (4) Die Prüffische in ein Transportbehältnis setzen und zur Exzision der Leber an einen Arbeitsplatz bringen. Die Beschriftung des Prüfbeckens und des Transportbehältnisses auf Richtigkeit überprüfen, um sicherzustellen, dass die Zahl der aus dem Prüfbecken entnommenen Fische mit der Zahl der noch darin verbliebenen Fische übereinstimmt.
- (5) Kann das Geschlecht anhand der äußerlichen Merkmale nicht bestimmt werden, alle Fische aus dem Prüfbecken entnehmen. In diesem Fall das Geschlecht durch Sichtprüfung der Gonaden oder der sekundären Geschlechtsmerkmale unter einem Stereomikroskop bestimmen.

#### *Exzision der Leber*

- (1) Die Prüffische aus dem Transportbehältnis nehmen und mit dem kleinen Löffelsieb in die Betäubungslösung setzen.
- (2) Nach dem Betäuben den Prüffisch mit einer (handelsüblichen) Pinzette auf Filterpapier (oder ein Papiertuch) legen. Dabei die Pinzette beidseitig am Kopf ansetzen, damit der Schwanz nicht bricht.
- (3) Die Oberfläche des Fisches mit Filterpapier (oder einem Papiertuch) trockentupfen.
- (4) Den Fisch mit der Bauchseite nach oben legen. Mit einer kleinen Sezierschere zwischen ventralem Halsbereich und Bauchmitte einen kleinen transversalen Einschnitt vornehmen.
- (5) Die Sezierschere in diesen kleinen Einschnitt einführen und den Bauch auf einer kaudal zum Kiemenbogen angesetzten Schnittlinie entlang der Bauchmittellinie bis hin zur kranialen Seite des Afters öffnen. Um Leber und Gonaden nicht zu beschädigen, die Sezierschere nicht zu tief einführen.

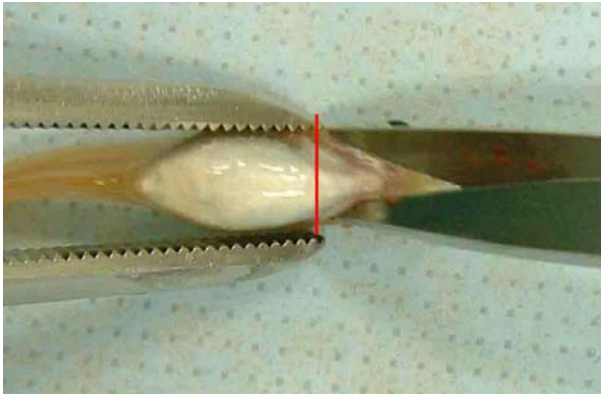
- (6) Unter dem Stereomikroskop folgende Schritte vornehmen:
- (7) Den Fisch mit der Bauchseite nach oben auf das Papiertuch (oder eine gläserne Petrischale oder einen Glasträger) legen.
- (8) Die Wände der Bauchhöhle mit Präzisionspinzetten spreizen und die inneren Organe freilegen. Falls erforderlich, kann dazu eine Seite der Bauchhöhle entfernt werden.
- (9) Den anhaftenden Teil der Leber und der Gallenblase mit einer weiteren Präzisionspinzette freilegen. Den Gallengang fassen und die Gallenblase abtrennen. Dabei darauf achten, dass letztere nicht beschädigt wird.
- (10) Die Speiseröhre fassen, und auf die gleiche Weise den Magen-Darm-Trakt von der Leber abtrennen. Darauf achten, dass kein Magen-Darm-Inhalt austritt. Den Magen-Darm-Trakt schwanzseitig vom After trennen und aus der Bauchhöhle nehmen.
- (11) Fett und sonstiges Gewebe um die Leber entfernen. Die Leber darf dabei nicht beschädigt werden.
- (12) Den Leberausgang mit der Präzisionspinzette fassen und die Leber aus der Bauchhöhle entnehmen.
- (13) Die Leber auf den Glasträger legen. Mit der Präzisionspinzette erforderlichenfalls Fett und sonstiges externes Gewebe (z. B. Bauchfell) von der Leberoberfläche entfernen.
- (14) Das Gewicht der Leber mit einem 1,5-ml-Mikroröhrchen (Leergewicht) und einer elektronischen Analysewaage bestimmen. Den Messwert in das Arbeitsblatt eintragen (auf 0,1 mg genau). Mit den Angaben auf dem Etikett des Mikroröhrchens abgleichen.
- (15) Das Mikroröhrchen mit der Leber verschließen und in ein Kühlgestell (oder ein Eis-Rack) setzen.
- (16) Nach Exzision einer Leber die Sezierungsinstrumente reinigen oder wechseln.
- (17) Die Lebern aller Fische im Transportbehältnis entnehmen, wie oben beschrieben.

- (18) Nach Exzision der Lebern aller Fische im Transportbehältnis (d. h. aller männlichen oder allen weiblichen Tieren in einem Prüfbecken) die Leberproben in ein etikettiertes Reagenzglasgestell setzen und in einen Gefrierschrank stellen. Sind die Lebern kurz nach der Exzision einer Vorbehandlung zu unterziehen, die Proben in einem Kühlgestell (oder Eis-Rack) zum nächsten Arbeitsplatz bringen.

Nach Exzision der Lebern steht der Fischkörper zur Histologie der Gonaden und Messung der sekundären Geschlechtsmerkmale zu Verfügung.

### *Leberproben*

Die von den Prüffischen entnommenen Leberproben bei  $\leq -70\text{ °C}$  lagern, sofern sie nicht kurz nach der Exzision vorbehandelt werden sollen.

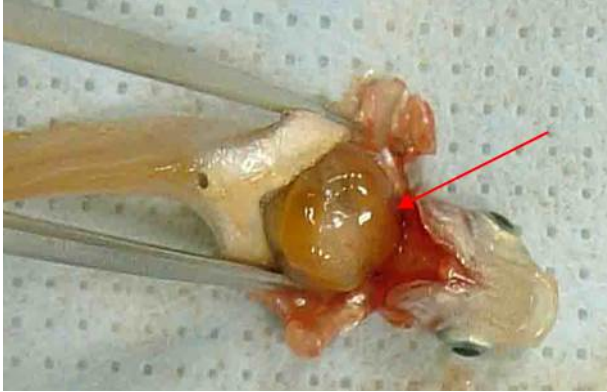


**Abb. 1**  
Unmittelbar vor den Brustflossen einen Schereneinschnitt vornehmen.



**Abb. 2**  
Auf der Bauchmittellinie bis zu einem Punkt etwa 2 mm kranial vor dem

After einen Scherenschnitt durchführen.



**Abb. 3**

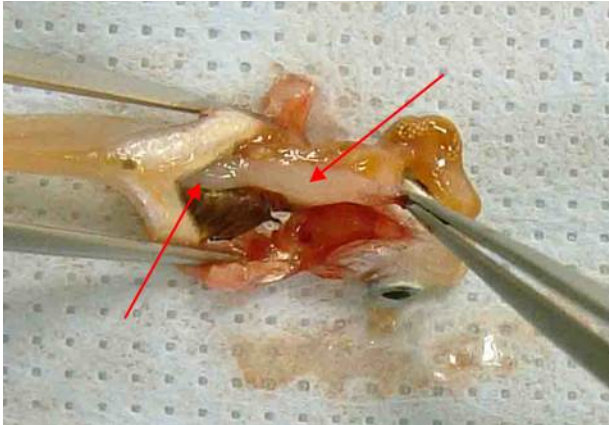
Die Bauchwände mit einer Pinzette spreizen, um die Leber und die anderen inneren Organe freizulegen. (Alternativ können die Bauchwände seitlich festgesteckt werden.)  
Der Pfeil zeigt auf die Leber.



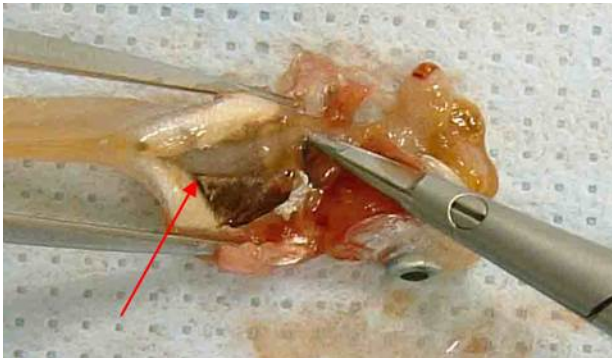
**Abb. 4**

Die Leber grob sezieren und mit einer Pinzette entnehmen.

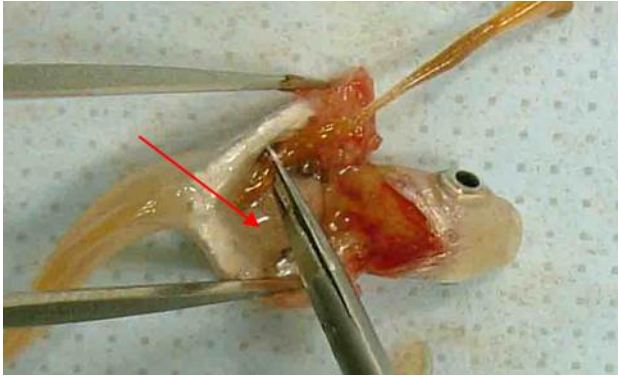




**Abb. 5**  
Darm mit der Pinzette vorsichtig herausziehen.



**Abb. 6**  
Beide Darmenden und etwaiges mesenteriales Gewebe mit einer Schere durchtrennen.



**Abb. 7 (Weibchen)**

Das Verfahren ist bei männlichen und weiblichen Fischen dasselbe.



**Abb. 8**

Verfahren abgeschlossen.

## **Verfahren 2 B: Japanische Reiskärpflinge (*Oryzias latipes*), Vorbehandlung der Leber für die Vitellogenin-Analyse**

Die Flasche mit dem Homogenatpuffer aus dem ELISA-Kit nehmen und mit zerstoßenem Eis kühlen (Temperatur der Lösung:  $\leq 4$  °C). Wird Homogenatpuffer aus dem EnBio-ELISA verwendet, die Lösung zunächst bei Raumtemperatur auftauen und die Flasche anschließend auf zerstoßenem Eis kühlen.

Das Volumen des Homogenatpuffers für die Leber richtet sich nach dem Lebergewicht (pro mg Leber je 50  $\mu$ l Homogenatpuffer.) Wiegt die Leber beispielsweise 4,5 mg, so beträgt das Volumen des Homogenatpuffers 225  $\mu$ l. Die Volumina der Homogenatpuffer für sämtliche Lebern in einer Liste erfassen.

### *Vorbereitung der Lebern zur Vorbehandlung*

- (1) Das 1,5-ml-Mikroröhrchen mit der Leber erst unmittelbar vor der Vorbehandlung aus dem Gefrierschrank nehmen.
- (2) Um Vitellogenin-Kontaminationen zu vermeiden, die Lebern männlicher Fische vor den Lebern der weiblichen Fische vorbehandeln. Die Vorbehandlung der Testgruppen sollte zudem in der folgenden Reihenfolge ablaufen: Kontrolle, (gegebenenfalls) Lösungsmittelkontrolle, niedrigste Konzentration, mittlere Konzentration, höchste Konzentration und Positivkontrolle.
- (3) Aus dem Gefrierschrank immer nur so viel 1,5-ml-Mikroröhrchen mit Leberproben entnehmen, wie auch gleichzeitig zentrifugiert werden können.
- (4) Die 1,5-ml-Mikroröhrchen mit den Leberproben in der Reihenfolge der Nummern der Proben aus dem Eis-Rack anordnen. (Die Lebern brauchen nicht aufgetaut zu werden.)

### *Vorbehandlung*

#### 1) Zugabe des Homogenatpuffers

Nachdem anhand der Liste geprüft wurde, welches Volumen des Homogenatpuffers jeweils für ein Leberpräparat zu verwenden ist, die Mikropipette (Volumenbereich: 100-1000  $\mu$ l) auf das entsprechende Volumen einstellen. Eine saubere Spitze aufsetzen.

Homogenatpuffer aus der Reagenzflasche entnehmen und in die 1,5-ml-Mikroröhrchen mit Leber geben.

Homogenatpuffer allen leberhaltigen 1,5-ml-Mikroröhrchen wie oben beschrieben zugeben. Die Spitze der Mikropipette braucht nicht gewechselt zu werden. Ist die Spitze jedoch verunreinigt oder wird vermutet, dass sie verunreinigt ist, muss sie jedoch ausgewechselt werden.

## 2) Homogenisieren der Leber

- Am Homogenisator ein neues Pistill befestigen.
- Das Pistill in das 1,5-ml-Mikroröhrchen einführen. Dabei den Mikroröhrchen-Homogenisator so halten, dass die Leber zwischen Pistill-Oberfläche und innere Wand des 1,5-ml-Mikroröhrchens gedrückt wird.
- Den Mikroröhrchen-Homogenisator für 10-20 Sekunden bedienen. Danach das 1,5-ml-Mikroröhrchen auf zerstoßenem Eis abkühlen.
- Das Pistill aus dem 1,5-ml-Mikroröhrchen nehmen und die Probe etwa 10 Sekunden ruhen lassen. Anschließend eine Sichtprüfung des Suspensionszustands vornehmen.
- Sind Leberstückchen in der Suspension zu erkennen, die Schritte (3) und (4) wiederholen, um ein zufriedenstellendes Leberhomogenat zu erhalten.
- Das suspendierte Leberhomogenat bis zum Zentrifugieren auf dem Eis-Rack abkühlen.
- Das Pistill bei jedem neuen Homogenat auswechseln.
- Alle Lebern mit dem Homogenatpuffer homogenisieren, wie oben beschrieben.

## 3) Zentrifugen des suspendierten Leberhomogenats

- Sicherstellen, dass die gekühlte Zentrifugierkammer eine Temperatur von  $\leq 5\text{ °C}$  aufweist.
- Die 1,5-ml-Mikroröhrchen mit dem suspendierten Leberhomogenat in die gekühlte Zentrifuge stellen (erforderlichenfalls nach einer Ausbalancierung).
- Das suspendierte Leberhomogenat für 10 Minuten bei einer Temperatur von  $\leq 5\text{ °C}$  mit

13 000 g zentrifugieren. Wird der Überstand in geeigneter Weise abgetrennt, können Zentrifugalkraft und Zeitdauer jedoch nach Bedarf eingestellt werden.

- Nach der Zentrifugierung kontrollieren, ob der Überstand angemessen abgetrennt wurde (Oberfläche: lipid; Zwischenschicht: Überstand, untere Schicht: Lebergewebe). Bei unangemessener Trennung die Suspension unter denselben Bedingungen erneut zentrifugieren.
- Alle Proben aus der gekühlten Zentrifuge nehmen und in der Reihenfolge der Nummern der Proben auf dem Eis-Rack anordnen. Dabei darauf achten, dass die getrennten Schichten nach der Zentrifugierung nicht resuspendieren.

#### 4) Entnahme des Überstands

- Vier 0,5-ml-Mikroröhrchen zur Entnahme des Überstands in das Reagenzglasgestell setzen.
- Jeweils 30 µl Überstand (als Zwischenschicht abgetrennt) mit der Mikropipette entnehmen und in eines der 0,5-ml-Mikroröhrchen geben. Dabei darauf achten, dass kein Lipidmaterial (Oberfläche) oder Lebergewebe (untere Schicht) aufgenommen wird.
- Den Überstand entnehmen und wie oben beschrieben in zwei weitere 0,5-ml-Mikroröhrchen dispensieren.
- Übrigen Überstand mit der Mikropipette entnehmen (möglichst  $\geq 100$  µl) und in das verbleibende 0,5-ml-Mikroröhrchen geben. Dabei darauf achten, dass kein Lipidmaterial (Oberfläche) oder Lebergewebe (untere Schicht) aufgenommen wird.
- Das 0,5-ml-Mikroröhrchen verschließen und auf dem Etikett das Volumen des Überstands notieren. Danach die Mikroröhrchen sofort auf dem Eis-Rack kühlen.
- Für jeden Überstand die Spitze der Mikropipette wechseln. Haftet sehr viel Lipidmaterial an der Spitze an, die Spitze umgehend auswechseln, um das Leberextrakt nicht mit Fett zu kontaminieren.
- Den gesamten zentrifugierten Überstand wie oben beschrieben in vier 0,5-ml-Mikroröhrchen geben.
- Danach alle etikettierten 0,5-ml-Mikroröhrchen in das Reagenzglasgestell setzen und im Gefrierfach einfrieren. Werden die VTG-Konzentrationen unmittelbar nach der Vorbehandlung gemessen, ein 0,5-ml-Mikroröhrchen (mit 30 µl des Überstands) im

Reagenzglasgestell abkühlen und an den Arbeitsplatz bringen, an dem der ELISA durchgeführt werden soll. In diesem Fall die übrigen Mikroröhrchen in die Reagenzglasgestelle setzen und im Gefrierschrank einfrieren.

- Nach Entnahme des Überstands den verbleibenden Rückstand angemessen entsorgen.

#### *Lagerung der Probe*

Die 0,5-ml-Mikroröhrchen mit dem Überstand des Leberhomogenats bis zur Durchführung des ELISA bei  $\leq -70$  °C lagern.

### **Verfahren 3A: Zebrabärblinge, Blutentnahme aus der Schwanzvene/-arterie**

Unmittelbar nach der Betäubung den Schwanzansatz mit einem Skalpell teilweise durchtrennen und mit einem heparinisierten Mikrohämatokrit-Kapillarröhrchen aus der Schwanzvene/-arterie Blut entnehmen. Die Blutvolumen betragen je nach Größe der Fische 5 bis 15  $\mu$ l. In das Mikrokapillarrohr die gleiche Menge Aprotininpuffer (6  $\mu$ g/ml in PBS) geben, und das Plasma durch Zentrifugieren (5 Minuten bei 600 g) vom Blut trennen. Das Plasma in den Teströhrchen auffangen und bis zur Bestimmung der VTG-Konzentration oder anderer relevanter Proteine bei -20 °C lagern.

### **Verfahren 3B: Zebrabärblinge, Blutentnahme durch Herzpunktion**

Um eine Koagulierung des Bluts und einen Proteinabbau zu vermeiden, die Proben mit heparinisierte (1000 Einheiten/ml) phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und dem Proteasehemmer Aprotinin (2 TIU/ml) entnehmen. Als Pufferbestandteile werden Heparin-Ammoniumsalz und lyophilisiertes Aprotinin, für die Blutentnahme Spritzen (1 ml) mit fixierter dünner Nadel (z. B. Braun Omnikan-F) empfohlen. Die Spritze muss mit der Pufferlösung vorgefüllt sein (ca. 100  $\mu$ l), damit die geringen Blutvolumina der einzelnen Fische vollständig eluiert werden können. Die Blutproben durch Herzpunktion entnehmen. Dazu die Fische zunächst mit MS-222 (100 mg/l) betäuben. Bei angemessener Betäubung ist der Herzschlag der Zebrabärblinge wahrnehmbar. Beim Punktieren des Herzens den Spritzenkolben unter leichter Spannung halten. Die zu entnehmendem Blutvolumina liegen zwischen 20 und 40  $\mu$ l. Nach der Herzpunktion das Blut-/Puffer-Gemisch in die Teströhrchen geben. Das Plasma durch Zentrifugieren (20 min mit 5000 g) vom Blut trennen und bis zur Analyse bei -80 °C lagern.

### **Verfahren 3C: Standardarbeitsverfahren (SOP): Zebrabärblinge, Homogenisierung von**

## Kopf- und Schwanzgewebe

1. Die Fische betäuben und töten, wie für den Test beschrieben.
2. Kopf und Schwanz der Fische abtrennen, siehe Abbildung 1. Wichtig: Alle Sezierinstrumente und das Sezierbrett sind nach jedem Fisch abzuspülen und ordnungsgemäß zu reinigen (z. B. mit 96 %igem Ethanol), um „VTG-Kontaminationen“ nicht induzierter Männchen durch weibliche Fische oder induzierte Männchen zu vermeiden.

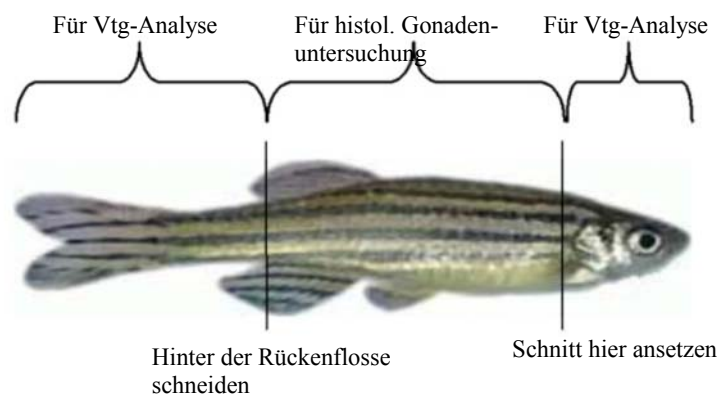


Abbildung 1

3. Das Gewicht der gepoolten Kopf- und Schwanzteile auf 1 mg genau abmessen.
4. Nach dem Wiegen die Teile in geeignete Röhrchen (z. B. 1,5 ml Eppendorf) geben und bei -80 °C bis zur Homogenisierung einfrieren oder unmittelbar mit zwei Kunststoff-Pistillen auf Eis homogenisieren. (Alternativ können auch andere Methoden angewendet werden, sofern sie auf Eis durchgeführt werden und eine homogene Masse entsteht.) Wichtig: *Die Röhrchen sind ordnungsgemäß zu nummerieren, damit die Kopf- und Schwanzteile für die histologische Gonadenuntersuchung dem jeweiligen Rumpf zugeordnet werden können.*
5. Nach Herstellung einer homogenen Masse das Vierfache des Gewebegewichts des eisgekühlten **Homogenisierungspuffers\*** hinzugeben. Mit den Pistillen weiterarbeiten, bis eine homogene Mischung entsteht. Wichtiger Hinweis: *Für jeden Fisch ist ein frisches Pistill zu verwenden.*

6. Die Proben bis zur Zentrifugierung (**4 °C**, 50 000 g, 30 Minuten) auf Eis legen.
7. Mit einer Pipette 20 µl-Portionen des Überstands in **mindestens zwei** Röhrchen geben; dabei die Spitze der Pipette durch die oberflächige Fettschicht führen und den Überstand vorsichtig ansaugen, ohne jedoch Fett- oder Pelletfraktionen mitaufzunehmen.
8. Die Röhrchen bis zur Verwendung bei -80 °C lagern.

*\*Homogenisierungspuffer:*

- (50 mm Tris-HCl pH 7,4; Proteasehemmer-Cocktail (1 %) (Sigma): 12 ml Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl Proteasehemmer-Cocktail.
- TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN) z. B. Bie & Berntsen, Dänemark.
- Proteasehemmer-Cocktail: Sigma (Säugetiergewebe) Produktnummer P 8340.

HINWEIS: Der Homogenisierungspuffer ist am Tag der Herstellung zu verbrauchen. Während der Verwendung muss die Pufferlösung auf Eis liegen.



## Anlage 7

### **VITELLOGENIN-ANGEREICHERTE PROBEN UND INTER-ASSAY-REFERENZSTANDARD**

An jedem Tag, an dem VTG-Bestimmungen vorgenommen werden, ist eine nach einem Inter-Assay-Referenzstandard hergestellte Anreicherungsprobe zu analysieren. Das für den Inter-Assay-Referenzstandard verwendete VTG muss aus einer anderen Charge als das VTG stammen, das zur Herstellung der Kalibrierstandards für den durchzuführenden Assay verwendet wurde.

Die Anreicherungsprobe wird hergestellt, indem eine bekannte Menge des Inter-Assay-Standards einer Plasmaprobe männlicher Kontrollfische zugegeben wird. Die Probe anreichern, bis eine VTG-Konzentration erreicht wird, die 10- bis 100-mal höher ist als die bei männlichen Kontrollfischen erwartete VTG-Konzentration. Die so angereicherte Probe kann von einem einzelnen Fisch oder von mehreren Fischen stammen.

In mindestens zwei Mulden eine Teilprobe nicht angereicherten Plasmas männlicher Kontrolltiere analysieren. Die angereicherte Probe auch in mindestens zwei Duplikatmulden analysieren. Die mittlere VTG-Menge in den beiden nicht angereicherten Plasmaproben männlicher Kontrollfische der berechneten VTG-Menge hinzurechnen, die zur Anreicherung der Proben zugegeben wurde, um die erwartete Konzentration zu bestimmen. Das Verhältnis dieser erwarteten zur gemessenen Konzentration zusammen mit den Ergebnissen der an dem betreffenden Tag durchgeführten Assays protokollieren.

## Anlage 8

### FLUSSDIAGRAMM ALS ENTSCHEIDUNGSHILFE FÜR DIE STATISTISCHE ANALYSE

