



Rat der  
Europäischen Union

115128/EU XXV. GP  
Eingelangt am 14/09/16

Brüssel, den 14. September 2016  
(OR. en)

12209/16  
ADD 3

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 Prüfmethode 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

## C.49 Prüfung auf akute Toxizität an Fischembryonen (FET)

### EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 236 (2013). Darin wird der Fischembryonentest auf akute Toxizität (FET) an Zebraquarienfischen (*Danio rerio*) beschrieben. Mit diesem Test soll die akute Toxizität von Chemikalien bei Fischen im Embryonalstadium bestimmt werden. Der FET-Test basiert auf Studien und Validierungen, die an Zebraquarienfischen durchgeführt wurden (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). Er wurde erfolgreich an einem breiten Spektrum von Chemikalien mit verschiedener Wirkungsweise, Löslichkeit, Flüchtigkeit und Hydrophobie getestet (15 und 16).
2. Die in dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

### PRINZIP DER PRÜFMETHODE

3. Frisch befruchtete Eier von Zebraquarienfischen werden der Prüfchemikalie über einen Zeitraum von 96 Stunden ausgesetzt. In Abständen von 24 Stunden werden bis zu vier apikale Beobachtungen als Letalitätsindikatoren protokolliert (6): i) Koagulation der befruchteten Eier, ii) fehlende Somitenbildung, iii) fehlende Abtrennung der Schwanzknospe vom Dottersack und iv) fehlender Herzschlag. Am Ende des Expositionszeitraums wird die akute Toxizität basierend auf einem positiven Ergebnis bei einer der vier protokollierten apikalen Beobachtungen bestimmt und die LC<sub>50</sub> berechnet.

### AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

4. Zu nützlichen Informationen über stoffspezifische Eigenschaften zählen Strukturformel, Molekulargewicht, Reinheit, Stabilität in Wasser, die Lichtbeständigkeit, pK<sub>a</sub> und K<sub>ow</sub>, Wasserlöslichkeit und Dampfdruck sowie die Ergebnisse einer Prüfung auf leichte biologische Abbaubarkeit (Kapitel C.4 (17) oder Kapitel C.29 (18)). Aus der Wasserlöslichkeit und dem Dampfdruck kann die Henry-Konstante berechnet werden, der zu entnehmen ist, ob erhebliche Verluste der Prüfchemikalie aufgrund von Verdampfung zu erwarten sind. Die Konzentration des Stoffs in den Prüflösungen sollte nach einer zuverlässigen Analysemethode mit bekannter und dokumentierter Genauigkeit und Nachweisgrenze bestimmt werden.
5. Wird die Prüfmethode zur Prüfung eines Gemischs angewandt, 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 (siehe Nummer 4). Bevor die Prüfmethode zur gesetzlich vorgeschriebenen Prüfung eines Gemischs angewendet wird, sollte geprüft werden, ob sie für solche Zwecke geeignete Ergebnisse liefert.

6. Was durch Metabolisierung aktivierbare Stoffe betrifft, so gibt es Anhaltspunkte dafür, dass Embryonen von Zebraquärlingen Biotransformationsfähigkeiten besitzen (19) (20) (21) (22). Jedoch ist die metabolische Kapazität embryonaler Fische nicht immer mit derjenigen von Jungfischen oder adulten Fischen vergleichbar. So wurden beispielsweise die protoxischen Eigenschaften von Allylkohol (9) im FET-Test nicht erkannt. Liegen daher Anzeichen vor, dass Metaboliten oder andere relevante Transformationsprodukte toxischer als die Ausgangsverbindung sind, empfiehlt es sich ferner, den Test mit diesen Metaboliten/Transformationsprodukten durchzuführen und diese Ergebnisse bei den Schlussfolgerungen zur Toxizität der Prüfchemikalie ebenfalls zu berücksichtigen oder alternativ einen anderen Test durchzuführen, bei dem die Metabolisierung stärker berücksichtigt wird.
7. Bei Stoffen mit einem Molekulargewicht  $\geq 3$  kDa und einer sehr massigen Molekularstruktur sowie Stoffen, die zu einem verzögerten Schlüpfen führen, wodurch die Exposition nach dem Schlüpfen verhindert oder verringert werden kann, wird aufgrund der beschränkten Bioverfügbarkeit des Stoffs nicht von einer Empfindlichkeit der Embryonen ausgegangen. In solchen Fällen sind andere Toxizitätstests u. U. besser geeignet.

## **VALIDITÄT DER PRÜFUNG**

8. Die Testergebnisse sind gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:
  - a) Die Gesamtbefruchtungsrates aller entnommenen Eier sollte in der getesteten Charge  $\geq 70$  % sein.
  - b) Die Wassertemperatur in den Prüfkammern sollte während der gesamten Prüfdauer bei  $26 \pm 1$  °C gehalten werden.
  - c) Die Gesamtüberlebensrate der Embryonen in der Negativkontrolle (Verdünnungswasser) und gegebenenfalls in der Lösungsmittelkontrolle sollte bis zum Ende der 96 Stunden dauernden Exposition  $\geq 90$  % betragen.
  - d) Die Exposition gegenüber der Positivkontrolle (z. B. 4,0 mg/l 3,4-Dichloranilin bei Zebraquärlingen) sollte zu einer Mortalität von mindestens 30 % am Ende der Expositionsdauer von 96 Stunden führen.
  - e) Die Schlupfrates in der Negativkontrolle (und gegebenenfalls in der Lösungsmittelkontrolle) sollte am Ende der 96stündigen Exposition  $\geq 80$  % betragen.
  - f) Am Ende der Expositionsdauer von 96 Stunden sollten die Konzentration an gelöstem Sauerstoff in der Negativkontrolle und die höchste Prüfkonzentration  $\geq 80$  % der Sättigung betragen.

## **BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE**

9. Anlage 2 enthält einen Überblick über die empfohlenen Haltungs- und Prüfbedingungen.

### Apparatur

10. Die folgende Ausrüstung wird benötigt:

- a) Fischbecken aus chemisch inertem Material (z. B. Glas) und mit für den empfohlenen Besatz geeignetem Fassungsvermögen (siehe „Haltung der Zuchtfische“, Nummer 14);
- b) Inversmikroskop und/oder Stereomikroskop mit mindestens 80-facher Vergrößerung. Falls die Temperatur in dem Raum, in dem die Beobachtungen protokolliert werden, nicht auf  $26 \pm 1$  °C eingestellt werden kann, sind ein Kreuztisch mit Temperaturregelung oder andere Methoden zum Halten der Temperatur notwendig;
- c) Prüfkammern; z. B. standardmäßige 24-Mulden-Platten mit einer Tiefe von ca. 20 mm (siehe „Prüfkammern“, Nummer 11);
- d) z. B. Selbstklebefolie zum Abdecken der 24-Mulden-Platten;
- e) Inkubator oder klimatisierter Raum mit geregelter Temperatur, sodass eine Temperatur von  $26 \pm 1$  °C in den Mulden (oder Prüfkammern) gehalten werden kann;
- f) pH-Messgerät;
- g) Sauerstoffmessgerät;
- h) Gerät zur Messung von Wasserhärte und Leitfähigkeit;
- i) Laichschale: Instrumentenschalen aus Glas, Edelstahl oder anderen inerten Materialien; Drahtgitter (Maschenweite  $2 \pm 0,5$  mm) aus Edelstahl oder anderem inerten Material zum Schutz der Eier nach dem Legen; Laichsubstrat (z. B. künstliche Pflanzen aus inertem Material) (Kapitel C.48, Anlage 4a (23));
- j) Pipetten mit verbreiterten Öffnungen zum Entnehmen der Eier;
- k) Glasgefäße zum Ansetzen der Prüfkonzentrationen und des Verdünnungswassers (Becher, Messkolben, Messzylinder und Messpipetten) oder zum Entnehmen der Zebrabärblingseier (z. B. Becher, Kristallisierschalen);
- l) bei Verwendung alternativer Expositionssysteme für die Durchführung der Prüfung, wie z. B. Durchflusssystemen (24) oder passiven

Dosierungssystemen (25), werden entsprechende Einrichtungen und Geräte benötigt.

### **Prüfkammern**

11. Es sollten Prüfkammern aus Glas oder Polystyrol verwendet werden (z. B. 24-Mulden-Platten mit einem Fassungsvermögen von 2,5-5 ml pro Mulde). Falls eine Adsorption an Polystyrol vermutet wird (z. B. bei unpolaren, planaren Stoffen mit hohem  $K_{OW}$ -Wert), sollten inerte Materialien (Glas) verwendet werden, um die adsorptionsbedingten Verluste gering zu halten (26). Die Prüfkammern sollten nach dem Zufallsprinzip in den Inkubator gestellt werden.

### **Wasser und Prüfbedingungen**

12. Es wird empfohlen, das Haltungswasser zu verdünnen, um die für verschiedenste Oberflächengewässer typischen Wasserhärtewerte zu erreichen. Das Verdünnungswasser sollte aus rekonstituiertem Wasser zubereitet werden (27). Der resultierende Härtegrad sollte 100-300 mg/l  $CaCO_3$  entsprechen, um eine übermäßige Ausfällung von Calciumcarbonat zu verhindern. Es kann auch anderes gut charakterisiertes Oberflächen- oder Brunnenwasser verwendet werden. Das rekonstituierte Wasser kann durch Verdünnung mit entionisiertem Wasser bis zu einem Verhältnis von 1:5 zum Erreichen einer Mindesthärte von 30-35 mg/l  $CaCO_3$  an Haltungswasser mit geringer Härte angepasst werden. Vor Zugabe der Prüfchemikalie wird das Wasser bis zur Sauerstoffsättigung belüftet. Während der gesamten Prüfung sollte die Temperatur in den Mulden bei  $26 \pm 1$  °C gehalten werden. Der pH-Wert sollte im Bereich zwischen 6,5 und 8,5 liegen und während der Prüfung um höchstens 1,5 Einheiten schwanken. Wird davon ausgegangen, dass der pH-Wert nicht in diesem Bereich bleibt, sollte der pH-Wert vor Durchführung der Prüfung angepasst werden. Der pH-Wert ist so anzupassen, dass die Konzentration der Stammlösung nicht in erheblichem Maß verändert und keine chemische Reaktion oder Ausfällung der Prüfchemikalie verursacht wird. Es wird empfohlen, zur Korrektur des pH-Werts in den Lösungen mit der Prüfchemikalie Chlorwasserstoff (HCl) und Natriumhydroxid (NaOH) zu verwenden.

### **Prüflösungen**

13. Die Prüflösungen mit den gewünschten Konzentrationen können z. B. durch Verdünnung einer Stammlösung zubereitet werden. Die Stammlösungen sollten vorzugsweise durch einfaches Mischen oder Einrühren der Prüfchemikalie in das Verdünnungswasser mit mechanischen Mitteln (z. B. Rührwerk und/oder Ultraschall) hergestellt werden. Ist die Prüfchemikalie nur schwer in Wasser löslich, sollten die im *OECD Guidance Document No. 23 on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures* beschriebenen Verfahren angewandt werden (28). Die Verwendung von Lösungsmitteln sollte vermieden werden, kann jedoch in einigen Fällen notwendig sein, um eine Stammlösung mit geeigneter Konzentration herzustellen. Wird für die Zubereitung der Stammlösung dennoch ein Lösungsmittel

verwendet, so sollte die Endkonzentration 100 µl/l nicht überschreiten und in allen Prüfgefäßen gleich sein. Bei Verwendung eines Lösungsmittels ist eine zusätzliche Lösungsmittelkontrolle erforderlich.

### **Haltung der Zuchtfische**

14. Für die Eiproduktion wird ein Zuchtbestand von nicht exponierten Wildtyp-Zebrabärblingen mit hinreichend dokumentierter Befruchtungsrate der Eier verwendet. Die Fische dürfen keine makroskopisch erkennbaren Infektions- und Krankheitssymptome aufweisen und zwei Monate vor dem Laichen keiner (akuten oder prophylaktischen) pharmazeutischen Behandlung unterzogen worden sein. Die Zuchtfische werden in Aquarien mit einer empfohlenen Besatzkapazität von 1 Liter Wasser pro Fisch und einer festgelegten Fotoperiode von 12-16 Stunden gehalten (29) (30) (31) (32) (33). Die Filtrationsraten sind optimal einzustellen; zu hohe Filtrationsraten, die zu einer starken Störung des Wassers führen, sind zu vermeiden. Hinweise zur Fütterung sind Anlage 2 zu entnehmen. Überfütterung ist zu vermeiden, und die Wasserqualität und die Sauberkeit der Aquarien sollten regelmäßig kontrolliert und erforderlichenfalls in den anfänglichen Zustand zurückversetzt werden.

### **Leistungstests**

15. Um die Empfindlichkeit des verwendeten Fischstamms zu prüfen, sollte vorzugsweise zweimal pro Jahr ein Test mit 3,4-Dichloranilin als Referenzchemikalie (in den Validierungsstudien (1) (2) verwendet) in einem vollständigen Konzentrations-Wirkungs-Bereich durchgeführt werden. Alle Labors, die diese Prüfmethode erstmals anwenden, müssen die Referenzchemikalie verwenden. Labors können diese Chemikalie verwenden, um ihre technische Kompetenz zur Durchführung des Tests nachzuweisen, bevor sie Daten für regulatorische Zwecke einreichen.

### **Eiproduktion**

16. Die Zebrabärblingseier können mithilfe von Laichgruppen (in einzelnen Laichbecken) oder durch Massenlaichen (in Haltingsbecken) produziert werden. Im Fall von Laichgruppen werden die Männchen und Weibchen (z. B. im Verhältnis 2:1) einer Zuchtgruppe am Tag vor der Prüfung einige Stunden vor Einbruch der Dunkelheit in Laichbecken eingesetzt. Da es gelegentlich vorkommen kann, dass Laichgruppen von Zebrabärblingen nicht laichen, wird die parallele Verwendung von mindestens drei Laichbecken empfohlen. Um eine genetische Verzerrung zu vermeiden, werden Eier von mindestens drei Zuchtgruppen entnommen, gemischt und randomisiert ausgewählt.
17. Für das Entnehmen der Eier werden am Tag vor der Prüfung vor Einbruch der Dunkelheit oder am Tag der Prüfung vor Beginn der Lichtphase Laichschalen in die Laich- oder Haltingsbecken gelegt. Damit die Eier nicht von adulten

Zebrabärblingen gefressen werden, sind die Laichschalen mit einem inertem Drahtgitter mit geeigneter Maschenweite (ca.  $2 \pm 0,5$  mm) abzudecken. Künstliche Pflanzen aus inertem Material (z. B. Kunststoff oder Glas) können als Laichstimulans an dem Gitter befestigt werden, falls dies für notwendig gehalten wird (3) (4) (5) (23) (35). Es sollten verwiterte Kunststoffmaterialien, die nicht auslaugen (z. B. Phthalate), verwendet werden. Paarung, Laichen und Befruchtung finden innerhalb von 30 Minuten nach Beginn der Lichtphase statt, und die Laichschalen mit den gesammelten Eiern können vorsichtig entnommen werden. Es wird empfohlen, die Eier nach dem Entnehmen aus den Laichschalen mit rekonstituiertem Wasser zu spülen.

### **Differenzierung der Eier**

18. Die befruchteten Eier durchlaufen nach 15 Minuten bei 26 °C die erste Furchung. Bei den nachfolgenden synchronen Furchungen werden 4-, 8-, 16- und 32-zellige Blastomeren gebildet (siehe Anlage 3) (35). Nach diesen Phasen können die befruchteten Eier anhand der Entwicklung einer Blastula eindeutig identifiziert werden.

## **VERFAHREN**

### **Expositionsbedingungen**

19. 20 Embryonen pro Konzentration (ein Embryo pro Mulde) werden der Prüfchemikalie ausgesetzt. Die Exposition sollte so sein, dass  $\pm 20$  % der nominalen Chemikalienkonzentration während der Prüfung erhalten bleiben. Ist dies in einem statischen System nicht möglich, sollte ein regulierbares semistatisches Erneuerungsintervall angewendet werden (z. B. Erneuerung alle 24 Stunden). In diesen Fällen müssen die Expositionskonzentrationen mindestens bei der höchsten und bei der niedrigsten Prüfkonzentrationen am Anfang und am Ende jedes Expositionsintervalls überprüft werden (siehe Nummer 36). Wenn eine Expositionskonzentration von  $\pm 20$  % der nominalen Konzentrationen nicht gehalten werden kann, müssen alle Konzentrationen am Anfang und am Ende jedes Expositionsintervalls überprüft werden (siehe Nummer 36). Bei der Erneuerung sollte darauf geachtet werden, dass die Embryonen noch von einer geringen Menge der alten Prüflösungen bedeckt sind, damit sie nicht austrocknen. Der Versuchsplan kann entsprechend den Prüfanforderungen der spezifischen Stoffe angepasst werden (z. B. Durchfluss- (24) oder passive Dosierungssysteme (25) bei leicht abbaubaren oder hoch adsorptiven Stoffen (29) oder sonstige Systeme bei flüchtigen Stoffen (36) (37)). In jedem Fall sollte darauf geachtet werden, möglichst wenig Stress für die Embryonen zu verursachen. Die Prüfkammern sollten vor Durchführung des Tests mindestens 24 Stunden den Prüflösungen ausgesetzt werden. Anlage 2 enthält eine Übersicht über die Prüfbedingungen.

## **Prüfkonzentrationen**

20. Normalerweise sind fünf Konzentrationen der Prüfchemikalie mit einem konstanten Abstandsfaktor von maximal 2,2 erforderlich, um die statistischen Anforderungen zu erfüllen. Die Verwendung von weniger als fünf Konzentrationen muss begründet werden. Die höchste geprüfte Konzentration sollte vorzugsweise zu 100 % Letalität führen, und die niedrigste geprüfte Konzentration sollte keine zu beobachtende Wirkung haben, wie unter Nummer 28 definiert. Der geeignete Konzentrationsbereich kann im Rahmen eines Dosisfindungstests vor der endgültigen Prüfung bestimmt werden. Für die Dosisfindung werden in der Regel zehn Embryonen pro Konzentration verwendet. Die folgenden Anweisungen beziehen sich auf die Durchführung des Tests in 24-Mulden-Platten. Werden andere Prüfkammern (z. B. kleine Petrischalen) verwendet oder mehr Konzentrationen getestet, müssen die Anweisungen entsprechend angepasst werden.
21. Details und visuelle Anweisungen für die Verteilung der Konzentrationen auf die 24-Mulden-Platten sind unter Nummer 27 und in Abbildung 1 in Anlage 4 zu finden.

## **Kontrollen**

22. Kontrollen mit Verdünnungswasser sind sowohl als Negativkontrolle als auch als Kontrolle innerhalb einer Platte erforderlich. Falls in der Plattenkontrolle mehr als ein toter Embryo vorgefunden wird, ist die Platte zu verwerfen, sodass sich die Anzahl der Konzentrationen, die zum Ableiten der  $LC_{50}$  verwendet wird, verringert. Wird eine komplette Platte verworfen, sind die beobachteten Wirkungen u. U. schwerer zu bewerten und zu unterscheiden, insbesondere, wenn es sich bei der verworfenen Platte um die Lösungsmittelkontrollplatte oder eine Platte handelt, bei der auch behandelte Embryonen betroffen sind. Im ersten Fall muss die Prüfung wiederholt werden. Im zweiten Fall kann der Wegfall einer kompletten Behandlungsgruppe aufgrund der Mortalität innerhalb der internen Kontrolle die Fähigkeit zur Bewertung der Wirkungen und zur Bestimmung der  $LC_{50}$ -Werte beeinträchtigen.
23. Bei jeder geprüften Charge von Eiern wird eine Positivkontrolle bei einer festgelegten Konzentration von 4 mg/l 3,4-Dichloranilin durchgeführt.
24. Wird ein Lösungsmittel verwendet, wird eine zusätzliche Gruppe von 20 Embryonen dem Lösungsmittel auf einer separaten 24-Mulden-Platte ausgesetzt und dient somit als Lösungsmittelkontrolle. Damit der Test als akzeptabel gilt, sollte nachgewiesen werden, dass das Lösungsmittel weder signifikante Auswirkungen auf Schlupfzeitpunkt oder Überlebensrate hat noch sich nachteilig auf die Embryonen auswirkt (siehe Nummer 8 Buchstabe c).

## **Beginn der Exposition und Dauer der Prüfung**

25. Die Prüfung beginnt sobald wie möglich nach der Befruchtung der Eier und endet nach 96 Stunden Exposition. Die Embryonen sollten vor Beginn der Furchung der Keimscheibe oder spätestens im 16-Zellen-Stadium in die Prüflösungen eingetaucht



werden. Um die Exposition baldmöglichst zu beginnen, wird mindestens die doppelte Anzahl der pro Behandlungsgruppe benötigten Eier randomisiert ausgewählt und spätestens 90 Minuten nach der Befruchtung in die jeweiligen Konzentrationen und Kontrollen gelegt (z. B. in 100 ml-Kristallisierschalen; die Eier sollten vollständig bedeckt sein).

26. Lebensfähige befruchtete Eier sollten von unbefruchteten Eiern getrennt und innerhalb von 180 Minuten nach der Befruchtung in 24-Mulden-Platten umgesetzt werden, die 24 Stunden lang vorkonditioniert und mit 2 ml/Mulde frisch zubereiteten Prüflösungen aufgefüllt wurden. Befruchtete Eier, die eine Spaltung durchlaufen und keine offensichtlichen Unregelmäßigkeiten während der Spaltung (z. B. Asymmetrie, Vesikelbildung) oder Verletzungen des Chorions zeigen, werden unter einem Stereomikroskop (vorzugsweise  $\geq 30$ -fache Vergrößerung) ausgewählt. Siehe Abbildungen 1 und 3 in Anlage 3 und Abbildung 2 in Anlage 4 bezüglich Entnahme und Trennung der Eier.

### **Verteilung der Eier auf die 24-Mulden-Platten**

27. Die Eier werden wie folgt auf die Mulden-Platten verteilt (siehe auch Abbildung 1 in Anlage 4):
- 20 Eier auf eine Platte für jede Prüfkonzentration;
  - 20 Eier als Lösungsmittelkontrolle auf eine Platte (falls erforderlich);
  - 20 Eier als Positivkontrolle auf eine Platte;
  - 4 Eier in Verdünnungswasser als Kontrolle innerhalb einer Platte auf jede der obigen Platten;
  - 24 Eier in Verdünnungswasser als Negativkontrolle auf eine Platte.

### **Beobachtungen**

28. An jedem geprüften Embryo werden folgende apikale Beobachtungen durchgeführt: Koagulation der Embryonen, fehlende Somitenbildung, fehlende Abtrennung des Schwanzes und fehlender Herzschlag (Tabelle 1). Anhand dieser Beobachtungen wird die Letalität bestimmt: Ein positiver Befund bei einer dieser Beobachtungen bedeutet, dass der Zebrafärbungsembryo tot ist. Darüber hinaus wird das Schlüpfen in den Behandlungs- und Kontrollgruppen nach 48 Stunden täglich protokolliert. Die Beobachtungen werden alle 24 Stunden bis zum Ende der Prüfung protokolliert.

**Tabelle 1.** Apikale Beobachtungen der akuten Toxizität in Zebrafärbungsembryonen 24 bis 96 Stunden nach der Befruchtung

	Expositionszeiten			
	24 Std.	48 Std.	72 Std.	96 Std.
Koagulierte Embryonen	+	+	+	+
Fehlende Somitenbildung	+	+	+	+
Fehlende Abtrennung des Schwanzes	+	+	+	+
Fehlender Herzschlag		+	+	+

29. *Koagulation des Embryos*: Die koagulierten Embryonen sind milchig weiß und erscheinen unter dem Mikroskop dunkel (siehe Abbildung 1 in Anlage 5). Die Anzahl der koagulierten Embryonen wird nach 24, 48, 72 und 96 Stunden bestimmt.
30. *Fehlende Somitenbildung*: Bei  $26 \pm 1$  °C haben sich bei einem sich normal entwickelnden Zebrabärblingsembryo nach 24 Stunden ungefähr 20 Somiten (siehe Abbildung 2 in Anlage 5) entwickelt. Ein normal entwickelter Embryo zeigt spontane Bewegungen (Kontraktionen von Seite zu Seite). Spontane Bewegungen deuten auf die Bildung von Somiten hin. Das Fehlen von Somiten wird nach 24, 48, 72 und 96 Stunden protokolliert. Eine fehlende Somitenbildung nach 24 Stunden könnte auf eine allgemeine Entwicklungsverzögerung zurückzuführen sein. Die Somitenbildung sollte sich spätestens nach 48 Stunden zeigen. Ist dies nicht der Fall, werden die Embryonen als tot betrachtet.
31. *Fehlende Abtrennung des Schwanzes*: Bei einem sich normal entwickelnden Zebrabärblingsembryo wird die Abtrennung des Schwanzes (siehe Abbildung 3 in Anlage 5) vom Dotter nach der hinteren Verlängerung des Embryokörpers beobachtet. Die fehlende Abtrennung des Schwanzes wird nach 24, 48, 72 und 96 Stunden protokolliert.
32. *Fehlender Herzschlag*: Bei einem sich normal entwickelnden Zebrabärblingsembryo ist bei  $26 \pm 1$  °C der Herzschlag nach 48 Stunden erkennbar (siehe Abbildung 4 in Anlage 5). Dieser Endpunkt ist besonders sorgfältig zu protokollieren, denn ein unregelmäßiger Herzschlag ist *nicht* als letal zu protokollieren. Darüber hinaus wird ein sichtbarer Herzschlag ohne Zirkulation in der Aorta abdominalis als nicht-letal betrachtet. Zur Protokollierung dieses Endpunkts sollten Embryonen, die keinen Herzschlag zeigen, mindestens eine Minute bei einer mindestens 80-fachen Vergrößerung beobachtet werden. Ein fehlender Herzschlag wird nach 48, 72 und 96 Stunden protokolliert.
33. Die Schlupfraten aller Behandlungs- und Kontrollgruppen sollten nach 48 Stunden protokolliert und berichtet werden. Das Schlüpfen ist zwar kein für die Berechnung des LC<sub>50</sub>-Werts verwendeter Endpunkt, gewährleistet aber die Exposition des Embryos ohne die potenzielle Barriere in Form des Chorions und kann daher die Interpretation der Daten vereinfachen.
34. Ausführliche Beschreibungen der normalen Entwicklung (35) und Beispiele einer anomalen Entwicklung von Zebrabärblingsembryonen sind den Anlagen 3 und 5 zu entnehmen.

## Analytische Messungen

35. Am Anfang und am Ende der Prüfung werden pH-Wert, Gesamthärte und Leitfähigkeit in der bzw. den Kontrollen und in der höchsten Prüfchemikalienkonzentration gemessen. Bei semistatischen Erneuerungssystemen sollte der pH-Wert vor und nach der Erneuerung des Wassers gemessen werden. Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff wird am Ende der Prüfung in den Negativkontrollen und in der höchsten Prüfkonzentration mit lebensfähigen Embryonen gemessen, wobei dies mit den Validitätskriterien der Prüfung im Einklang stehen sollte (siehe Nummer 8 Buchstabe f). Wird befürchtet, dass die Temperatur innerhalb der 24-Mulden-Platten schwanken könnte, so wird die Temperatur in drei randomisiert ausgewählten Gefäßen gemessen. Die Temperatur sollte während der Prüfung vorzugsweise kontinuierlich oder mindestens täglich protokolliert werden.
36. In einem statischen System sollte die Konzentration der Prüfchemikalie mindestens bei den höchsten und niedrigsten Prüfkonzentrationen, jedoch vorzugsweise in allen Behandlungsgruppen am Anfang und Ende der Prüfung gemessen werden. Für semistatische (Erneuerungs-)Tests, bei denen davon ausgegangen wird, dass die Konzentration der Prüfchemikalie innerhalb von  $\pm 20\%$  der Nennwerte bleibt, wird empfohlen, mindestens die höchsten und niedrigsten Prüfkonzentrationen nach der frischen Zubereitung und unmittelbar vor der Erneuerung zu analysieren. Bei Prüfungen, bei denen nicht davon ausgegangen wird, dass die die Konzentration der Prüfchemikalie innerhalb von  $\pm 20\%$  der Nennwerte bleibt, müssen alle Prüfkonzentrationen nach der frischen Zubereitung und unmittelbar vor der Erneuerung analysiert werden. Reicht das Volumen für die Analyse nicht aus, kann das Mischen der Prüflösungen oder die Verwendung von Surrogatkammern aus dem gleichem Material und mit dem gleichen Volumen/Oberflächen-Verhältnis wie 24-Mulden-Platten hilfreich sein. Die Ergebnisse sollten unbedingt auf gemessenen Konzentrationen basieren. Wenn die Konzentrationen nicht innerhalb von 80 bis 120 % der nominalen Konzentration bleiben, sollten die Konzentrationen, die eine Wirkung hervorrufen, relativ zum geometrischen Mittel der gemessenen Konzentrationen ausgedrückt werden; nähere Informationen sind Kapitel 5 des *OECD Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures* zu entnehmen (28).

## LIMIT-TEST

37. Nach den in dieser Prüfmethode beschriebenen Verfahren kann ein Limit-Test bei einer Konzentration der Prüfchemikalie von 100 mg/l oder an der Grenze ihrer Löslichkeit im Prüfmedium (je nachdem, welcher Wert niedriger ist) durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass die  $LC_{50}$  über dieser Konzentration liegt. Der Limit-Test sollte an jeweils 20 Embryonen in der Behandlungsgruppe, in der Positivkontrolle und gegebenenfalls in der Lösungsmittelkontrolle sowie an 24 Embryonen in der Negativkontrolle durchgeführt werden. Wenn der Letalitätsprozentsatz bei der geprüften Konzentration die Mortalität in der

Negativkontrolle (oder Lösungsmittelkontrolle) um 10 % überschreitet, sollte eine vollständige Prüfung durchgeführt werden. Alle beobachteten Wirkungen sollten protokolliert werden. Übersteigt die Mortalität in der Negativkontrolle (oder Lösungsmittelkontrolle) 10 %, so ist die Prüfung ungültig und sollte wiederholt werden.

## DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

### Auswertung der Ergebnisse

38. Bei dieser Prüfung werden die einzelnen Mulden für die statistische Analyse als unabhängige Replikate betrachtet. Die Prozentsätze der Embryonen, bei denen mindestens eine der apikalen Beobachtungen nach 48 und/oder 96 Stunden positiv ist, werden gegen die Prüfkonzentrationen aufgetragen. Zur Berechnung der Steigungen der Kurve, der LC<sub>50</sub>-Werte und der Konfidenzgrenzen (95 %) sollten geeignete statistische Methoden angewandt (38) und das *OECD Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data* konsultiert werden (39).

### Prüfbericht

39. 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

#### *Prüforganismen:*

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

#### *Prüfbedingungen:*

- angewandtes Prüfverfahren (z. B. semistatisches Erneuerungssystem);
- Fotoperiode;
- Versuchsplan (z. B. Anzahl der Prüfkammern, Arten der Kontrollen);
- Qualität des für die Haltung der Fische verwendeten Wassers (z. B. pH-Wert, Härte, Temperatur, Leitfähigkeit, gelöster Sauerstoff);
- Konzentration an gelöstem Sauerstoff, pH-Wert, Gesamthärte, Temperatur und Leitfähigkeit der Prüflösungen am Anfang und nach 96 Stunden;
- Methode zur Herstellung von Stammansätzen und Prüflösungen sowie Häufigkeit der Erneuerung;
- Begründung der Verwendung des Lösungsmittels und der Auswahl des Lösungsmittels, falls nicht Wasser;
- die nominalen Prüfkonzentrationen und die Ergebnisse aller Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfchemikalie in den Prüfgefäßen; die Wiederfindungsrate der Methode und die Bestimmungsgrenze sollten ebenfalls protokolliert werden;
- Nachweis, dass die Kontrollen die Validitätskriterien für die Gesamtüberlebensrate erfüllen;
- Befruchtungsrate der Eier;
- Schlupfrate in den Behandlungs- und Kontrollgruppen.

*Ergebnisse:*

- höchste Konzentration, die während der Dauer der Prüfung keine Mortalität verursacht;
- Mindestkonzentration, die während der Dauer der Prüfung 100 % Mortalität verursacht;
- kumulative Mortalität bei jeder Konzentration zu den empfohlenen Beobachtungszeitpunkten;
- LC<sub>50</sub>-Werte nach 96 Stunden (und optional nach 48 Stunden) für Mortalität mit 95 %-Konfidenzgrenze, falls möglich;
- Darstellung der Konzentrations-Mortalitäts-Kurve am Ende der Prüfung;
- Mortalität in den Kontrollgruppen (Negativkontrollen, Kontrollen innerhalb einer Platte sowie Positivkontrolle und gegebenenfalls verwendete Lösungsmittelkontrollen);
- Angaben zum jeweiligen Ergebnis der vier apikalen Beobachtungen;
- Vorkommen und Beschreibung morphologischer und physiologischer Abnormitäten, soweit zutreffend (siehe Beispiele in Abbildung 2 in Anlage 5);
- Vorfälle während der Prüfung, die die Ergebnisse beeinflusst haben könnten;
- statistische Analyse und Auswertung der Daten (Probit-Analyse, logistische

Regression und geometrisches Mittel für  $LC_{50}$ );

- Steigung und Konfidenzgrenzen der Regression der (transformierten) Konzentrations-Wirkungs-Kurve.

*Eine eventuelle Abweichung von der Prüfmethode und entsprechende Erläuterungen.*

*Diskussion und Interpretation der Ergebnisse.*

## LITERATURHINWEISE

- (1) OECD (2011) *Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157*, OECD, Paris.
- (2) OECD (2012) *Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179*, OECD, Paris.
- (3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. und Seitz, N. (2005) *Towards an alternative for the acute fish LC<sub>50</sub> test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update*. ALTEX 22: 87-102.
- (4) ISO (2007) Internationale Norm, Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.
- (5) Nagel, R. (2002) *DarT: The embryo test with the zebrafish (Danio rerio) - a general model in ecotoxicology and toxicology*. ALTEX 19: 38-48.
- (6) Schulte, C. und Nagel, R. (1994) *Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, Brachydanio rerio as alternative to the acute fish test - preliminary results*. ATLA 22, 12-19.
- (7) Bachmann, J. (2002) *Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (Danio rerio)*. Doktorarbeit, Technische Universität Dresden, Deutschland.
- (8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. und Nagel, R. (1995) *Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (Brachydanio rerio), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test*. Chemosphere 30/11: 2087-2102.
- (9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). *Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis*. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

- (10) Kammann, U., Vobach, M. und Wosniok, W. (2006) *Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 51: 97-102.
- (11) Groth, G., Kronauer, K. und Freundt, K.J. (1994) *Effects of N,N-dimethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos*. *Toxicol. In Vitro* 8: 401-406.
- (12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. und Freundt, K.J. (1993) *Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with N-methylamine, N,N-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, N-methylaniline, N,N-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50: 878-882.
- (13) Nguyen, L.T. und Janssen, C.R. (2001) *Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (Clarias gariepinus) and zebra fish (Danio rerio)*. *Environ. Toxicol.* 16: 566-571.
- (14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. und Wu, R.S.S. (2000) *Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 3024-3031.
- (15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. und Carr G. J. (2013). *Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 1768-1783.
- (16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009) *Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (Danio rerio) a potential alternative for the fish acute toxicity test?* *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*: 149 (2), 196-209
- (17) Kapitel C.4: Biologische Abbaubarkeit — Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit.
- (18) Kapitel C.29: Leichte biologische Abbaubarkeit, Bestimmung von CO<sub>2</sub> in geschlossenen Flaschen (Head-Space-Test).
- (19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011) *Zebrafish (Danio rerio) embryos as a model for testing proteratogens*. *Toxicology* 281: 25-36.
- (20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012) *Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (Danio rerio) embryos*. *Reprod. Toxicol.* 33: 133-141.
- (21) Incardona, J.P., Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011) *Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the*



- aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.*
- (22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011) *Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.*
- (23) Kapitel C.48: Kurzzeit-Reproduktionstest an Fischen. Siehe Anlage 4a.
- (24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009) *Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (Danio rerio). Toxicol. in Vitro 23: 1436-1442.*
- (25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001) *Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097-4102.*
- (26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008) *How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.*
- (27) ISO (1996) Internationale Norm. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] ISO 7346-3: Durchflussverfahren. Verfügbar unter: [<http://www.iso.org>].
- (28) OECD (2000) *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23*, OECD, Paris.
- (29) Laale, H.W. (1977) *The biology and use of zebrafish, Brachydanio rerio, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.*
- (30) Westerfield, M. (2007) *The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio). 5<sup>th</sup> edition*. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.
- (31) Canadian Council on Animal Care (2005) *Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing*, ISBN: 0-919087-43-4 <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>

- (32) Europäische Kommission (2007) Empfehlung 2007/526/EG der Kommission vom 18. Juni 2007 mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2007) 2525) [<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:DE:PDF>]
- (33) Europäische Union (2010) Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Amtsblatt der Europäischen Union, L 276 vom 20.10.2010, S. 33-79 <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:DE:PDF>
- (34) Nagel, R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebraquarienfisch (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). *J. Appl. Ichthyol.* 2: 173-181.
- (35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. und Schilling, T.F. (1995) *Stages of embryonic development of the zebrafish.* *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
- (36) Kapitel C.2: Daphnia sp.-Test auf akute Schwimmunfähigkeit.
- (37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009) *Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test.* *Environ. Toxicol. Chem.* 28: 1970-1978
- (38) ISO (2006) Internationale Norm. Wasserbeschaffenheit - Anleitung für die statistische Auswertung von Ökotoxizitätsdaten. ISO TS 20281. Verfügbar unter: [<http://www.iso.org>].
- (39) OECD (2006) *Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application.* Series on Testing and Assessment, No. 54. OECD, Paris.
- (40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. *Detailed review paper „Fish embryo toxicity assays“.* UBA-Bericht (Vertragsnummer 20385422), Deutsches Umweltbundesamt, Berlin. 298 ff.

## Anlage 1

### DEFINITIONEN

**Apikaler Endpunkt:** Auslösen einer Wirkung auf Populationsebene.

**Blastula:** Zellbildung um den animalen Pol, die einen bestimmten Teil des Dotters abdeckt.

**Chemikalie:** Stoff oder Gemisch.

**Durchflussprüfung:** Prüfung mit einem kontinuierlichen Fluss der Prüflösungen durch das Prüfsystem während des Expositionszeitraums.

**Epibolie:** eine massive Proliferation von überwiegend epidermalen Zellen in der Gastrulationsphase des Embryos und deren Bewegung von der dorsalen zur ventralen Seite, wodurch die Schichten entodermaler Zellen in einem invaginationsähnlichen Prozess internalisiert werden und der Dotter in den Embryo integriert wird.

**Haltungswasser:** Wasser, in dem die adulten Fische gehalten werden.

**Kontrolle innerhalb einer Platte:** interne Kontrolle bestehend aus vier mit Verdünnungswasser befüllten Mulden pro 24-Mulden-Platte, um eine potenzielle Kontaminierung der Platten durch den Hersteller oder durch den Wissenschaftler während des Verfahrens sowie etwaige Wirkungen der Platte, die das Testergebnis möglicherweise beeinflussen (z. B. Temperaturgefälle), festzustellen.

**IUPAC:** International Union of Pure and Applied Chemistry - Internationale Union für reine und angewandte Chemie.

**Mediane letale Konzentration (LC<sub>50</sub>):** Konzentration einer Prüfchemikalie, die schätzungsweise auf 50 % der Prüforganismen während der Prüfdauer letal wirkt.

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

**Semistatische Erneuerungsprüfung:** Prüfung mit regelmäßiger Erneuerung der Prüflösungen nach festgelegten Zeiträumen (z. B. alle 24 Stunden).

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

**Somit:** In einem sich entwickelnden Wirbeltierembryo sind Somiten lateral zum Neuralrohr verteilte Mesodermmassen, die schließlich Dermis (Dermatom), Skelettmuskel

(Myotom) und Wirbelsäule (Sklerotom) bilden.

**Statische Prüfung:** Prüfung, bei der die Prüflösungen während der Prüfdauer unverändert bleiben.

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

## Anlage 2

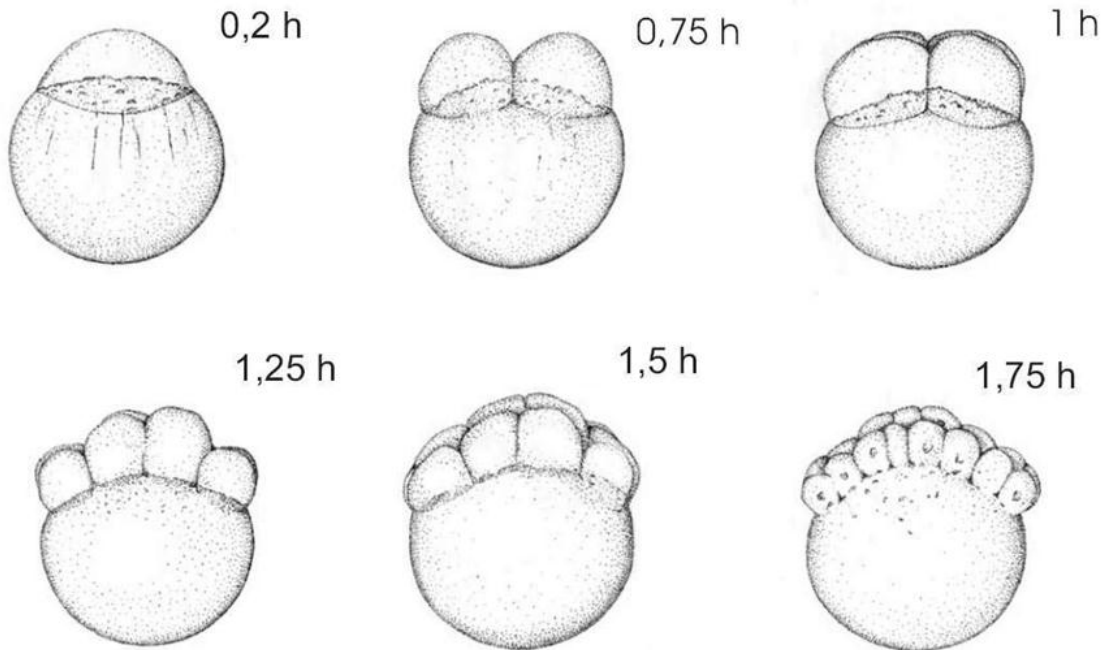
### **HALTUNG UND ZUCHT VON ZEBRABÄRBLINGEN UND TYPISCHE BEDINGUNGEN FÜR PRÜFUNGEN AUF AKUTE TOXIZITÄT AN EMBRYONEN VON ZEBRABÄRBLINGEN**

<b>Zebrabärbling (<i>Danio rerio</i>)</b>		
Herkunft der Art	Indien, Myanmar, Malakka, Sumatra	
Sexualdimorphismus	Weibchen: vorgewölbter Bauch beim Tragen von Eiern Männchen: schlanker, orangefarben mit blauen Längsstreifen (insbesondere an der Afterflosse sichtbar)	
Fütterungsregime	Trockenflocken (max. 3 % des Fischgewichts pro Tag) 3 bis 5-mal täglich; zusätzlich Salinenkrebse ( <i>Artemia</i> ), Nauplien und/oder kleine Daphnien in geeigneter Größe aus unkontaminierter Quelle. Es sollte möglichst Lebendfutter verwendet werden, da es für eine bessere Ausgestaltung des Lebensumfelds sorgt. Um eine optimale Wasserqualität sicherzustellen, sollten überschüssiges Futter und Exkrememente ungefähr eine Stunde nach der Fütterung entfernt werden.	
Ungefähres Gewicht der adulten Fische	Weibchen: $0,65 \pm 0,13$ g Männchen: $0,5 \pm 0,1$ g	
Haltung der Eltermfische	Beleuchtung	Leuchtstofflampen (breites Spektrum); $10-20 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , 540-1080 lux oder 50-100 ft-c (Laborqualität); Fotoperiode von 12 bis 16 Stunden
	Wassertemperatur	$26 \pm 1$ °C
	Wasserqualität	$\text{O}_2 \geq 80$ % Sättigung, Härte: z. B. $\sim 30-300$ mg/l $\text{CaCO}_3$ , $\text{NO}_3^-$ : $\leq 48$ mg/l, $\text{NH}_4^+$ und $\text{NO}_2^-$ : $< 0,001$ mg/l, Restchlor $< 10$ $\mu\text{g}/\text{l}$ , Gesamtgehalt an organischem Chlor $< 25$ ng/l, pH = 6,5-8,5
	Weitere Wasserqualitätskriterien	Partikel $< 20$ mg/l, Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff $< 2$ mg/l, Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden $< 50$ ng/l, Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen $< 50$ ng/l
	Beckengröße für die Haltung	z. B. 180 l, 1 Fisch/l
	Wasserreinigung	Permanent (mit Aktivkohlefilter); andere Möglichkeiten sind Kombinationen mit semistatischem Erneuerungssystem oder Durchflusssystem mit kontinuierlichem Wasseraustausch
Für die Zucht empfohlenes Verhältnis Männchen/Weibchen	2:1 (oder Massenlaichen)	

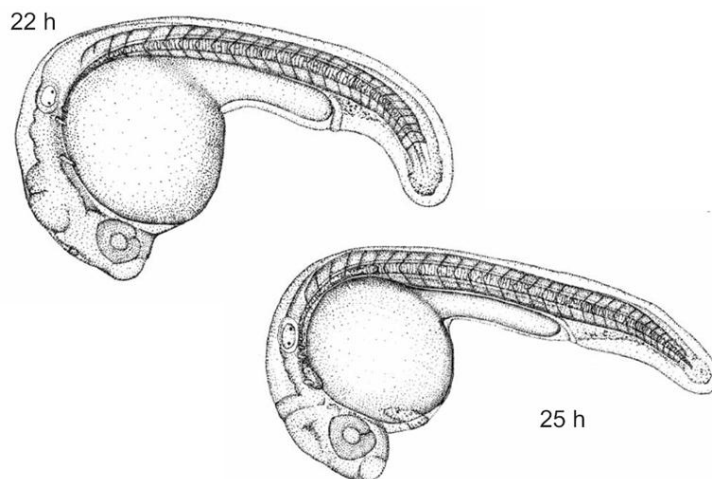
Laichbecken	z. B. 4 l-Becken mit Stahlgitterboden und künstlichen Pflanzen als Laichstimulans; externe Wärmematten oder Massenlaichen in den Haltungsbecken
Struktur und Aussehen der Eier	Stabiles Chorion (d. h. hochtransparent, nicht klebrig, Durchmesser ~ 0,8-1,5 mm)
Laichrate	Ein geschlechtsreifes Weibchen legt mindestens 50-80 Eier pro Tag. Je nach Stamm können die Laichraten erheblich höher sein. Die Befruchtungsrate sollte $\geq 70\%$ betragen. Bei Fischen, die zum ersten Mal laichen, können die Befruchtungsraten bei den ersten Laichen geringer sein.
Prüfungstyp	Statisch, semistatische Erneuerung, Durchfluss, $26 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 24 Stunden konditionierte Prüfkammern (z. B. 24-Mulden-Platten, 2,5-5 ml pro Mulde)

### Anlage 3

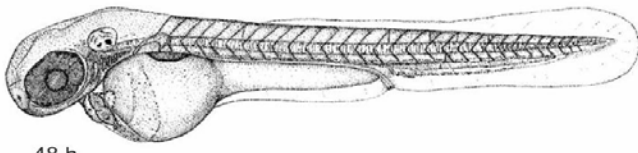
#### NORMALE ENTWICKLUNG VON ZEBRABÄRBLINGEN BEI 26 °C



**Abb. 1:** Ausgewählte Stufen der frühen Entwicklung von Zebrafärblingen (*Danio rerio*): 0,2-1,75 Stunden nach der Befruchtung (aus Kimmel et al., 1995 (35)). Anhand des zeitlichen Ablaufs einer normalen Entwicklung kann die Befruchtung und Lebensfähigkeit der Eier beurteilt werden (siehe Nummer 26: Auswahl der befruchteten Eier).

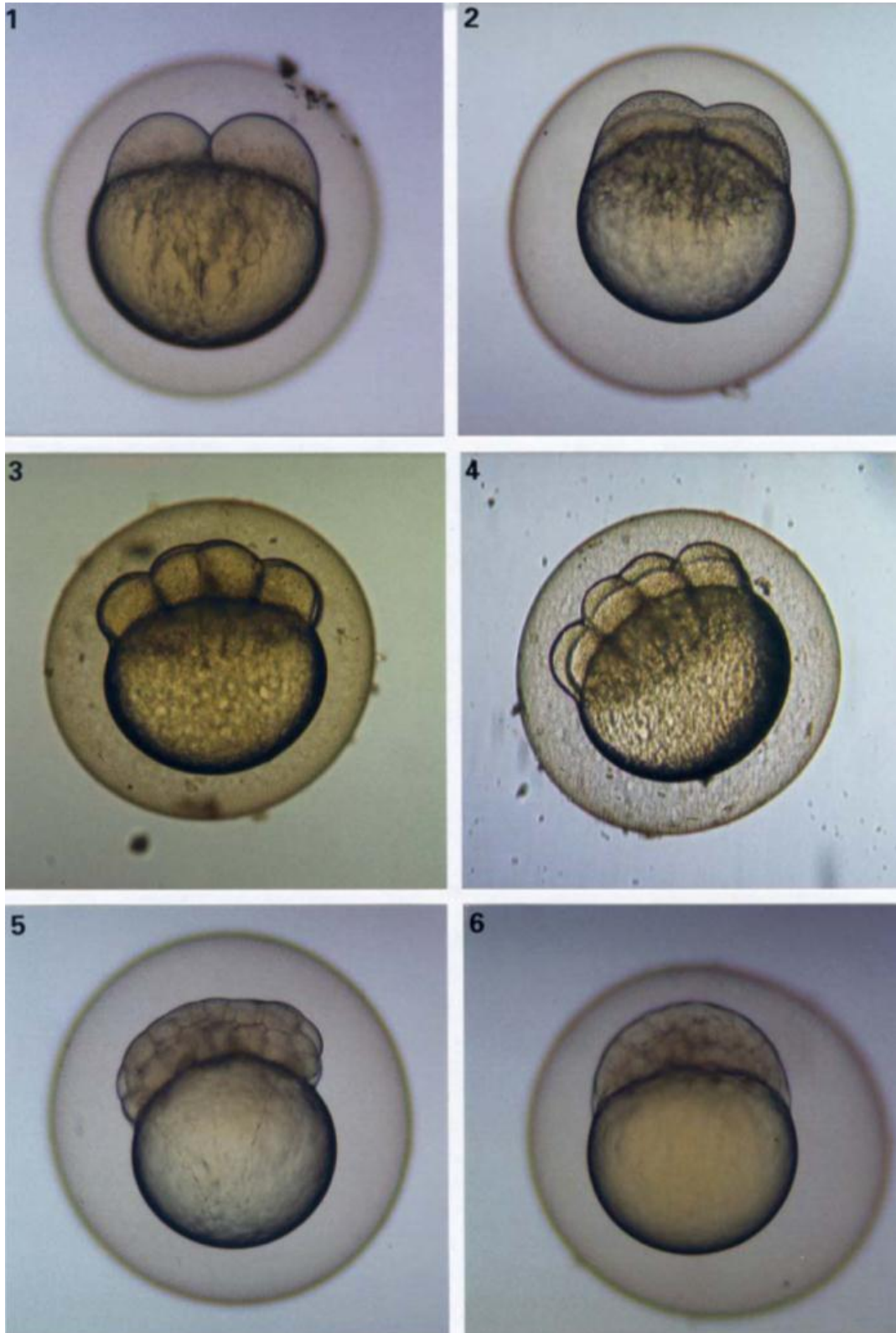


**Abb. 2:** Ausgewählte Stufen der späten Entwicklung von Zebrafärblingen (*Danio rerio*) (entchorionierter Embryo zur besseren Veranschaulichung): 22-48 Stunden nach der Befruchtung (aus Kimmel et al., 1995 (35)).



48 h

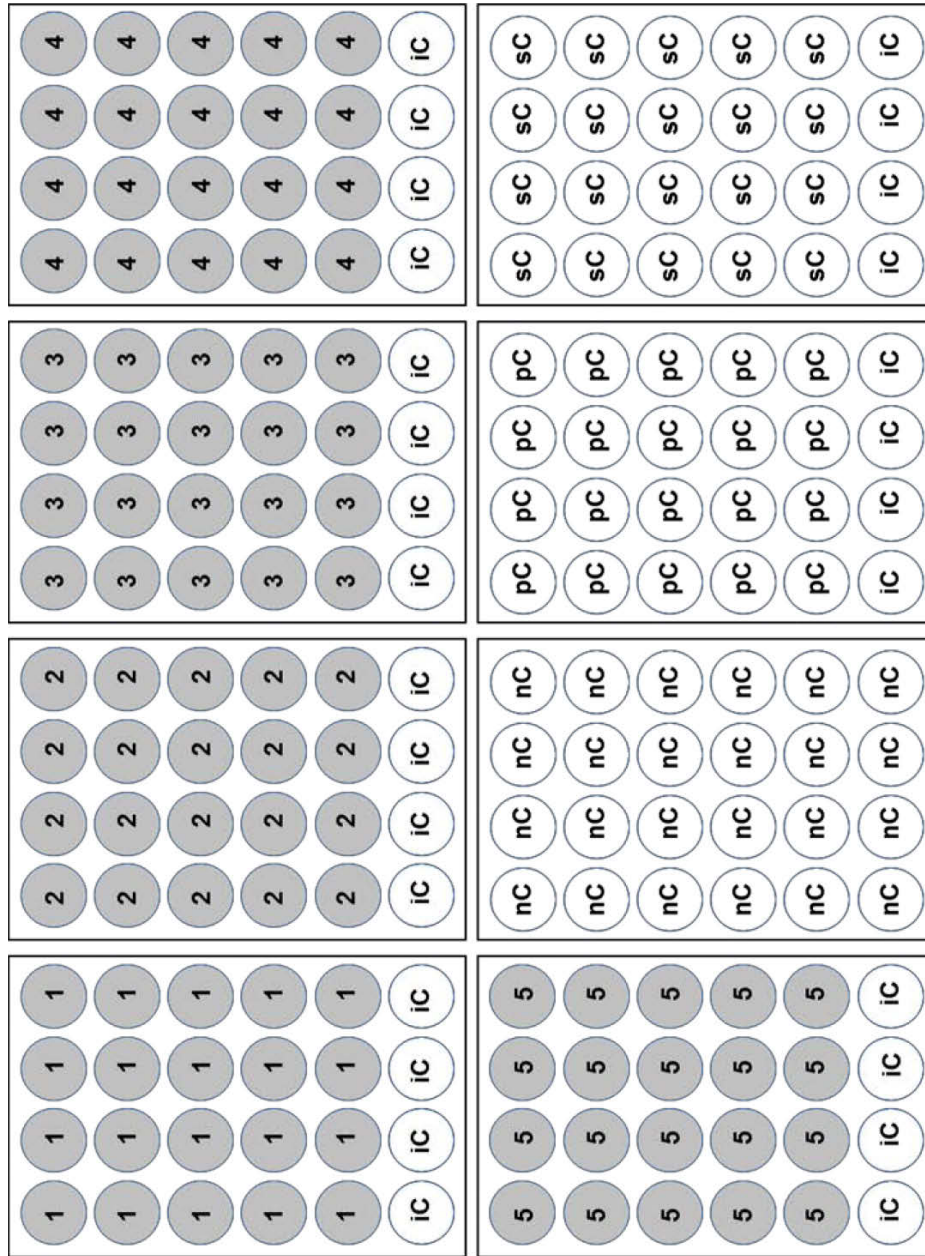




**Abb. 3: Normale Entwicklung von Zebrafärbhingsembryonen (*Danio rerio*):** (1) 0,75 Stunden, 2-Zellen-Stadium; (2) 1 Stunde, 4-Zellen-Stadium; (3) 1,2 Stunden, 8-Zellen-Stadium; (4) 1,5 Stunden, 16-Zellen-Stadium; (5) 4,7 Stunden, beginnende Epibolie; (6) 5,3 Stunden, ca. 50 % Epibolie (aus Braunbeck & Lammer 2006 (40)).

## Anlage 4

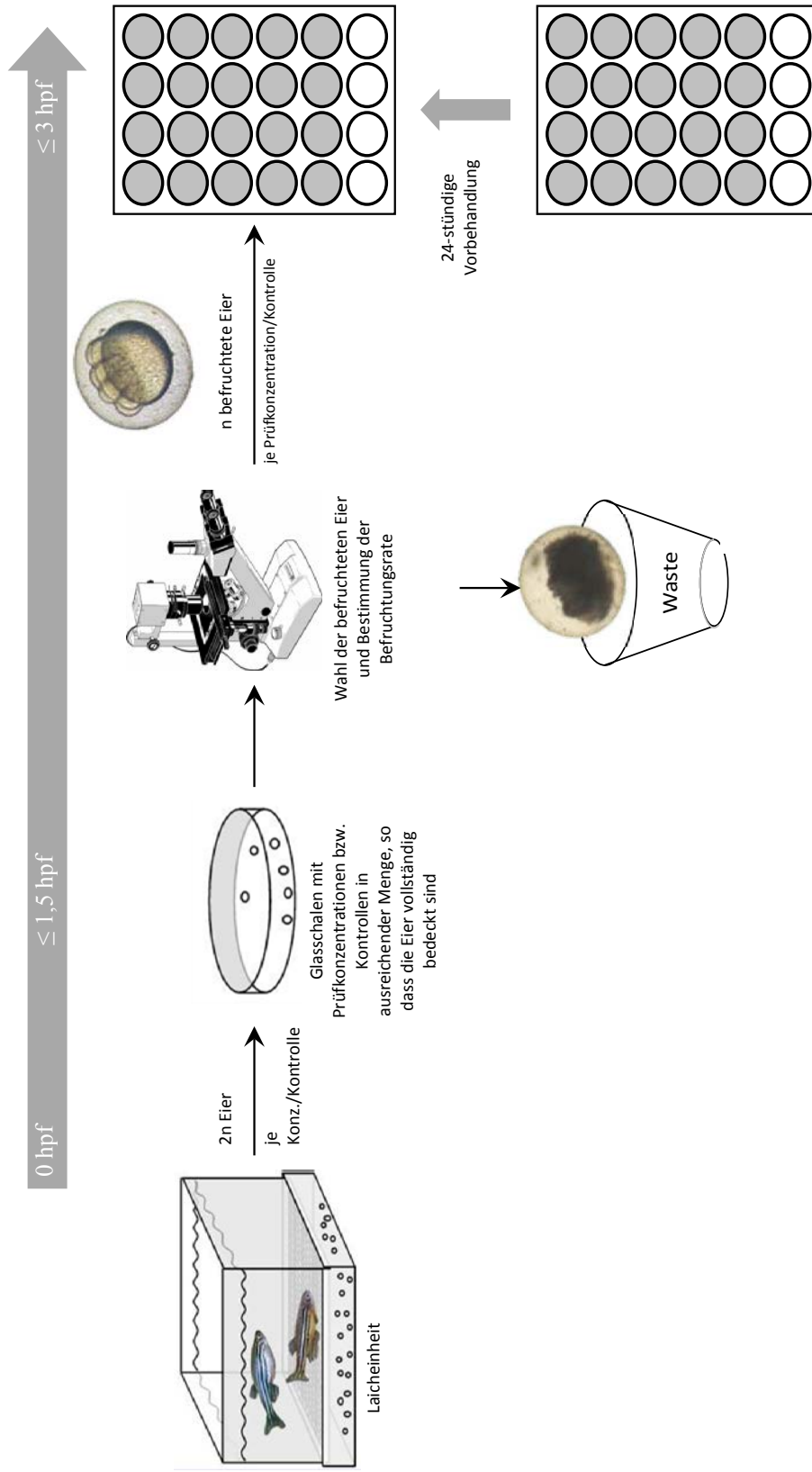
**Abb. 1:** Einteilung von 24-Mulden-Platten



1-5 = fünf Prüfkonzentrationen/Chemikalie; nC = Negativkontrolle (Verdünnungswasser); iC = Kontrolle innerhalb einer Platte

(Verdünnungswasser); pC = Positivkontrolle (3,4-DCA 4mg/l); sC = Lösungsmittelkontrolle

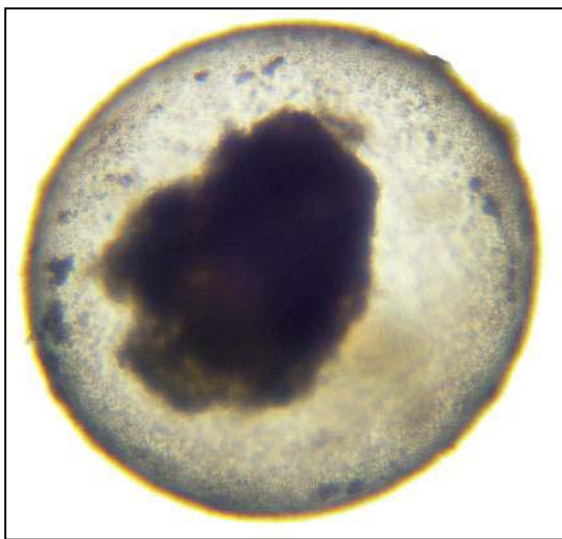
Abb. 2: **Schema der Toxizitätsprüfung an Embryonen von Zebrafish (von links nach rechts):** Produktion der Eier, Entnehmen der Eier, Präexposition unmittelbar nach der Befruchtung in Glasgefäßen, Auswahl der befruchteten Eier unter einem Invers- oder Stereomikroskop und Verteilung der befruchteten Eier auf die 24-Mulden-Platten mit den Prüfkonzentrationen bzw. Kontrollen, n = Anzahl der erforderlichen Eier pro Prüfkonzentration/Kontrolle (hier 20), hpf = Stunden nach Befruchtung.



## Anlage 5

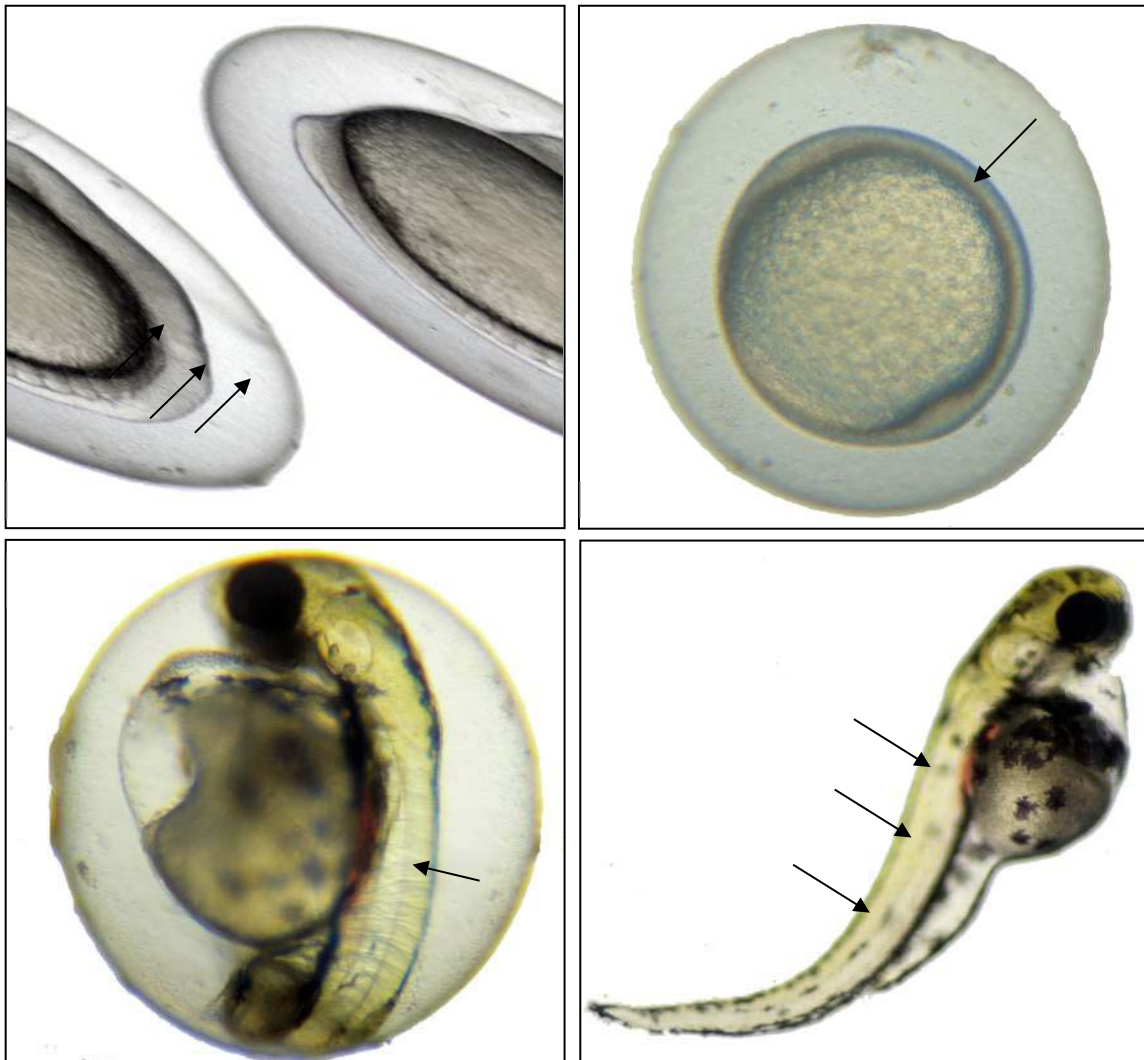
### ATLAS DER LETALEN ENDPUNKTE FÜR DIE PRÜFUNG AUF AKUTE TOXIZITÄT AN EMBRYONEN VON ZEBRABÄRBLINGEN

Die folgenden apikalen Endpunkte deuten auf akute Toxizität und somit den Tod der Embryonen hin: *Koagulation des Embryos, fehlende Abtrennung des Schwanzes, fehlende Somitenbildung und fehlender Herzschlag*. Die folgenden mikroskopischen Aufnahmen wurden zur Veranschaulichung dieser Endpunkte ausgewählt.



**Abb. 1: Koagulation des Embryos:** Unter Hellfeldbeleuchtung weisen koagulierte Zebrafärbärlingsembryonen verschiedene nichttransparente Einschlüsse auf.

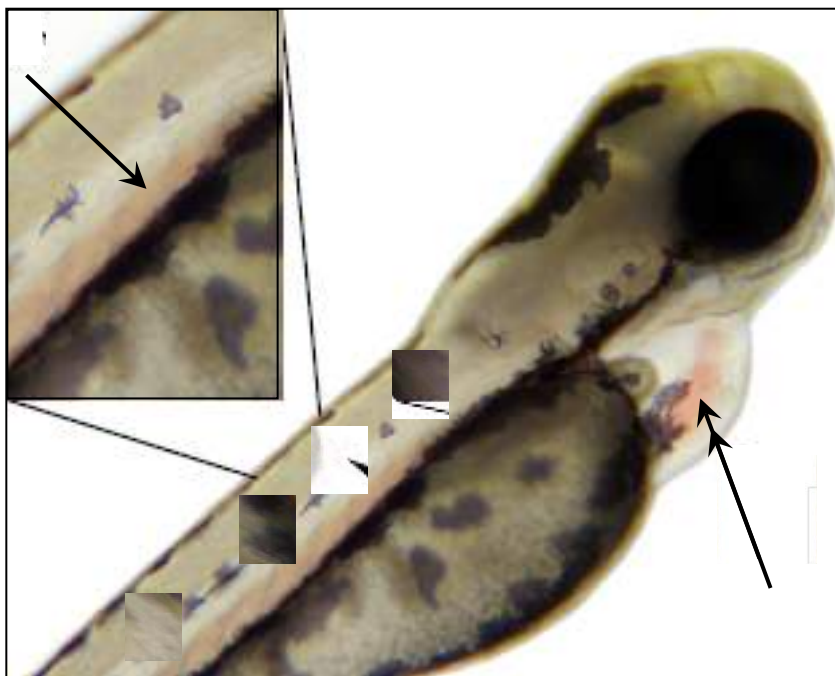




**Abb. 2: Fehlende Somitenbildung:** Obwohl es um ca. 10 Stunden entwicklungsverzögert ist, zeigt der 24 Stunden alte Zebrafärbalingsembryo in a) gut entwickelte Somiten (→), während der Embryo in b) keine Anzeichen einer Somitenbildung aufweist (→). Obwohl es ein ausgeprägtes Dottersacködem aufweist (\*), zeigt der 48 Stunden alte Zebrafärbalingsembryo in c) eine deutliche Somitenbildung (→), während der 96 Stunden alte Zebrafärbalingsembryo in d) keine Anzeichen einer Somitenbildung zeigt (→). Ferner sind die Wirbelsäulenverkrümmung (Skoliose) und das perikardiale Ödem (\*) in dem Embryo in d) zu beachten.



**Abb. 3: Fehlende Abtrennung der Schwanzknospe** in der Seitenansicht (a: →; 96 Stunden alter Zebrafärblingsembryo). Zu beachten ist auch die fehlende Augenknospe (\*).



**Abb. 4: Fehlender Herzschlag** ist definitionsgemäß in einer mikroskopischen Aufnahme schwer darzustellen. Ein fehlender Herzschlag wird durch Nichtzucken des Herzens angezeigt (Doppelpfeil). Die Unbeweglichkeit der Blutzellen, z. B. in der Aorta abdominalis (→ im Insert), ist kein Hinweis auf einen fehlenden Herzschlag. Zu beachten ist auch die fehlende Somitenbildung bei diesem Embryo (\*).

Muskelgewebe erscheinen homogen statt segmental). Die Beobachtungszeit zur Protokollierung eines fehlenden Herzschlags sollte mindestens eine Minute bei einer mindestens 80-fachen Vergrößerung betragen.

## **C.50 Sedimentfreier *Myriophyllum spicatum*-Toxizitätstest**

### **EINLEITUNG**

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 238 (2014). Sie dient zur Beurteilung der Toxizität von Chemikalien bei *Myriophyllum spicatum*, einer submersen zweikeimblättrigen Wasserpflanzenart, die der Familie der Tausendblattgewächse angehört. Sie basiert auf einer vorhandenen Prüfmethode nach ASTM (1), die in ein sedimentfreies Testsystem abgeändert wurde (2), um die intrinsische Ökotoxizität von Prüfchemikalien zu schätzen (unabhängig vom Verhalten der Prüfchemikalie in Bezug auf die Verteilung zwischen Wasser und Sediment). Ein sedimentfreies Testsystem weist eine geringe analytische Komplexität auf (nur in der Wasserphase). Die Ergebnisse können parallel zu denjenigen aus dem *Lemna sp.*-Test (3) analysiert oder hiermit verglichen werden; ferner können dank der erforderlichen sterilen Bedingungen die Wirkungen von Mikroorganismen und Algen (Aufnahme/Abbau der Chemikalie usw.) möglichst gering gehalten werden. Diese Prüfung stellt keinen Ersatz für andere aquatische Toxizitätstests dar, sondern sollte als Ergänzung solcher Tests verwendet werden, sodass eine umfassendere Gefahren- und Risikobewertung im Hinblick auf Wasserpflanzen möglich ist. Die Prüfmethode wurde in einem Ringtest validiert (4).
2. Die Durchführung von Tests sowohl mit Erneuerung der Testlösung (semistatisch) als auch ohne Erneuerung der Testlösung (statisch) wird detailliert beschrieben. Abhängig von den Zielsetzungen der Tests sowie von rechtlichen Anforderungen wird der Einsatz von semistatischen Methoden empfohlen, z. B. für Stoffe, die durch Verflüchtigung, Adsorption, Photoabbau, Hydrolyse, Ausfällung oder biologischen Abbau rasch verloren gehen. Weitere Informationen sind Quelle (5) zu entnehmen. Diese Methode gilt für Stoffe, bei denen die Prüfmethode validiert wurde (siehe Ringtest-Bericht (4)), oder für Formulierungen oder bekannte Gemische; wird ein Gemisch geprüft, sollten dessen Komponenten soweit wie möglich identifiziert und quantifiziert werden. Die sedimentfreie *Myriophyllum spicatum*-Prüfmethode ergänzt den *Myriophyllum spicatum*-Toxizitätstest im Wassersediment (6). Bevor die Prüfmethode für die Prüfung eines Gemischs zu gesetzgeberischen Zwecken eingesetzt wird, sollte geprüft werden, ob, und falls ja, warum, sie für diesen Zweck geeignete Ergebnisse liefert. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs von Rechts wegen vorgeschrieben ist.

### **PRINZIP DER PRÜFMETHODE**

3. Kontinuierlich wachsende Pflanzenkulturen von *Myriophyllum spicatum* (nur in modifiziertem Andrews-Medium, siehe Anlage 2) lässt man als Monokulturen in verschiedenen Konzentrationen der Prüfchemikalie über einen Zeitraum von 14 Tagen in



einem sedimentfreien Testsystem wachsen. Ziel der Prüfung ist es, die durch die Chemikalie bedingten Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum während dieses Zeitraums basierend auf der Auswertung ausgewählter Messvariablen zu quantifizieren. Die Messvariablen sind das Wachstum der Sprosslänge, der Seitenäste und der Wurzeln, die Entwicklung der Frisch- und Trockenmasse und die Zunahme der Wirteln. Darüber hinaus werden markante qualitative Veränderungen der Testorganismen berücksichtigt, wie z. B. Deformation oder Chlorose oder Nekrose, was sich als Gelbfärbung oder weißbraune Verfärbung zeigt. Um die durch die Chemikalie bedingten Auswirkungen zu quantifizieren, wird das Wachstum in den Testlösungen mit dem Wachstum der Kontrollpflanzen verglichen. Ferner wird die Konzentration, die eine festgelegte Wachstumshemmung von x % hervorruft, bestimmt und als  $EC_x$  ausgedrückt; „x“ kann ein beliebiger Wert je nach regulatorischen Anforderungen sein, z. B.  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ ,  $EC_{50}$ . Es ist zu beachten, dass Schätzungen der  $EC_{10}$ - und  $EC_{20}$ -Werte nur in Tests zuverlässig und angemessen sind, bei denen die für die Kontrollpflanzen bestimmten Variationskoeffizienten unter dem zu schätzenden Wirkungsniveau liegen, d. h. die Variationskoeffizienten sollten für die zuverlässige Schätzung eines  $EC_{20}$ -Werts  $< 20\%$  sein.

4. Sowohl die durchschnittliche Wachstumsrate (geschätzt aus Bewertungen der Hauptsprosslänge und drei weiteren Messvariablen) als auch der Zellertrag (geschätzt aus der Zunahme der Hauptsprosslänge und drei weiteren Messvariablen) der unbehandelten und behandelten Pflanzen sollten bestimmt werden. Anhand der spezifischen Wachstumsrate ( $r$ ) und des Zellertrags ( $y$ ) werden anschließend  $E_r C_x$  (z. B.  $E_r C_{10}$ ,  $E_r C_{20}$ ,  $E_r C_{50}$ ) bzw.  $E_y C_x$  (z. B.  $E_y C_{10}$ ,  $E_y C_{20}$ ,  $E_y C_{50}$ ) bestimmt.
5. Außerdem können die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC) und die höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete Wirkung (NOEC) statistisch bestimmt werden.

## **ANGABEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE**

6. Es sollte eine Analysemethode mit geeigneter Empfindlichkeit für die Quantifizierung der im Prüfmedium enthaltenen Prüfchemikalie verfügbar sein. Zur Festlegung der Testbedingungen hilfreiche Informationen zur Prüfchemikalie sind die Strukturformel, die Reinheit und Verunreinigungen, die Wasserlöslichkeit, die Stabilität in Wasser, die Lichtbeständigkeit, die Säuredissoziationskonstante ( $pK_a$ ), der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ( $K_{ow}$ ), der Dampfdruck und die biologische Abbaubarkeit. Aus der Wasserlöslichkeit und dem Dampfdruck kann die Henry-Konstante berechnet werden, aus der zu entnehmen ist, ob während der Testdauer erhebliche Verluste der Prüfchemikalie zu erwarten sind. Die Konstante gibt Aufschluss darüber, ob bestimmte Maßnahmen zur Überwachung dieser Verluste durchgeführt werden sollten. Wenn zur

Löslichkeit und zur Stabilität der Prüfchemikalie keine zuverlässigen Informationen vorliegen, sollten diese Merkmale unter den Testbedingungen (Nährmedium, Temperatur und Beleuchtung) untersucht werden.

7. Der Einhaltung des pH-Werts des Prüfmediums kommt besondere Bedeutung zu, z. B. beim Testen von Metallen oder hydrolytisch instabilen Stoffen. Weitere Hinweise zur Prüfung von Chemikalien mit physikalisch-chemischen Merkmalen, welche die Durchführung des Tests erschweren, sind dem *OECD Guidance Document (5)* zu entnehmen.

## **VALIDITÄT DES TESTS**

8. Die Testergebnisse sind gültig, wenn die Zeit bis zur Verdopplung der Hauptsprosslänge in der Kontrolle weniger als 14 Tage beträgt. Für die Medien und Testbedingungen gemäß dieser Prüfmethode kann dieses Kriterium mit dem Prüfprotokoll eines statischen oder semistatischen Tests erfüllt werden.
9. Der mittlere Variationskoeffizient für den Zellertrag basierend auf Messungen der Sprossfrischmasse (d. h. von Testbeginn bis Testende) und den zusätzlichen Messvariablen (siehe Nummer 37) bei den Kontrollkulturen beträgt maximal 35 % zwischen Replikaten.
10. Mehr als 50 % der Replikate der Kontrollgruppe werden über den Expositionszeitraum von 14 Tagen steril gehalten, was bedeutet, dass sie sichtbar frei von Verunreinigung durch andere Organismen wie z. B. Algen, Pilze und Bakterien sind (klare Lösung). *Hinweis:* Leitlinien für die Bewertung der Sterilität sind dem Ringtest-Bericht zu entnehmen (4).

## **REFERENZCHEMIKALIE**

11. Um das Prüfverfahren zu testen, können Referenzchemikalien, wie z. B. das im Ringtest (4) verwendete 3,5-Dichlorphenol, geprüft werden; auf der Grundlage der Daten aus dem Ringtest liegen die mittleren  $EC_{50}$ -Werte von 3,5-DCP für die verschiedenen Reaktionsvariablen (siehe Nummern 37-41 dieser Prüfmethode) zwischen 3,2 mg/l und 6,9 mg/l (siehe Ringtest-Bericht bezüglich des Konfidenzintervalls für diese Werte). Die Referenzchemikalien sollten mindestens zweimal jährlich bzw. – wenn die Tests seltener durchgeführt werden – gleichzeitig mit der Bestimmung der Toxizität einer Prüfchemikalie getestet werden.

## **BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE**

## Apparatur

12. Sämtliche Geräte, die mit dem Prüfmedium in Berührung kommen, müssen aus Glas oder einem sonstigen chemisch inerten Material bestehen. Die zur Kultivierung und für die Tests verwendeten Glasgeräte müssen steril sein und von chemischen Verunreinigungen befreit werden, die in das Prüfmedium gelangen könnten. Die Prüfgefäße müssen so lang sein, dass die Sprosse in den Kontrollgefäßen in der Wasserphase wachsen können, ohne die Oberfläche des Prüfmediums am Ende der Testdauer zu erreichen. Empfohlen werden dickwandige Teströhrchen aus Borosilikatglas ohne Lippe mit einem Innendurchmesser von ca. 20 mm und einer Länge von ungefähr 250 mm mit Aluminiumkappen.
13. Da das modifizierte Andrews-Medium Saccharose enthält (die das Wachstum von Pilzen und Bakterien anregt), müssen die Testlösungen unter sterilen Bedingungen zubereitet werden. Alle Flüssigkeiten und Geräte werden vor dem Gebrauch sterilisiert. Die Sterilisation wird durch Behandlung mit erhitzter Luft (210 °C) über einen Zeitraum von 4 Stunden oder durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121 °C durchgeführt. Darüber hinaus werden alle Flaschen, Gefäße, Schalen usw. sowie sonstige Geräte unmittelbar vor der Verwendung einer Flammbehandlung auf einem sterilen Arbeitstisch unterzogen.
14. Kulturen und Prüfgefäße dürfen nicht zusammen gelagert werden. Daher werden am besten getrennte Wachstumskammern bzw. getrennte Inkubatoren verwendet oder getrennte Räume genutzt. Beleuchtung und Temperatur sollten zu regeln sein, und für Beleuchtung und Temperatur müssen gleichbleibende Werte aufrechterhalten werden können.

## Testorganismus

15. *Myriophyllum spicatum* – eine submerse zweikeimblättrige Wasserpflanze – gehört zur Familie der Tausendblattgewächse. Zwischen Juni und August ragen unscheinbare rosaweiße Blüten aus dem Wasser hervor. Die Pflanzen sind im Boden mit einem System aus robusten Rhizomen verwurzelt und auf der gesamten Nordhalbkugel in eutrophischen, jedoch unverschmutzten und kalkhaltigeren Stillgewässern mit schlammigem Untergrund anzutreffen. *Myriophyllum spicatum* bevorzugt Süßwasser, ist aber auch in Brackwasser zu finden.
16. Für den sedimentfreien Toxizitätstest sind sterile Pflanzen erforderlich. Wenn das Prüflabor nicht über reguläre *Myriophyllum spicatum*-Kulturen verfügt, kann steriles Pflanzenmaterial bei anderen Labors bezogen werden oder (unsteriles) Pflanzenmaterial aus der Natur entnommen oder von einem kommerziellen Lieferanten geliefert werden; stammen die Pflanzen aus der Natur, sollte eine taxonomische Überprüfung der Spezies ins Auge gefasst werden. Bei Entnahme aus der Natur oder im Falle der Lieferung durch einen kommerziellen Lieferanten sollten die Pflanzen sterilisiert (1) und mindestens acht Wochen vor der Verwendung in dem Medium kultiviert werden, das auch für die Tests verwendet wird. Orte in der freien Natur, aus denen die Ausgangskulturen entnommen

werden, dürfen keinen offensichtlichen Quellen von Verunreinigungen ausgesetzt sein. Bei der Entnahme von *Myriophyllum spicatum* aus der Natur, insbesondere in Regionen, wo es zu Hybridisierungen mit anderen *Myriophyllum*-Arten kommen könnte, sollte unbedingt sichergestellt werden, dass die richtige Art entnommen wird. Wenn die Kulturen aus einem anderen Labor bezogen werden, sollten sie mindestens drei Wochen unter ähnlichen Bedingungen kultiviert werden. Die Herkunft des Pflanzenmaterials und die Arten, die für die Tests verwendet werden, sind systematisch zu protokollieren.

17. Qualität und Einheitlichkeit der für die Tests verwendeten Pflanzen haben erhebliche Auswirkungen auf das Ergebnis der Tests; entsprechend sorgfältig müssen die Pflanzen ausgewählt werden. Nach Möglichkeit sollten junge, rasch wachsende Pflanzen ohne sichtbare Läsionen oder Verfärbungen (Chlorose) verwendet werden. Anlage 4 enthält nähere Informationen über die Zubereitung des Testorganismus.

### **Kultivierung**

18. Um den Kultivierungsaufwand zu reduzieren (z. B. wenn über einen bestimmten Zeitraum keine Tests mit *Myriophyllum* vorgesehen sind), können die Kulturen bei verringerter Beleuchtung und niedrigerer Temperatur ( $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gelagert werden. Nähere Informationen zur Kultivierung sind Anlage 3 zu entnehmen.
19. Mindestens 14-21 Tage vor Durchführung der Prüfung wird eine hinreichende Anzahl an Testorganismen keimfrei in ein frisches steriles Medium gebracht und 14-21 Tage unter Testbedingungen als Vorkultur kultiviert. Anlage 4 enthält nähere Informationen über die Zubereitung einer Vorkultur.

### **Prüfmedium**

20. Für *Myriophyllum spicatum* in einem sedimentfreien Testsystem, wie in Anlage 2 beschrieben, wird nur ein Nährmedium empfohlen. Für die Kultivierung und Prüfung mit *Myriophyllum spicatum* wird ein modifiziertes Andrews-Medium empfohlen, wie in (1) beschrieben. Das modifizierte Andrews-Medium wird aus fünf separat zubereiteten Stamm-Nährlösungen mit Zugabe von 3 % Saccharose hergestellt. Anlage 2 enthält nähere Informationen über die Zubereitung des Mediums.
21. Für die Herstellung der Testlösungen (gegebenenfalls durch Verdünnung) wird ein 10-fach konzentriertes modifiziertes Andrews-Medium benötigt. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist Anlage 2 zu entnehmen.

### **Testlösungen**

22. Die Testlösungen werden gewöhnlich durch Verdünnung einer Stammlösung hergestellt. Zum Herstellen von Stammlösungen der Prüfchemikalie wird die Chemikalie im Allgemeinen in entmineralisiertem (d. h. entionisiertem oder destilliertem Wasser) gelöst.

Die Zugabe der Nährstoffe wird durch Verwendung des 10-fach konzentrierten modifizierten Andrews-Mediums erreicht.

23. Die Stammlösungen der Prüfchemikalie können durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121 °C oder durch sterile Filtration sterilisiert werden, vorausgesetzt, dass die Prüfchemikalie durch die verwendete Sterilisationsmethode nicht denaturiert wird. Die Testlösungen können auch in sterilem entmineralisiertem Wasser oder Medium unter sterilen Bedingungen zubereitet werden. Bei der Auswahl der Sterilisationsmethode für die Stammlösungen der Prüfchemikalie sollten die thermische Stabilität und die Adsorption an verschiedenen Oberflächen berücksichtigt werden. Daher wird empfohlen, die Stammlösungen unter sterilen Bedingungen, d. h. unter Verwendung von sterilem Material für die Lösung der Prüfchemikalie unter sterilen Bedingungen (z. B. Flammsterilisation, Laminar-Flow-Hauben usw.) in sterilem Wasser, zuzubereiten. Diese Methode für die Zubereitung von sterilen Stammlösungen gilt sowohl für Stoffe als auch für Gemische.
24. Die höchste getestete Konzentration der Prüfchemikalie sollte in der Regel die Wasserlöslichkeit der Chemikalie bei den jeweiligen Testbedingungen nicht überschreiten. Bei Prüfchemikalien mit geringer Wasserlöslichkeit muss unter Umständen mit einem organischen Lösungsmittel oder einem Dispergiermittel eine konzentrierte Stammlösung oder eine Dispersion der Chemikalie hergestellt werden, damit die exakten Mengen der Prüfchemikalie zum Prüfmedium leichter hinzugegeben werden können und die Dispergierung und die Auflösung der Chemikalie begünstigt wird. Die Verwendung dieser Materialien sollte unbedingt vermieden werden. Durch die Verwendung von Lösungs- oder Dispergiermitteln sollte keine Phytotoxizität entstehen. Häufig verwendete Lösungsmittel, die bei Konzentrationen bis zu 100 µl/l keine phytotoxische Wirkung haben, sind z. B. Aceton und Dimethylformamid. Wenn ein Lösungsmittel oder ein Dispergiermittel verwendet wird, muss die Endkonzentration protokolliert und auf ein Minimum ( $\leq 100 \mu\text{l/l}$ ) beschränkt werden; alle behandelten Proben und die Kontrollproben müssen das Lösungsmittel bzw. das Dispergiermittel in derselben Konzentration enthalten. Weitere Informationen zur Verwendung von Dispergiermitteln sind Quelle (5) zu entnehmen.

### **Test- und Kontrollgruppen**

25. Die vorherige Kenntnis der Toxizität der Prüfchemikalie für *Myriophyllum spicatum* aufgrund eines Dosisfindungstests erleichtert die Auswahl geeigneter Testkonzentrationen. Beim definitiven Toxizitätstest werden in der Regel fünf (wie im Lemna-Wachstumsinhibitionstest, Kapitel C.26 dieses Anhangs) bis sieben Testkonzentrationen in einer geometrischen Reihe angeordnet; sie sollten so gewählt werden, dass die NOEC- und EC<sub>50</sub>-Werte im Konzentrationsbereich liegen (siehe unten). Die Testkonzentrationen sollten sich um einen Faktor von höchstens 3,2 unterscheiden;

bei einer schwachen Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve kommen jedoch auch höhere Werte in Betracht. Die Verwendung von weniger als fünf Konzentrationen muss begründet werden. Für jede Testkonzentration sind mindestens fünf Replikate zu verwenden.

26. Beim Festlegen des Testkonzentrationsbereichs (zur Dosisfindung und/oder für den definitiven Toxizitätstest) sind folgende Punkte zu berücksichtigen:

Um ein angemessenes Konfidenzintervall sicherzustellen, müssen bei der Bestimmung eines  $EC_x$ -Wertes die Testkonzentrationen so gewählt werden, dass der  $EC_x$ -Wert darin eingeschlossen ist. Bei der Ermittlung von  $EC_{50}$  beispielsweise muss die höchste Testkonzentration größer als der  $EC_{50}$ -Wert sein. Wenn der  $EC_{50}$ -Wert außerhalb des Testkonzentrationsbereichs liegt, sind die entsprechenden Konfidenzintervalle groß, und das verwendete statistische Modell ist eventuell nicht geeignet.

Wenn die LOEC- oder NOEC-Werte bestimmt werden sollen, muss die niedrigste Testkonzentration so gering sein, dass das Wachstum nicht signifikant kleiner als das Wachstum der Kontrollgruppe ist. Außerdem muss die höchste Testkonzentration so hoch sein, dass das Wachstum signifikant geringer ist als das Wachstum der Kontrollgruppe. Andernfalls muss der Test mit einem anderen Konzentrationsbereich wiederholt werden (wenn die höchste Konzentration nicht an der Löslichkeitsgrenze bzw. bei der höchstens erforderlichen Grenzkonzentration [z. B. 100 mg/l] liegt).

27. Die Tests beinhalten jeweils Kontrollen, bei denen das gleiche Nährmedium, der gleiche Testorganismus (Wahl des Pflanzenmaterials so homogen wie möglich, frische Seitenäste aus Vorkulturen, gekürzt auf 2,5 cm ab Stängel) und die gleichen Umgebungsbedingungen und Verfahren wie in den Prüfgefäßen gegeben sind und nur die Prüfchemikalie fehlt. Wenn ein zusätzliches Lösungs- oder Dispergiermittel verwendet wird, muss eine zusätzliche Kontrolle mit der gleichen Konzentration des Lösungs-/Dispergiermittels wie in den Prüfansätzen getestet werden. Die Anzahl der Kontrollgefäße zur Durchführung von Replikaten (sowie gegebenenfalls der Lösungsmittelgefäße) muss mindestens zehn betragen.
28. Wenn die NOEC nicht bestimmt werden muss, kann das Prüfprotokoll geändert werden, indem die Anzahl der Konzentrationen erhöht und die Anzahl der Replikate je Konzentration verringert wird. Allerdings sollten in jedem Fall mindestens zehn Kontrollreplikate verwendet werden.

## **Exposition**

29. Frische Seitenäste aus der Vorkultur, die auf 2,5 cm ab Stängel gekürzt wurden, werden den Prüfgefäßen randomisiert unter keimfreien Bedingungen zugeordnet; jedes Gefäß sollte einen 2,5 cm langen Seitenast mit einem Apikalmeristem an einem Ende enthalten. Das gewählte Pflanzenmaterial sollte in allen Prüfgefäßen die gleiche Qualität aufweisen.

30. Die Prüfgefäße müssen randomisiert im Inkubator angeordnet werden, um die Auswirkungen räumlich unterschiedlicher Lichtintensitäten und Temperaturen zu minimieren. Außerdem sind die Gefäße blockweise anzuordnen oder zufällig umzustellen (oder häufiger umzustellen), wenn die Messungen vorgenommen werden.
31. Wenn aufgrund eines Tests zur vorläufigen Charakterisierung der Stabilität anzunehmen ist, dass die Prüfchemikalienkonzentration nicht über die gesamte Testdauer (14 Tage) aufrechterhalten werden kann (d. h. wenn die gemessene Konzentration unter 80 % der gemessenen Ausgangskonzentration fällt), wird ein semistatischer Test empfohlen. In diesem Fall sollten die Pflanzen während des Tests mindestens einmal (z. B. an Tag 7) in frisch hergestellte Test- und Kontrolllösungen gegeben werden. Wie häufig eine Exposition gegenüber dem frischen Medium erfolgt, hängt von der Stabilität der Prüfchemikalie ab. Bei sehr instabilen oder flüchtigen Chemikalien ist unter Umständen eine häufigere Exposition erforderlich, um die Konzentrationen annähernd konstant zu halten.
32. Das Expositionsszenario beim Besprühen wird in dieser Prüfmethode nicht berücksichtigt.

### **Prüfbedingungen**

33. Durch fluoreszierende Beleuchtung mit warmem und/oder kaltweißem Licht wird eine Bestrahlungsstärke hergestellt, die bei Messung unter photosynthetisch aktiver Strahlung (400-700 nm) an Punkten jeweils in demselben Abstand von der Lichtquelle wie der Boden der Prüfgefäße bei ca.  $100\text{-}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  liegt (entsprechend etwa 6000-9000 lx). Es wird ein Hell-/Dunkel-Zyklus von 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit verwendet. Dabei ist zu beachten, dass die Messwerte von der Methode zur Feststellung und zur Messung der Lichtintensität (insbesondere vom Sensortyp) abhängen. Kugelförmige Sensoren (die auf Licht aus allen Winkeln über und unter der Messebene reagieren) sowie „Kosinus“-Sensoren (die auf Licht aus allen Winkeln über der Messebene ansprechen) sind gegenüber unidirektionalen Sensoren zu bevorzugen, da diese Sensoren bei Mehrpunkt-Lichtquellen des hier beschriebenen Typs höhere Messwerte ergeben.
34. Die Temperatur der Prüfgefäße beträgt  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Erhöhte Sorgfalt ist bei der Beurteilung von Verschiebungen des pH-Wertes in Sonderfällen geboten (z. B. beim Testen instabiler Chemikalien oder beim Testen von Metallen). Der pH-Wert sollte im Bereich von 6-9 bleiben. Weitere Informationen in diesem Zusammenhang sind Quelle (5) zu entnehmen.

### **Dauer**

35. Die Prüfung wird 14 Tage nach Einsetzen der Pflanzen in die Prüfgefäße beendet.

## Messungen und analytische Bestimmungen

36. Bei Beginn der Prüfung beträgt die Hauptsprosslänge des Testorganismus 2,5 cm (siehe Nummer 29). Sie wird mit einem Lineal (siehe Anlage 4) oder durch Fotografie und Bildanalyse gemessen. Die Hauptsprosslänge des normal oder anomal aussehenden Testorganismus ist am Anfang der Prüfung, mindestens einmal während der 14-tägigen Expositionsdauer und am Ende der Prüfung zu bestimmen. Hinweis: Ist eine Bildanalyse nicht möglich, kann alternativ, sofern der Arbeitstisch vor der Zugabe der Pflanzen in die Prüfgefäße sterilisiert wird, ein steriles Lineal zum Messen der Hauptsprosslänge am Anfang und Ende der Prüfung verwendet werden. Änderungen in der Entwicklung der Pflanzen, z. B. Deformation der Sprosse, Änderungen des Aussehens, Anzeichen für eine Nekrose, Chlorose, Aufwölbungen oder der Verlust der Schwimmfähigkeit sowie Veränderungen der Wurzellänge oder der sonstigen Beschaffenheit der Wurzeln, sind zu protokollieren. Wesentliche Merkmale des Prüfmediums (z. B. Vorliegen nicht gelösten Materials oder Algen-, Pilz- oder Bakterienwachstum im Prüfgefäß) werden ebenfalls vermerkt.
37. Ergänzend zur Ermittlung der Hauptsprosslänge während der Prüfung sind auch die Auswirkungen der Prüfchemikalie auf drei (oder mehrere) der folgenden Messvariablen zu bewerten:
- i. Gesamtseitenastlänge
  - ii. Gesamtsprosslänge
  - iii. Gesamtwurzellänge
  - iv. Frischmasse
  - v. Trockenmasse
  - vi. Anzahl der Wirteln

Hinweis 1: Die Beobachtungen während des Dosisfindungstests könnten bei der Auswahl der relevanten zusätzlichen Messungen aus den sechs oben genannten Messvariablen helfen.

Hinweis 2: Die Frisch- und Trockenmasse (Parameter iv und v) sollten unbedingt bestimmt werden.

Hinweis 3: Aufgrund der Tatsache, dass sich Saccharose und Licht (Exposition der Wurzeln gegenüber Licht während des Tests) auf Auxin (Pflanzenwachstumshormon)-Träger auswirken können und einige Chemikalien eine auxinähnliche Wirkungsweise haben, ist fraglich, ob die wurzelbezogenen Endpunkte (Parameter iii) einbezogen werden sollten.

Hinweis 4: Die Ringtest-Ergebnisse zeigen hohe Variationskoeffizienten (> 60 %) für die Gesamtseitenastlänge (Parameter i). Die Gesamtseitenastlänge liegt in jedem Fall innerhalb



der Messung der Gesamtsprosslänge (Parameter ii), die akzeptablere Variationskoeffizienten  $< 30\%$  zeigt.

Hinweis 5: Auf der Grundlage der vorstehenden Erwägungen ergeben sich die folgenden empfohlenen Hauptendpunkte: Gesamtsprosslänge, Frisch- und Trockenmasse (Parameter ii, iv und v); Parameter vi (Anzahl der Wirteln) bleibt dem Ermessen des Versuchsleiters überlassen.

38. Hauptsprosslänge und Anzahl der Wirteln haben jeweils den Vorteil, dass sie am Anfang, während und am Ende der Prüfung für jedes Prüf- und Kontrollgefäß durch Fotografie und Bildanalyse bestimmt werden können, obwohl auch ein (steriles) Lineal verwendet werden kann.
39. Gesamtseitenastlänge, Gesamtwurzellänge (als Summe aller Seitenäste oder Wurzeln) und Gesamtsprosslänge (als Summe aus Hauptsprosslänge und Gesamtseitenastlänge) kann am Ende der Exposition mit einem Lineal gemessen werden.
40. Die Trocken- und/oder Frischmasse werden am Anfang der Prüfung an einer Probe der Vorkultur ermittelt, die typisch für das am Anfang der Prüfung verwendete Material ist; eine weitere Feststellung erfolgt am Ende der Prüfung anhand des Pflanzenmaterials jeweils aus den Prüfgefäßen und aus den Kontrollgefäßen.
41. Gesamtseitenastlänge, Gesamtsprosslänge, Gesamtwurzellänge, Frischmasse, Trockenmasse und Anzahl der Wirten können wie folgt bestimmt werden:
  - i. Gesamtseitenastlänge: Die Seitenastlänge kann durch Messen aller Seitenäste mit einem Lineal am Ende der Exposition ermittelt werden. Die Gesamtseitenastlänge ist die Summe aller Seitenäste in jedem Prüf- und Kontrollgefäß.
  - ii. Gesamtsprosslänge: Die Hauptsprosslänge kann durch Bildanalyse oder mit einem Lineal ermittelt werden. Die Gesamtsprosslänge ist die Summe aus Gesamtseitenastlänge und Hauptsprosslänge in jedem Prüf- und Kontrollgefäß am Ende der Exposition.
  - iii. Gesamtwurzellänge: Die Wurzellänge kann durch Messen aller Wurzeln mit einem Lineal am Ende der Exposition ermittelt werden. Die Gesamtwurzellänge ist die Summe aller Wurzeln in jedem Prüf- und Kontrollgefäß.
  - iv. Frischmasse: Die Frischmasse kann durch Wiegen der Testorganismen am Ende der Exposition bestimmt werden. Das gesamte Pflanzenmaterial in jedem Prüf- und Kontrollgefäß wird mit destilliertem Wasser abgespült und mit Zellulosepapier trockengetupft. Nach dieser Vorbereitung wird die Frischmasse durch Wiegen ermittelt. Die Ausgangsbiomasse (Frischmasse) wird anhand einer Probe von Testorganismen aus derselben Charge bestimmt, aus der die Prüfgefäße beimpft wurden.
  - v. Trockenmasse: Nach den Vorbereitungen zur Bestimmung der Frischmasse werden

die Testorganismen bei 60 °C auf eine konstante Masse getrocknet. Diese Masse ist die Trockenmasse. Die Ausgangsbio­masse (Trockenmasse) wird anhand einer Probe von Testorganismen aus derselben Charge bestimmt, aus der die Prüfgefäße beimpft wurden.

- vi. Anzahl der Wirteln: Es werden alle Wirteln entlang des Hauptspores gezählt.

#### *Häufigkeit der Messungen und der analytischen Bestimmungen*

42. Bei statischen Tests wird jeweils am Anfang und am Ende der Prüfung der pH-Wert der behandelten Lösungen gemessen. Bei semistatischen Tests wird für alle Chargen der „frischen“ Testlösung jeweils vor den Erneuerungen der pH-Wert ermittelt; außerdem ist der pH-Wert der „verbrauchten“ Lösungen zu bestimmen.
43. Die Lichtintensität wird in der Wachstumskammer, im Inkubator oder im jeweiligen Raum in dem Abstand von der Lichtquelle gemessen, der auch bei den Testorganismen gegeben ist. Während der Prüfung wird mindestens eine Messung vorgenommen. Die Temperatur des Mediums in einem Surrogatgefäß unter den gleichen Bedingungen wie in der Wachstumskammer bzw. im Inkubator oder im jeweiligen Raum ist mindestens täglich (oder kontinuierlich mit einem Datenlogger) zu protokollieren.
44. Während der Prüfung wird die Konzentration der Prüfchemikalie(n) in geeigneten Intervallen bestimmt. Bei statischen Tests ist die Konzentration mindestens am Anfang und am Ende der Prüfung zu ermitteln.
45. Bei semistatischen Tests, bei denen davon ausgegangen wird, dass die Konzentrationen der Prüfchemikalie(n) nicht im Bereich von  $\pm 20\%$  der Nominalkonzentration aufrechterhalten werden können, müssen alle frisch hergestellten Testlösungen sowie alle Lösungen jeweils nach der Erneuerung analysiert werden. Bei Tests, bei denen die gemessenen Ausgangskonzentrationen der Prüfchemikalie(n) zwar nicht  $\pm 20\%$  der Nominalkonzentration betragen, für die aber hinreichend nachgewiesen werden kann, dass die Ausgangskonzentrationen wiederholbar und stabil sind (d. h. dass die Konzentrationen im Bereich von 80-120 % der Ausgangskonzentration liegen), sind chemische Bestimmungen nur bei der höchsten und der niedrigsten Konzentration erforderlich. In jedem Fall brauchen die Prüfchemikalienkonzentrationen für alle Testkonzentrationen vor der Erneuerung jeweils nur bei einem einzigen Replikat (bzw. bei Gefäßen mit zusammengefassten Replikaten jeweils bei nur einem Gefäß) erneut bestimmt zu werden.
46. Wenn nachgewiesen wird, dass die Testkonzentration während des Tests zufriedenstellend in Höhe von  $\pm 20\%$  der Nominalkonzentration oder der gemessenen Ausgangskonzentration aufrechterhalten werden konnte, können die Ergebnisse auch ausgehend von den Nominalwerten bzw. von den gemessenen Ausgangswerten analysiert werden. Beträgt die Abweichung von der Nominalkonzentration oder von der

gemessenen Ausgangskonzentration mehr als  $\pm 20\%$ , sollte bei der Analyse der Ergebnisse vom geometrischen Mittel der Konzentration während der Expositionsdauer oder von Modellen ausgegangen werden, die den Rückgang der Prüfchemikalienkonzentration beschreiben (5).

### **Limit-Test**

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

## **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

### **Reaktionsvariablen**

48. Mit der Prüfung sollen die Wirkungen einer Prüfchemikalie auf das vegetative Wachstum von *Myriophyllum spicatum* bestimmt werden. In dieser Prüfmethode werden zwei Reaktionsvariablen beschrieben.
- a) Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate: Diese Reaktionsvariable wird auf der Grundlage von Veränderungen der Logarithmen der Hauptprosslänge sowie ausgehend von Veränderungen der Logarithmen sonstiger Messparameter, d. h. Gesamtsprosslänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln während eines bestimmten Zeitraums (jeweils pro Tag ausgedrückt) in den Kontrollen und einzelnen Behandlungsgruppen berechnet. Hinweis: Für die Messparameter „Gesamtseitenastlänge“ und „Gesamtwurzellänge“ kann die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate nicht berechnet werden. Am Anfang der Prüfung besitzt der Testorganismus weder Seitenäste noch Wurzeln (basierend auf der Zubereitung aus der Vorkultur). Ausgehend vom Nullwert ist die Berechnung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate nicht definiert.
  - b) Zellertrag: Diese Reaktionsvariable wird auf der Grundlage von Veränderungen der Hauptprosslänge sowie ausgehend von Veränderungen sonstiger Messparameter, d. h.

vorzugsweise Gesamtsprosslänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln sowie sonstiger Parameter, die als notwendig erachtet werden, in den Kontrollen und einzelnen Behandlungsgruppen bis zum Testende berechnet.

49. Die Toxizitätsschätzungen sollten auf der Hauptsprosslänge und drei zusätzlichen Messvariablen (d. h. vorzugsweise Gesamtsprosslänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln, siehe Nummer 37 und Hinweise 2, 4 und 5 unter dieser Nummer) beruhen, da sich manche Chemikalien erheblich stärker auf andere Messvariablen auswirken können als die Hauptsprosslänge. Diese Auswirkungen würden nicht festgestellt werden, wenn ausschließlich die Hauptsprosslänge berechnet würde.

#### *Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate*

50. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate in einem bestimmten Zeitraum wird als logarithmische Zunahme der Wachstumsvariablen, d. h. Hauptsprosslänge und drei weitere Messvariablen (Gesamtsprosslänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln) für die einzelnen Replikate der Kontrollen und Behandlungsgruppen mit der nachstehenden Formel berechnet:

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

Dabei sind:

$\mu_{i-j}$  : durchschnittliche spezifische Wachstumsrate vom Zeitpunkt i bis zum Zeitpunkt j

$N_i$  : Messvariable im Prüfgefäß bzw. im Kontrollgefäß zum Zeitpunkt i

$N_j$  : Messvariable im Prüfgefäß bzw. im Kontrollgefäß zum Zeitpunkt j

t : Zeitraum vom Zeitpunkt i bis zum Zeitpunkt j

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

51. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate wird für die gesamte Testdauer berechnet. (In der vorstehenden Formel bezeichnet „i“ den Beginn der Prüfung und „j“ das Ende der Prüfung.) Für alle Konzentrationen der Testlösungen und der Kontrolllösungen sind ein Mittelwert für die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate zu berechnen und die entsprechenden Varianzschätzungen vorzunehmen. Außerdem muss die abschnittsbezogene Wachstumsrate bestimmt werden, um die Auswirkungen der Prüfchemikalie während der Expositionsdauer beurteilen zu können (z. B. durch Prüfung der logarithmisch transformierten Wachstumskurven).
52. Die Hemmung der Wachstumsrate in Prozent ( $I_r$ ) kann anschließend für jede

Testkonzentration (Behandlungsgruppe) nach der folgenden Formel berechnet werden:

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

Dabei sind:

% I<sub>r</sub> = Hemmung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate in Prozent

μ<sub>C</sub> : Mittelwert für μ in der Kontrollgruppe

μ<sub>T</sub> : Mittelwert für μ in der Behandlungsgruppe

### *Zellertrag*

53. Die Auswirkungen auf den Zellertrag werden ausgehend von der Messvariablen „Hauptsprosslänge“ und drei weiteren Messvariablen (d. h. vorzugsweise Gesamtsprosslänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln) der jeweiligen Prüfgefäße am Anfang und am Ende der Prüfung bestimmt. Für die Frisch- oder Trockenmasse wird die Ausgangsbiomasse anhand einer Probe von Testorganismen aus derselben Charge bestimmt, aus der die Prüfgefäße beimpft wurden. Für jede Testkonzentration und Kontrolllösung ist ein mittlerer Zellertrag zu berechnen; die Varianzen sind jeweils zu schätzen. Die mittlere prozentuale Hemmung des Zellertrags (% I<sub>y</sub>) kann für jede Behandlungsgruppe wie folgt berechnet werden:

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

Dabei sind:

% I<sub>y</sub>: Verringerung des Zellertrags in Prozent

b<sub>C</sub>: Biomasse am Ende der Prüfung abzüglich der Biomasse am Anfang der Prüfung (Kontrollgruppe)

b<sub>T</sub>: Biomasse am Ende der Prüfung abzüglich der Biomasse am Anfang der Prüfung (Behandlungsgruppe)

### *Verdopplungszeit*

54. Um die Dauer bis zur Verdopplung der Hauptsprosslänge (T<sub>d</sub>) zu bestimmen und um sicherzustellen, dass dieses Validitätskriterium erfüllt wird (siehe Nummer 8), sind die Daten der Kontrollgefäße in die folgende Gleichung einzusetzen:

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

Dabei steht μ für die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate, die wie unter den Nummern 50-52 beschrieben bestimmt wurde.

## Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven

55. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der mittleren Hemmung der Reaktionsvariablen in Prozent ( $I_r$  oder  $I_y$  berechnet gemäß der Anweisung unter Nummer 53) und die logarithmische Konzentration der Prüfchemikalie werden grafisch dargestellt.

## EC<sub>x</sub>-Schätzung

56. Schätzungen der EC<sub>x</sub>-Werte sollten sowohl auf der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate ( $E_rC_x$ ) als auch auf dem Zellertrag ( $E_yC_x$ ) beruhen, und beide Werte sollten ihrerseits von der Hauptprosslänge und eventuell weiteren Messvariablen (d. h. vorzugsweise Gesamtprosslänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln) ausgehen, weil sich manche Chemikalien unterschiedlich auf die Hauptprosslänge und sonstige Messvariablen auswirken. Die gewünschten Toxizitätsparameter bestehen entsprechend aus vier EC<sub>x</sub>-Werten für alle berechneten Hemmkonzentrationen x:  $E_rC_x$  (Hauptprosslänge),  $E_rC_x$  (d. h. vorzugsweise Gesamtprosslänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln),  $E_yC_x$  (Hauptprosslänge) und  $E_yC_x$  (d. h. vorzugsweise Gesamtprosslänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln).
57. Es wird darauf hingewiesen, dass die mit diesen beiden Reaktionsvariablen berechneten EC<sub>x</sub>-Werte nicht vergleichbar sind; der entsprechende Unterschied muss bei der Verwendung der Testergebnisse berücksichtigt werden. Die mit der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate ( $E_rC_x$ ) berechneten Werte für EC<sub>x</sub> werden im Allgemeinen höher sein als die anhand des Zellertrags ( $E_yC_x$ ) ermittelten Werte, wenn die für diese Prüfmethode vorgesehenen Bedingungen eingehalten werden; dies ist auf die unterschiedliche mathematische Grundlage der beiden Berechnungsverfahren zurückzuführen. Die auftretenden Unterschiede sollten jedoch nicht als Anzeichen für eine unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Reaktionsvariablen betrachtet werden; die Werte sind einfach mathematisch verschieden.

## Statistische Verfahren

58. Ziel ist die Ermittlung einer quantitativen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durch Regressionsanalyse. Im Anschluss an eine linearisierte Transformation der Reaktionsdaten (z. B. nach dem Probit-, Logit- oder Weibull-Modell) (7) kann eine gewichtete lineare Regression vorgenommen werden; nicht-lineare Regressionsverfahren, mit denen die unvermeidlichen Unregelmäßigkeiten der Daten und Abweichungen von gleichförmigen Verteilungen besser verarbeitet werden können, werden jedoch bevorzugt. Im Bereich von Null bzw. der vollständigen Hemmung können diese Unregelmäßigkeiten durch die Transformation vergrößert werden und die Analyse beeinträchtigen (7). Es wird darauf hingewiesen, dass Standard-Analysemethoden mit Probit-, Logit- oder Weibull-Transformationen für quantale Daten (z. B. Mortalität oder Überlebensrate) vorgesehen sind und zur Verwendung in Verbindung mit Wachstums-

oder Zellertragsdaten entsprechend modifiziert werden müssen. Spezifische Verfahren zur Bestimmung von  $EC_x$ -Werten aus kontinuierlichen Daten sind den Quellen (8), (9) und (10) zu entnehmen.

59. Für jede zu analysierende Reaktionsvariable sind aufgrund der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung  $EC_x$ -Werte zu ermitteln. Nach Möglichkeit sollten für jeden  $EC_x$ -Wert die 95 %-Konfidenzintervalle bestimmt werden. Die Qualität der Übereinstimmung der Reaktionsdaten mit dem Regressionsmodell sollte grafisch oder statistisch bewertet werden. Die Regressionsanalyse wird mit den Reaktionen der einzelnen Replikate (und nicht mit den Mittelwerten der Behandlungsgruppe) durchgeführt.
60. Schätzwerte für  $EC_{50}$  und für die Konfidenzintervalle können auch durch lineare Interpolation mit einem Bootstrapping-Algorithmus (10) erzielt werden, wenn die verfügbaren Regressionsmodelle/-methoden für die betreffenden Daten nicht geeignet sind.
61. Für eine Schätzung der LOEC-Werte und entsprechend auch der NOEC-Werte müssen die Mittelwerte der behandelten Lösungen durch Varianzanalyseverfahren (ANOVA) verglichen werden. Der Mittelwert der einzelnen Konzentrationen ist dann mit einer geeigneten Methode zur Durchführung von Mehrfachvergleichen bzw. zur Durchführung von Trendtests mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe zu vergleichen. Dunnett- und Williams-Tests können hilfreich sein (12) (13) (14) (15) (16). Die ANOVA-Annahme der Varianzhomogenität muss einer Überprüfung unterzogen werden. Die entsprechende Bewertung kann anhand einer grafischen Darstellung oder aufgrund eines formalen Tests vorgenommen werden (15). Geeignet sind Levene- und Bartlett-Tests. Wenn die Annahme der Varianzhomogenität nicht erfüllt ist, kann gelegentlich eine Korrektur durch logarithmische Datentransformation erfolgen. Bei außerordentlicher Varianzheterogenität, die durch Transformation nicht korrigiert werden kann, sollten Analysen durch Methoden wie z. B. Jonckheere-Trendtests (Step-Down) erwogen werden. Weitere Hinweise zur Bestimmung von NOEC-Werten sind Quelle (10) zu entnehmen.
62. Aufgrund neuer Forschungsergebnisse wird empfohlen, das Konzept der NOEC aufzugeben und durch Punktschätzungen von  $EC_x$ -Werten zu ersetzen, die durch Regression ermittelt wurden. Für diesen Myriophyllum-Test wurde noch kein geeigneter Wert für  $x$  definiert. Ein Bereich von 10 bis 20 % scheint jedoch geeignet (abhängig von der ausgewählten Reaktionsvariablen); vorzugsweise sollten sowohl  $EC_{10}$  und  $EC_{20}$  als auch deren Konfidenzgrenzen protokolliert werden.

## **Berichterstattung**

63. Der Prüfbericht muss folgende Informationen 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.

### *Testspezies*

- wissenschaftliche Bezeichnung und Herkunft.

### *Prüfbedingungen*

- angewandtes Testverfahren (statisch oder semistatisch).
- Datum des Testbeginns und Dauer des Tests.
- Prüfmedium.
- Beschreibung des Prüfprotokolls: Prüfgefäße und Abdeckungen, Lösungsvolumina, Hauptspasslänge pro Prüfgefäß am Anfang des Tests.
- Testkonzentrationen (Nominalkonzentrationen bzw. gemessene Konzentrationen) und Anzahl der Replikate pro Konzentration.
- Methoden zur Herstellung von Stamm- und Testlösungen einschließlich der Verwendung von Lösungsmitteln und Dispergiermitteln.
- Temperatur während des Tests.
- Lichtquelle, Lichtintensität und Homogenität des Lichts.
- pH-Werte der Prüfmedien und der Kontrollmedien.



- Methode zur Analyse der Prüfchemikalie mit geeigneten Daten zur Qualitätsbewertung (Validierungsstudien, Standardabweichungen oder Konfidenzgrenzen der Analysen).
- Methoden zur Bestimmung der Hauptsprosslänge und sonstiger Messvariablen, z. B. Gesamtseitenastlänge, Gesamtsprosslänge, Gesamtwurzellänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln.
- Zustand der Kultur (steril oder nicht steril) für jedes Prüf- und Kontrollgefäß bei jeder Beobachtung.
- Sämtliche Abweichungen von dieser Prüfmethode.

### *Ergebnisse*

- Rohdaten: Hauptsprosslänge und sonstige Messvariablen der einzelnen Prüf- und Kontrollgefäße bei jeder Beobachtung und Analyse.
- Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Messvariablen.
- Wachstumskurven für jede Messvariable.
- Berechnete Reaktionsvariablen für alle behandelten Replikate mit Mittelwerten und dem Variationskoeffizienten für Replikate.
- Grafische Darstellung der Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung.
- Schätzungen der Endpunkte der Toxizität für die verschiedenen Reaktionsvariablen (z. B. EC<sub>50</sub>, EC<sub>10</sub>, EC<sub>20</sub>) und entsprechende Konfidenzintervalle. Wenn berechnet, sind die LOEC-Werte und/oder die NOEC-Werte sowie die zur jeweiligen Berechnung verwendeten statistischen Methoden anzugeben.
- Bei Durchführung von Varianzanalysen (ANOVA) der Umfang der nachweisbaren Auswirkungen (z. B. geringster signifikanter Unterschied).
- Jegliche in behandelten Proben festgestellte Wachstumsstimulation.
- Alle offensichtlichen Anzeichen einer Phytotoxizität sowie Beobachtungen an den Testlösungen.
- Diskussion der Ergebnisse einschließlich aller Auswirkungen auf das Testergebnis, die auf Abweichungen von dieser Prüfmethode zurückzuführen sind.

## LITERATURHINWEISE

- (1) ASTM Designation E 1913-04, *Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, Myriophyllum sibiricum* Komarov.
- (2) Maletzki, D. et al. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch*, Nr. 22, 702-710.
- (3) Kapitel C.26 dieses Anhangs: *Lemna* sp. - Wachstumsinhibitionstest.
- (4) OECD (2014), *Myriophyllum spicatum Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system*", *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment*, No. 205, OECD Publishing, Paris.
- (5) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment*, No. 23, OECD Publishing, Paris.
- (6) Kapitel C.51 dieses Anhangs: *Myriophyllum spicatum*-Toxizitätstest im Wassersediment
- (7) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), *Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves*, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.
- (8) Nyholm, N. et al. (1992), *Statistical treatment of data from microbial toxicity tests*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, 157-167.
- (9) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), *A statistical procedure for modelling continuous toxicity data*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, 1485-1494.
- (10) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, *OECD Environmental Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 54*, OECD, Paris.
- (11) Norberg-King, T.J. (1988), *An interpolation estimate for chronic toxicity*:

*The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.*

- (12) Dunnett, C.W. (1955), *A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control*, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, 1096-1121.
- (13) Dunnett, C.W. (1964), *New tables for multiple comparisons with a control*, *Biometrics*, Vol. 20/3, 482-491.
- (14) Williams, D.A. (1971), *A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control*, *Biometrics*, Vol. 27/1, 103-117.
- (15) Williams, D.A. (1972), *The comparison of several dose levels with a zero dose control*, *Biometrics*, Vol. 28/2, 519-531.
- (16) Brain, P., R. Cousens (1989), *An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses*, *Weed Research*, Vol. 29/2, 93-96.

## Anlage 1

### DEFINITIONEN

**Biomasse** ist die Frisch- und/oder Trockenmasse des in einer Population enthaltenen lebenden Materials. In diesem Test entspricht die Biomasse der Summe aus Hauptspross, allen Seitenästen und allen Wurzeln.

**Chemikalie** ist ein Stoff oder Gemisch.

**Chlorose** ist eine Farbveränderung von grün nach gelb des Testorganismus, insbesondere der Wirteln.

**EC<sub>x</sub>** ist die Konzentration der im Prüfmedium aufgelösten Prüfchemikalie, bei der sich binnen einer festgelegten Expositionsdauer eine Reduzierung des Wachstums von *Myriophyllum spicatum* um x % (z. B. 50 %) ergibt. (Die Expositionsdauer ist ausdrücklich zu nennen, wenn die Dauer von der vollständigen oder normalen Testdauer abweicht.) Um einen von der Wachstumsrate bzw. vom Zellertrag abgeleiteten EC-Wert eindeutig zu kennzeichnen, wird die Bezeichnung „E<sub>r</sub>C“ für die Wachstumsrate und „E<sub>y</sub>C“ für den Zellertrag jeweils gefolgt von der verwendeten Messvariablen (z. B. E<sub>r</sub>C (Hauptsprosslänge) verwendet.

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

**Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)** ist die niedrigste geprüfte Konzentration, bei der beobachtet wurde, dass die Chemikalie binnen einer bestimmten Expositionsdauer gegenüber der Kontrollprobe eine statistisch signifikante Wachstumsreduzierung bewirkt (bei  $p < 0,05$ ). Alle Testkonzentrationen oberhalb der LOEC müssen jedoch eine schädigende Wirkung haben, die gleich den bei der LOEC beobachteten Wirkungen oder größer als diese ist. Können diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden, muss ausführlich erklärt werden, wie die LOEC (und damit auch die NOEC) ausgewählt wurde.

**Messvariablen** sind alle Variablentypen, die gemessen werden, um mit mindestens einer Reaktionsvariablen den Endpunkt des Tests zu beschreiben. Bei dieser Prüfmethode bilden

Hauptsprosslänge, Gesamtseitenastlänge, Gesamtsprosslänge, Gesamtwurzellänge, Frischmasse, Trockenmasse und Anzahl der Wirteln die Messvariablen.

**Monokultur** ist eine Kultur mit einer Pflanzenart.

**Nekrose** ist abgestorbenes (d. h. weißes oder dunkelbraunes) Gewebe des Testorganismus.

**No Observed Effect Concentration** (NOEC) ist die Testkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC.

**Prüfchemikalie** bezeichnet einen Stoff oder ein Gemisch, der bzw. das nach dieser Methode geprüft wird.

**Prüfmedium** ist das gesamte synthetische Nährmedium, in dem die zu prüfenden Pflanzen wachsen, wenn sie der Prüfchemikalie ausgesetzt werden; die Prüfchemikalie wird im Allgemeinen im Prüfmedium aufgelöst.

**Reaktionsvariable** ist eine Variable für die geschätzte Toxizität, abgeleitet aus beliebigen gemessenen Variablen zur Beschreibung der Biomasse durch verschiedene Berechnungsmethoden. Bei dieser Prüfmethode sind die Wachstumsrate und der Zellertrag die Reaktionsvariablen, die aus Messvariablen wie z. B. Hauptsprosslänge, Gesamtsprosslänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln abgeleitet werden.

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

**Statischer Test** ist eine Prüfmethode, bei der die Testlösung während der Testdauer nicht erneuert wird.

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

**Wachstum** ist eine Zunahme der Messvariablen, z. B. Hauptsprosslänge, Gesamtseitenastlänge, Gesamtsprosslänge, Gesamtwurzellänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln während der Testdauer.

**Wachstumsrate** (durchschnittliche spezifische Wachstumsrate) ist die logarithmische Zunahme der Messvariablen während der Expositionsdauer. *Hinweis:* Die auf die

Wachstumsrate bezogenen Reaktionsvariablen sind unabhängig von der Testdauer, solange das Wachstumsmuster der nicht exponierten Kontrollorganismen exponential ist.

**Zellertrag** ist der Wert einer Messvariablen zur Beschreibung der Biomasse am Ende der Expositionsdauer abzüglich der Messvariablen am Anfang der Expositionsdauer. Hinweis: Im Falle eines exponentialen Wachstumsmusters der nicht exponierten Organismen verringern sich die auf den Zellertrag bezogenen Reaktionsvariablen mit der Testdauer.

## Anlage 2

### MODIFIZIERTES ANDREWS-MEDIUM FÜR STAMM- UND VORKULTUR

Das modifizierte Andrews-Medium, das für die Stamm- und Vorkultur benötigt wird, wird aus fünf separat zubereiteten Stamm-Nährlösungen unter Zugabe von 3 % Saccharose hergestellt.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der Andrews-Nährlösung: (ASTM Designation E 1913-04)

Herstellung der Stamm-Nährlösungen			Herstellung der Nährlösung
Stammlösung	Chemikalie	Ausgangsgewicht pro 1000 ml	ml pro 5 l Nährlösung
1	KCl	74,6 mg	50
	KNO <sub>3</sub>	8,08 g	
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	18,88 g	
2	MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	9,86 g	50
3	Siehe nachstehende Stammlösung 3.1		50
4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,72 g	50
5	FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,278 g	50
	Na <sub>2</sub> EDTA* 2 H <sub>2</sub> O	0,372 g	

Stammlösungen können 6 Monate lang in einem Kühlschrank aufbewahrt werden (bei 5-10 °C). Nur die Stammlösung Nr. 5 besitzt eine verringerte Haltbarkeit (zwei Monate).

**Tabelle 2:** Herstellung der Stammlösung 3.1 für die Zubereitung der Stammlösung 3

Chemikalie	Ausgangsgewicht g/100 ml
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	0,223
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,115
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,155
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0,0125
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	0,0037

Nach der Herstellung der Stammlösung 3.1 (Tabelle 2) wird diese in ca. 11 ml-Aliquoten (bei mindestens -18 °C) eingefroren. Die eingefrorenen Partien sind fünf Jahre haltbar.

Zur Herstellung der Stammlösung 3 wird die Stammlösung 3.1 aufgetaut, 10 ml davon in einen 1 l-Messkolben gefüllt und Reinstwasser bis zur Marke zugegeben.

Um modifiziertes Andrews-Medium zu erhalten, werden ca. 2500 ml Reinstwasser in einen 5 l-Messkolben gefüllt. Nach dem Hinzugeben von 50 ml jeder Stammlösung werden 90 % des Messkolbens mit Reinstwasser befüllt und der pH-Wert auf 5,8 eingestellt.

Anschließend werden 150 g gelöste Saccharose (3 % pro 5 l) hinzugegeben und der Messkolben bis zur Marke mit Reinstwasser befüllt. Schließlich wird die Nährlösung in 1 l-Schott-Flaschen gefüllt und 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Die somit gewonnene Nährlösung kann drei Monate lang in einem Kühlschrank (bei 5-10 °C) steril gehalten werden.

### **Modifiziertes Andrews-Medium für sedimentfreien Toxizitätstest**

Aus den fünf Stamm-Nährlösungen, die bereits in den Tabellen 1 und 2 genannt wurden, wird ein 10-fach konzentriertes, modifiziertes Andrews-Medium, das für die Herstellung der Testlösungen benötigt wird, unter Zugabe von 30 % Saccharose zubereitet. Hierzu werden ca. 100 ml Reinstwasser in einen 1 l-Messkolben gefüllt. Nach der Zugabe von 100 ml von jeder der Stammlösungen wird der pH-Wert auf 5,8 eingestellt. Anschließend werden 30 % gelöste Saccharose (300 g pro 1000 ml) hinzugegeben und der Messkolben bis zur Marke mit Reinstwasser befüllt.

Schließlich wird die Nährlösung in 0,5 l-Schott-Flaschen gefüllt und 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

Die somit gewonnene 10-fach konzentrierte, modifizierte Nährlösung kann drei Monate lang in einem Kühlschrank (bei 5-10 °C) steril gehalten werden.



### Anlage 3

#### **HALTUNG DER STAMMKULTUR**

In der vorliegenden Anlage 3 wird die Stammkultur von *Myriophyllum spicatum* L<sup>1</sup>, einer submersen zweikeimblättrigen Wasserpflanzenart, die der Familie der Tausendblattgewächse angehört, beschrieben. Zwischen Juni und August ragen unscheinbare rosaweiße Blüten aus dem Wasser hervor. Die Pflanzen sind im Boden mit einem System aus robusten Rhizomen verwurzelt und auf der gesamten Nordhalbkugel in eutrophischen, jedoch unverschmutzten und kalkhaltigeren Stillgewässern mit schlammigem Untergrund anzutreffen. *Myriophyllum spicatum* bevorzugt Süßwasser, ist aber auch in Brackwasser zu finden.

Für eine sedimentfreie Stammkultur unter Laborbedingungen sind sterile Pflanzen erforderlich. Sterile Pflanzen können vom Ökotoxikologielabor des deutschen Umweltbundesamts bezogen werden.

Alternativ können Testorganismen aus nichtsterilen Pflanzen gemäß ASTM Designation E 1913-04 zubereitet werden. Das Verfahren für die Kultivierung von aus der Natur entnommenem *Myriophyllum sibiricum* ist wie folgt (Auszug aus dem ASTM Standard Guide):

„Wenn aus der Natur entnommene, nichtsterile Pflanzen als Ausgangsmaterial verwendet werden sollen, werden *M. sibiricum*-Stängel im Herbst gesammelt. Die Stängel werden in ein 20 l-Aquarium mit 5 cm sterilem Sediment gelegt, das mit Quarzsand oder beispielsweise Turface® und 18 l Reagenzwasser bedeckt ist. Das Aquarium wird belüftet und es wird eine Temperatur von 15 °C und eine Flussrate von 200-300 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> während 16 Stunden pro Tag eingehalten. Die Pflanzenkultur im Aquarium kann als Reservequelle für Pflanzen gehalten werden, falls die sterilen Pflanzenkulturen durch eine mechanische Funktionsstörung im Wachstumsschrank, durch Verunreinigung oder aus anderem Grund zerstört werden. Die im Aquarium gewachsenen Pflanzen sind nicht steril und sterile Kulturen können nicht in einem Batch-Kultursystem gehalten werden. Zum Sterilisieren der Kultur werden die Pflanzen aus dem Aquarium entnommen und ca. 0,5 Stunden unter fließendem entionisiertem Wasser abgespült. Die Pflanzen werden dann

---

<sup>1</sup> Carl von Linné (\* 23. Mai 1707 in Råshult /Älmhult; † 10. Januar 1778 in Uppsala).

höchstens 20 Minuten unter keimfreien Bedingungen in einer Laminar-Airflow-Kabine in einer 3 %igen (w/v) Natriumhypochloridlösung mit 0,01 % eines geeigneten Tensids (bis das Pflanzengewebe größtenteils gebleicht und lediglich die wachsende Spitze noch grün ist) desinfiziert. Das Desinfektionsmittel und das Pflanzenmaterial werden verrührt. Segmente mit mehreren Knoten werden in sterile Kulturröhrchen mit 45 ml sterilisiertem, modifiziertem Andrews-Medium umgesetzt, die mit einfachen Kulturröhrchenverschlüssen versehen werden. In jede Prüfkammer wird nur ein Pflanzensegment gelegt. Der Verschluss wird mit Labor-Dichtfolie am Kulturröhrchen befestigt. Nach der Herstellung einer sterilen Kultur sollten Pflanzensegmente, die mehrere Knoten enthalten, alle 10-12 Tage in neue Prüfkammern mit frischem flüssigem Nährmedium umgesetzt werden. Wie durch Kultivierung auf Agarplatten nachgewiesen, müssen die Pflanzen steril sein und acht Wochen steril bleiben, bevor die Prüfung gestartet werden kann.“

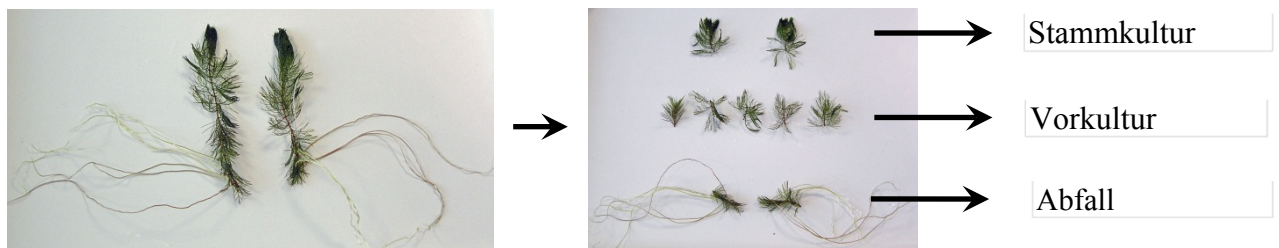
Da das modifizierte Andrews-Medium Saccharose enthält (die das Wachstum von Pilzen und Bakterien anregt), müssen bei sämtlichen Materialien, Lösungen und Kultivierungsvorgängen sterile Bedingungen gegeben sein. Alle Flüssigkeiten und Geräte werden vor dem Gebrauch sterilisiert. Die Sterilisation wird durch Behandlung mit erhitzter Luft (210 °C) über einen Zeitraum von 4 Stunden oder durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121 °C durchgeführt. Darüber hinaus werden alle Flaschen, Gefäße, Schalen usw. sowie sonstige Geräte unmittelbar vor der Verwendung einer Flammbehandlung auf einem sterilen Arbeitstisch unterzogen.

Die Stammkulturen können über längere Zeiträume bei verringerter Beleuchtung und niedrigeren Temperaturen ( $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $20 \pm 2 \text{ °C}$ ) gebrauchsfähig gelagert werden. Das Myriophyllum-Nährmedium sollte identisch mit dem für die Tests verwendeten Nährmedium sein; für Stammkulturen können jedoch auch andere nährstoffreiche Medien verwendet werden.

Die Pflanzensegmente werden axenisch auf mehrere 500 ml-Erlenmeyer- und/oder 2000 ml-Fernbach-Kolben, die jeweils mit ca. 450 bzw. 1000 ml modifiziertem Andrews-Medium befüllt sind, verteilt. Dann werden die Kolben axenisch mit einem Cellulosestopfen verschlossen.

Darüber hinaus müssen die Geräte unmittelbar vor dem Gebrauch unbedingt einer sorgfältigen Flammbehandlung auf einem sterilen Arbeitstisch unterzogen werden. Je nach Anzahl und Größe werden die Pflanzen ungefähr alle drei Wochen in frische Nährlösung umgesetzt.

Für diese erneuerte Kultur können Spitzen sowie Segmente aus der Stängelmitte verwendet werden. Anzahl und Größe der umgesetzten Pflanzen (oder Pflanzensegmente) sind davon abhängig, wie viele Pflanzen benötigt werden. Beispielsweise können fünf Sprosssegmente in einen Fernbach-Kolben und drei Sprosssegmente in einen Erlenmeyer-Kolben, jeweils mit einer Länge von 5 cm, umgesetzt werden. Verwurzelte, blühende, abgestorbene oder anderweitig auffällige Teile sollten verworfen werden.



**Abbildung 1:** Schneiden der Pflanzen für die Stamm- und Vorkultur nach 3 Wochen Kultivierung.

Die Pflanzen werden in 500 ml-Erlenmeyer- und 2000 ml-Fernbach-Kolben in einem Kühlkubator bei  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  mit kontinuierlicher Beleuchtung bei  $100\text{-}150 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  oder 6000-9000 Lux (abgestrahlt durch die Kammerbeleuchtung mit der Farbtemperatur „warmweiß“) kultiviert.



**Abbildung 2:** Kultivierung der Pflanzen in einem Kühlkubator mit Kammerbeleuchtung.

Bei den Prüfungen werden chemisch reine (mit Säure gereinigte) und sterile gläserne Kulturgefäße verwendet, die keimfrei zu handhaben sind. Ist die Stammkultur z. B. durch Algen, Pilze und/oder Bakterien verunreinigt, sollte eine neue Kultur zubereitet oder eine Stammkultur aus einem anderen Labor für die Erneuerung der einen Kultur verwendet werden.

#### Anlage 4

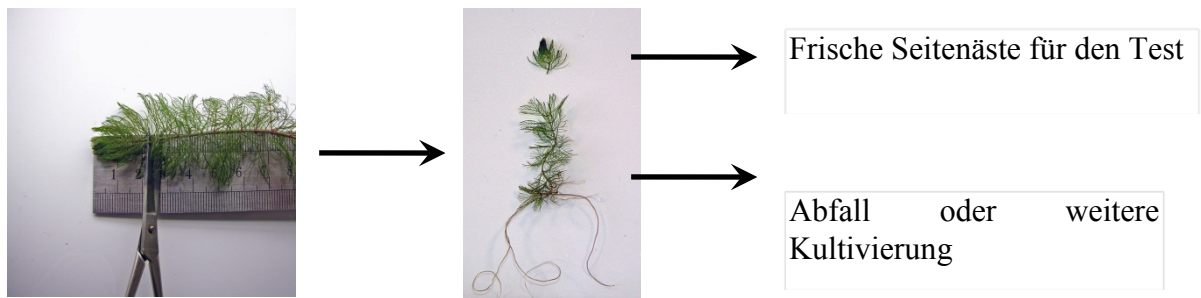
### **HALTUNG DER VORKULTUR UND VORBEREITUNG DES TESTORGANISMUS FÜR DEN TEST**

Zur Herstellung der Vorkultur werden die Sprosse der Stammkultur in Segmente mit jeweils zwei Wirteln geschnitten; die Segmente werden in Fernbach-Kolben, die mit modifiziertem Andrews-Medium (mit 3 % Saccharose) befüllt sind, eingesetzt. Jeder Kolben kann bis zu 50 Sprosssegmente enthalten. Allerdings muss darauf geachtet werden, dass die Segmente vital sind und weder Wurzeln noch Seitenäste oder Astknospen aufweisen (siehe Abbildung 1 in Anlage 3).

Die Vorkulturorganismen werden 14-21 Tage unter sterilen Bedingungen in einer Klimakammer mit einem Hell-/Dunkel-Zyklus von 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit kultiviert. Die Lichtintensität liegt im Bereich von 100-150  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Temperatur der Prüfgefäße beträgt  $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Da das modifizierte Andrews-Medium Saccharose enthält (die das Wachstum von Algen, Pilzen und Bakterien anregt), sollten die Zubereitung der Prüfchemikalienlösungen und die Kultivierung unter sterilen Bedingungen erfolgen. Alle Flüssigkeiten und Geräte werden vor dem Gebrauch sterilisiert. Die Sterilisation wird durch Behandlung mit erhitzter Luft ( $210 \text{ }^\circ\text{C}$ ) über einen Zeitraum von 4 Stunden oder durch 20-minütiges Autoklavieren bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Darüber hinaus werden alle Flaschen, Gefäße, Schalen usw. sowie sonstige Geräte unmittelbar vor der Verwendung einer Flammbehandlung auf einem sterilen Arbeitstisch unterzogen.

Die Sprosse werden axenisch aus den Vorkulturkolben entfernt, wobei möglichst homogenes Material ausgesucht wird. Für jede Prüfung werden mindestens 60 Testorganismen benötigt (Prüfung mit acht Prüfchemikalienkonzentrationen). Für die Prüfung werden frische Seitenäste aus den Vorkulturen entnommen, auf 2,5 cm ab Stängel gekürzt (mit Lineal gemessen) und in ein Becherglas mit sterilem modifiziertem Andrews-Medium eingesetzt. Diese frischen Seitenäste können für den sedimentfreien Myriophyllum spicatum-Toxizitätstest verwendet werden.



**Abbildung 2:** Schneiden der Pflanzen aus der Vorkultur für den sedimentfreien *Myriophyllum spicatum*-Toxizitätstest.

## C.51 *Myriophyllum spicatum*-Toxizitätstest im Wassersediment

### EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 239 (2014). Es sind Prüfmethode für Lemna-Arten (schwebende, einkeimblättrige Wasserpflanze) (1) und Algenarten (2) verfügbar. Diese Methoden werden routinemäßig für die Gewinnung von Daten in Bezug auf die Gefährdung von Nichtziel-Wasserpflanzenarten durch Prüfchemikalien, insbesondere herbizidaktive Chemikalien, verwendet. Jedoch sind in einigen Fällen eventuell Daten für weitere Wasserpflanzenarten erforderlich. In neueren Leitlinien, die im Rahmen des Workshops „Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides“ (AMRAP) der Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) veröffentlicht wurden, wird darauf hingewiesen, dass u. U. Daten für eine bewurzelte Wasserpflanzenart für Prüfchemikalien benötigt werden, sofern Lemna und Algen bekanntermaßen unempfindlich gegenüber der Wirkungsweise sind oder wenn eine Verteilung im Sediment befürchtet wird, was zu einer Exposition durch Aufnahme über die Wurzel führt (3). Auf der Grundlage der gegenwärtigen Erkenntnisse und Erfahrung wurde *Myriophyllum* spp. als bevorzugte Art für solche Fälle ausgewählt, in denen Daten für eine submerse, bewurzelte zweikeimblättrige Art benötigt werden (4) (5) (6). Diese Prüfung stellt keinen Ersatz für andere aquatische Toxizitätstests dar, sondern sollte als Ergänzung solcher Tests verwendet werden, sodass eine umfassendere Gefahren- und Risikobewertung im Hinblick auf Wasserpflanzen möglich ist. Der *Myriophyllum spicatum*-Toxizitätstest im Wassersediment ergänzt den sedimentfreien *Myriophyllum spicatum*-Toxizitätstest (7).
2. In diesem Dokument wird eine Prüfmethode beschrieben, mit der die Wirkungen einer Prüfchemikalie auf die bewurzelte Wasserpflanzenart *Myriophyllum spicatum*, die in einem Wassersedimentsystem wächst, bewertet werden können. Die Prüfmethode basiert teilweise auf vorhandenen Methoden (1) (2) (8) und berücksichtigt die aktuellen Forschungsarbeiten zur Risikobewertung für Wasserpflanzen (3). Die Methode im Wassersediment wurde durch einen internationalen Ringtest validiert, der unter statischen Bedingungen an *Myriophyllum*-Arten durchgeführt wurde, die der Prüfchemikalie durch Applikationen über die Wassersäule ausgesetzt wurden (9). Jedoch lässt sich das Testsystem problemlos anpassen, um die Exposition über gespiktes Sediment oder über die Wasserphase in semistatischen oder auf Impulsdosierung basierenden Szenarios zu ermöglichen, obwohl diese Szenarios keinem formalen Ringtest unterzogen wurden. Darüber hinaus kann die allgemeine Methode für andere bewurzelte, submerse oder emerse Arten, einschließlich anderer *Myriophyllum*-Arten (z. B. *Myriophyllum*

aquaticum und *Glyceria maxima*), verwendet werden (10). Bei solchen alternativen Arten sind u. U. Änderungen der Prüfbedingungen, des Versuchsplans und der Dauer notwendig. Insbesondere sind weitere Arbeiten erforderlich, um geeignete Verfahren für *Myriophyllum aquaticum* zu definieren. Auf diese Optionen wird in dieser Prüfmethode, in der der Standardansatz für die Exposition von *Myriophyllum spicatum* in einem statischen System über die Wasserphase beschrieben wird, nicht näher eingegangen.

3. Diese Prüfmethode gilt für Stoffe, bei denen die Prüfmethode validiert wurde (siehe Ringtest-Bericht (9)), oder für Formulierungen oder bekannte Gemische. Ein *Myriophyllum*-Test kann durchgeführt werden, um eine Anforderung hinsichtlich Tier-1-Daten, die durch eine potenzielle Verteilung der Prüfchemikalie im Sediment oder Probleme mit Wirkungsweise/Selektivität ausgelöst wurde, zu erfüllen. Ebenso ist möglicherweise ein laborbasierter *Myriophyllum*-Test im Rahmen einer höherstufigen Strategie erforderlich, um Bedenken wegen des Risikos für Wasserpflanzen auszuräumen. Der Expositionspfad (d. h. über Wasser oder Sediment) wird durch den spezifischen Grund für die Durchführung eines Tests bestimmt. Bevor diese Prüfmethode für die Prüfung eines Gemischs zu gesetzgeberischen Zwecken eingesetzt wird, sollte geprüft werden, ob, und falls ja, warum, sie für diesen Zweck geeignete Ergebnisse liefert. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs von Rechts wegen vorgeschrieben ist.

## **PRINZIP DER PRÜFMETHODE**

4. Der Test wird zur Bewertung der durch die Chemikalie bedingten Auswirkungen auf das vegetative Wachstum von *Myriophyllum*-Pflanzen, die in standardisierten Medien (Wasser, Sediment und Nährstoffe) wachsen, verwendet. Zu diesem Zweck werden Sprossspitzen von gesunden, nicht blühenden Pflanzen in standardisiertes, künstliches Sediment, das mit zusätzlichen Nährstoffen angereichert wird, um ein angemessenes Pflanzenwachstum sicherzustellen, eingesetzt und in Smart & Barko-Medium gehalten (Anlage 1). Nach einem Etablierungszeitraum, in dem sich Wurzeln bilden können, werden die Pflanzen einer Reihe von Testkonzentrationen, die der Wassersäule zugesetzt werden, ausgesetzt. Alternativ kann die Exposition über das Sediment durch Dotierung des künstlichen Sediments mit der Prüfchemikalie und Einsetzen der Pflanzen in dieses gespikte Sediment simuliert werden. In beiden Fällen werden die Pflanzen anschließend 14 Tage unter kontrollierten Umgebungsbedingungen gehalten. Die Auswirkungen auf das Wachstum werden anhand von quantitativen Bewertungen der Sprosslänge, der Frischmasse und der Trockenmasse sowie qualitativen Beobachtungen von Symptomen wie z. B. Chlorose, Nekrose oder Fehlwachstum ermittelt.

5. Um die durch die Chemikalie bedingten Wirkungen zu quantifizieren, wird das Wachstum in den Testlösungen mit dem Wachstum der Kontrollpflanzen verglichen. Ferner wird die Konzentration, die eine festgelegte Wachstumshemmung von x % hervorruft, bestimmt und als  $EC_x$  ausgedrückt; „x“ kann ein beliebiger Wert je nach regulatorischen Anforderungen sein, z. B.  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$  und  $EC_{50}$ . Es ist zu beachten, dass Schätzungen der  $EC_{10}$ - und  $EC_{20}$ -Werte nur in Tests zuverlässig und angemessen sind, bei denen die für die Kontrollpflanzen bestimmten Variationskoeffizienten unter dem zu schätzenden Wirkungsniveau liegen, d. h. die Variationskoeffizienten sollten für die zuverlässige Schätzung eines  $EC_{20}$ -Werts  $< 20\%$  sein.
6. Sowohl die durchschnittliche Wachstumsrate (geschätzt aus Bewertungen der Sprosslänge, der Sprossfrischmasse und der Sprosstrockenmasse) als auch der Zellertrag (geschätzt aus der Zunahme der Sprosslänge, der Sprossfrischmasse und der Sprosstrockenmasse) der unbehandelten und behandelten Pflanzen sollten bestimmt werden. Anhand der spezifischen Wachstumsrate ( $r$ ) und des Zellertrags ( $y$ ) werden anschließend  $E_rC_x$  (z. B.  $E_rC_{10}$ ,  $E_rC_{20}$ ,  $E_rC_{50}$ ) bzw.  $E_yC_x$  (z. B.  $E_yC_{10}$ ,  $E_yC_{20}$ ,  $E_yC_{50}$ ) bestimmt.
7. Falls erforderlich, können die niedrigste Konzentration mit beobachteter Wirkung (LOEC) und die höchste geprüfte Konzentration ohne beobachtete Wirkung (NOEC) statistisch anhand von Schätzungen der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten und des Zellertrags bestimmt werden.

## ANGABEN ZUR PRÜFCHEMIKALIE

8. Es sollte eine Analysemethode mit geeigneter Empfindlichkeit für die Quantifizierung der im Prüfmedium enthaltenen Chemikalien verfügbar sein.
9. Zur Festlegung der Testbedingungen hilfreiche Informationen zur Prüfchemikalie sind die Strukturformel, die Zusammensetzung im Falle von mehrkomponentigen Stoffen, UVCB-Stoffen, Gemischen oder Formulierungen, die Reinheit, die Wasserlöslichkeit, die Stabilität in Wasser, die Lichtbeständigkeit, die Säuredissoziationskonstante ( $pK_a$ ), der Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ( $K_{ow}$ ), falls verfügbar  $K_d$  für Sedimente, der Dampfdruck und die biologische Abbaubarkeit. Aus der Wasserlöslichkeit und dem Dampfdruck kann die Henry-Konstante berechnet werden, aus der zu entnehmen ist, ob während der Testdauer erhebliche Verluste der Prüfchemikalie zu erwarten sind. Wenn Verluste der Prüfchemikalien wahrscheinlich sind, sollten die Verluste quantifiziert und die nachfolgenden Schritte zur Eindämmung solcher Verluste dokumentiert werden. Wenn zur Löslichkeit und zur Stabilität der Prüfchemikalie(n) keine zuverlässigen Informationen vorliegen, sollten diese Merkmale unter den Testbedingungen (Nährmedium, Temperatur und Beleuchtung) untersucht werden. *Hinweis:* Bei der



Prüfung von lichtabhängigen peroxidierenden Herbiziden sollte die verwendete Laborbeleuchtung das gleiche UV-Licht enthalten, das auch in natürlichem Sonnenlicht zu finden ist.

10. Der pH-Wert sollte gemessen und gegebenenfalls im Prüfmedium angepasst werden. Der Einhaltung des pH-Wertes des Prüfmediums kommt besondere Bedeutung zu, z. B. beim Testen von Metallen oder hydrolytisch instabilen Chemikalien. Weitere Hinweise zur Prüfung von Chemikalien mit physikalisch-chemischen Merkmalen, welche die Durchführung des Tests erschweren, sind dem *OECD Guidance Document* (11) zu entnehmen.

## **VALIDITÄT DES TESTS**

11. Die Testergebnisse sind gültig, wenn die mittlere Gesamtsprosslänge und die mittlere Gesamtsprossfrischmasse der Kontrollpflanzen sich während der Expositionsphase des Tests mindestens verdoppeln. Darüber hinaus dürfen die Kontrollpflanzen keine sichtbaren Anzeichen von Chlorose zeigen und sollten optisch frei von Verunreinigung durch andere Organismen wie z. B. Algen und/oder bakterielle Filme auf den Pflanzen, auf der Sedimentoberfläche und im Prüfmedium sein.
12. Der mittlere Variationskoeffizient für den Zellertrag basierend auf Messungen der Sprossfrischmasse (d. h. von Testbeginn bis Testende) bei den Kontrollkulturen beträgt maximal 35 % zwischen Replikaten.

## **REFERENZCHEMIKALIE**

13. Um das Prüfverfahren im Zeitverlauf zu testen, sollten Referenzchemikalien wie z. B. das im Ringtest (9) verwendete 3,5-Dichlorphenol in regelmäßigen Abständen geprüft werden. Die Daten aus dem Ringtest deuten darauf hin, dass die mittleren  $EC_{50}$ -Werte von 3,5-Dichlorphenol für die verschiedenen Reaktionsvariablen zwischen 4,7 mg/l und 6,1 mg/l liegen (siehe Ringtest-Bericht bezüglich des Konfidenzintervalls für diese Werte). Die Referenzchemikalien sollten mindestens zweimal jährlich bzw. – wenn die Tests seltener durchgeführt werden – gleichzeitig mit den definitiven Toxizitätstests getestet werden. Eine Leitlinie für die erwarteten  $EC_{50}$ -Werte von 3,5-Dichlorphenol ist dem statistischen Bericht des internationalen Ringtests (9) zu entnehmen.

## **BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE**

### **Apparatur**

14. Der Test sollte unter kontrollierten Umgebungsbedingungen durchgeführt werden, d. h. in einer Wachstumskammer, einem Wachstumsraum oder einem Labor mit regelbarer Tageslänge, Beleuchtung und Temperatur (siehe Abschnitt „Prüfbedingungen“ Nrn. 56-58). Die Stammkulturen sollten getrennt von den Prüfgefäßen gehalten werden.
15. Der Versuch sollte unter Verwendung von Prüfgefäßen aus Glas wie z. B. Aquarien oder Kolben durchgeführt werden; in der Regel werden 2 l-Glaskolben (ca. 24 cm Höhe und 11 cm Durchmesser) verwendet. Jedoch können andere (d. h. größere) Gefäße geeignet sein, sofern eine ausreichende Wassertiefe vorhanden ist, um ein unbegrenztes Wachstum zu ermöglichen und die Pflanzen während der Testdauer unter Wasser zu halten.
16. Pflanztöpfe aus Kunststoff oder Glas (ca. 9 cm Durchmesser, 8 cm Höhe und 500 ml Volumen) können als Behältnisse für das Einsetzen der Pflanzen in das Sediment verwendet werden. Alternativ können Glaskolben verwendet werden, die in einigen Fällen auch bevorzugt werden (z. B. Prüfen von hydrophoben Chemikalien oder Chemikalien mit hohem  $K_{ow}$ -Wert).
17. Neben der Wahl der Prüfgefäße und des bevorzugten Versuchsplans (siehe unten) muss die Wahl der Topf-/Kolbengröße ebenfalls berücksichtigt werden. Bei Verwendung von Versuchsplan A (ein Spross pro Topf und drei Töpfe pro Gefäß) werden möglicherweise kleinere Töpfe oder größere Gefäße benötigt. Bei Verwendung von Versuchsplan B (drei Sprosse pro Topf und ein Topf pro Gefäß) sollten die angegebenen Topf- und Gefäßgrößen angemessen sein. In allen Fällen sollte die Überstandswassertiefe mindestens 12 cm über der Sedimentoberfläche betragen. Das Verhältnis zwischen Sediment- und Wasseroberfläche sowie das Verhältnis zwischen Sediment- und Wasservolumen sollten protokolliert werden.

### **Testorganismus**

18. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen allgemeinen Ansätze können zum Prüfen verschiedener Wasserpflanzenarten verwendet werden. Jedoch sind die in dieser Prüfmethode angegebenen Bedingungen auf die Prüfung des *Myriophyllum spicatum* zugeschnitten. Diese Art gehört der Familie der Tausendblattgewächse (Haloragaceae) an.
19. *Myriophyllum spicatum* (Ähriges Tausendblatt) ist eine submerse, bewurzelte Art, die ein breites Spektrum an Bedingungen toleriert und in stehenden und fließenden Gewässern anzutreffen ist. *M. spicatum* ist eine mehrjährige Pflanze, die im Winter bis auf die Wurzeln zurückgeht. Die Pflanzen blühen in der Regel und setzen frei Samen ab. Jedoch ist die vegetative Vermehrung von Achselknospen oder Stängelfragmenten, die sich auf natürliche Weise oder nach Störung ablösen, oftmals die primäre Kolonisierungsmethode.

### *Kultivierung des Testorganismus*

20. Die Pflanzen können aus natürlichen Populationen gewonnen oder über Lieferanten von Wasserpflanzen bezogen werden. In beiden Fällen sollte die Herkunft der Pflanzen dokumentiert und die Art überprüft werden. Bei der Entnahme von *Myriophyllum spicatum* aus der Natur, insbesondere in Regionen, wo es zu Hybridisierungen mit anderen *Myriophyllum*-Arten kommen könnte, sollte unbedingt sichergestellt werden, dass die richtige Art entnommen wird. Im Zweifelsfall wird die Verwendung von überprüften Laborkulturen aus bekannten Quellen empfohlen. Pflanzen, die chemischen Verunreinigungen ausgesetzt waren oder an bekanntermaßen verunreinigten Orten entnommen wurden, sollten in diesem Test nicht verwendet werden.
21. In Regionen, in denen *M. spicatum* in den Wintermonaten schwer zu beschaffen ist, kann die langfristige Haltung von Stammkulturen unter Treibhaus- oder Laborbedingungen notwendig sein. Die Stammkulturen sollten unter ähnlichen Bedingungen wie die Prüfbedingungen gehalten werden, obwohl Bestrahlungsstärke und Temperatur verringert werden können, um den Kultivierungsaufwand zu reduzieren (z. B. wenn über einen bestimmten Zeitraum keine Tests mit *Myriophyllum* vorgesehen sind). Um Raum für die Ausbreitung zu schaffen, sollten größere Aquarien und Pflanztöpfe als bei den Prüfungen verwendet werden. Die Zusammensetzung des Sediments und der Wassermedien wäre identisch mit derjenigen bei den Prüfungen, obwohl alternative Methode der Sedimentdüngung angewandt werden können (z. B. Verwendung von kommerziellen Langzeitdüngerformulierungen).
22. Die Stammpflanzen sollten frei von sichtbaren Verunreinigung durch andere Organismen, einschließlich Schnecken, Fadenalgen, Pilzen und Insekten, z. B. Eier oder Larven des Schmetterlings *Paraponyx stratiotata* sowie Larven oder adulte Tiere des Zünslers *Eubrychius velutus*, sein. Zum Beseitigen einer sichtbaren Verunreinigung muss das Pflanzenmaterial eventuell in Frischwasser gespült werden. Darüber hinaus sollte die Verunreinigung durch einzellige Algen und Bakterien auf ein Minimum reduziert werden, obwohl eine vollständige Sterilität des Pflanzenmaterials nicht notwendig ist. Die Stammkulturen sollten überwacht und gegebenenfalls umgesetzt werden, um eine Verunreinigung durch Algen und Bakterien zu vermeiden. Die Belüftung der Stammkulturen kann von Vorteil sein, falls eine Verunreinigung durch Algen oder Bakterien zum Problem werden sollte.
23. In allen Fällen werden die Pflanzen unter ähnlichen, jedoch nicht unbedingt identischen Bedingungen wie die Prüfbedingungen über einen angemessenen Zeitraum (d. h. > 2 Wochen) vor ihrer Verwendung in dem Test kultiviert/akklimatisiert.
24. Blühende Stammkulturen sollten in einem Test nicht verwendet werden, da die vegetativen Wachstumsraten während und nach der Blüte allgemein sinken.

## Sediment

25. Für diesen Test wird das folgende formulierte Sediment, das auf dem in Kapitel C.28 dieses Anhangs (8) verwendeten künstlichen Sediment basiert, empfohlen. Das Sediment wird wie für Prüfmethode C.28 beschrieben zubereitet, außer dass die nachfolgend beschriebenen Nährstoffe zugegeben werden:
- a) 4-5 % Torf (bezogen auf die Trockenmasse, entsprechend  $2 \pm 0,5$  % organischem Kohlenstoff), möglichst mit einem pH-Wert von 5,5-6,0. Wichtig ist, dass der Torf in Pulverform, fein gemahlen (bevorzugte Partikelgröße  $\leq 1$  mm) und ausschließlich luftgetrocknet verwendet wird.
  - b) 20 % (bezogen auf die Trockenmasse) Kaolin-Ton (Kaolingegehalt vorzugsweise über 30 %).
  - c) 75-76 % (bezogen auf die Trockenmasse) Quarzsand (hauptsächlich Feinsand mit mehr als 50 % Partikeln mit einer Größe von 50 bis 200  $\mu\text{m}$ ).
  - d) Es wird ein wässriges Nährmedium zugegeben, sodass die endgültige Sediment-Charge 200 mg/kg Trockensediment aus Ammoniumchlorid und Natriumphosphat enthält und der Feuchtigkeitsgehalt des endgültigen Gemischs im Bereich von 30-50 % liegt.
  - e) Chemisch reines Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) wird zugegeben, um den pH-Wert des fertigen Sedimentgemischs auf  $7,0 \pm 0,5$  einzustellen.
26. Die Herkunft von Torf, Kaolin-Ton und Sand sollte bekannt sein und dokumentiert werden. Ist die Herkunft unbekannt oder bedenklich, sollten die betreffenden Komponenten auf Nichtvorhandensein von chemischen Verunreinigungen (z. B. Schwermetalle, chlororganische Verbindungen, phosphororganische Verbindungen) überprüft werden.
27. Die trockenen Komponenten des Sediments sollten homogen gemischt werden, bevor die wässrige Nährlösung unter das Sediment gemischt wird. Das feuchte Sediment sollte mindestens zwei Tage vor der Verwendung vorbereitet werden, damit der Torf gut durchweichen kann und um zu verhindern, dass hydrophobe Torfpartikel an die Oberfläche treiben, wenn das Sediment mit den Medien überdeckt wird. Vor der Verwendung kann das feuchte Sediment im Dunkeln gelagert werden.
28. Für den Test wird das Sediment in Behältnisse von geeigneter Größe umgesetzt, wie z. B. Pflanztöpfe mit einem Durchmesser, der in die Glasgefäße passt (die Sedimentoberfläche sollte mindestens ca. 70 % der Gefäßoberfläche abdecken). In Fällen, in denen der Boden des Behältnisses Löcher aufweist, kann durch Abdecken des Bodens mit Filterpapier das Sediment im Behältnis zurückgehalten werden. Die Töpfe werden so mit dem Sediment befüllt, dass die Sedimentoberfläche eben ist, bevor sie mit einer dünnen Schicht ( $\sim 2$ -

3 mm) eines inerten Materials wie z. B. Sand, feinem Gartensand (oder gemahlene Korallen) abgedeckt wird, um das Sediment an Ort und Stelle zu halten.

### **Prüfmedium**

29. Für die Kultivierung und Prüfung von *Myriophyllum spicatum* wird Smart & Barko-Medium (12) empfohlen. Die Zubereitung dieses Mediums wird in Anlage 1 beschrieben. Der pH-Wert der Medien (Wasserphase) sollte zu Beginn der Prüfung für ein optimales Pflanzenwachstum zwischen 7,5 und 8,0 liegen.

### **Versuchsplan**

30. Die Prüfung sollte mindestens sechs Replikat-Prüfgefäße für die unbehandelte Kontrolle und jeweils mindestens vier Replikat-Prüfgefäße für mindestens fünf Konzentrationsstufen umfassen.
31. Wenn die NOEC nicht bestimmt werden muss, kann das Prüfprotokoll geändert werden, indem die Anzahl der Konzentrationen erhöht und die Anzahl der Replikate verringert wird.
32. Jedes Prüfgefäß entspricht einem Replikat mit drei Sprossen. Für die Kultivierung der drei Sprosse in jedem Prüfgefäß gibt es zwei Optionen:
  - Versuchsplan A: 1 Spross je Topf und 3 Töpfe pro Gefäß.
  - Versuchsplan B: 3 Sprosse je Topf und 1 Topf pro Gefäß.
  - Alternative Versuchspläne, die einen Spross pro Topf pro Gefäß vorsehen, sind unter der Voraussetzung akzeptabel, dass die Wiederholung entsprechend angepasst wird, sodass die erforderlichen Validitätskriterien erfüllt sind.
33. Die einzelnen Prüfgefäße sollten den Behandlungsgruppen randomisiert zugeordnet werden. Die Prüfgefäße müssen randomisiert im Prüfraum angeordnet werden, um die Auswirkungen räumlich unterschiedlicher Lichtintensitäten und Temperaturen zu minimieren.

### **Prüfchemikalienkonzentrationen und Kontrollgruppen**

34. Die Konzentrationen sollten normalerweise einer geometrischen Reihe folgen; die Testkonzentrationen sollten sich um einen Faktor von höchstens 3,2 unterscheiden. Die vorherige Kenntnis der Toxizität der Prüfchemikalie aufgrund eines Dosisfindungsversuchs erleichtert die Auswahl geeigneter Testkonzentrationen.

35. Um ein angemessenes Konfidenzintervall sicherzustellen, müssen bei der Bestimmung eines  $EC_x$ -Wertes die Testkonzentrationen so gewählt werden, dass der  $EC_x$ -Wert eingeschlossen ist. Bei der Ermittlung von  $EC_{50}$  beispielsweise muss die höchste Testkonzentration größer als der  $EC_{50}$ -Wert sein. Wenn der  $EC_{50}$ -Wert außerhalb des Testkonzentrationsbereichs liegt, sind die entsprechenden Konfidenzintervalle groß, und das verwendete statistische Modell ist eventuell nicht geeignet. Die Verwendung weiterer Testkonzentrationen führt zu einem engeren Konfidenzintervall um den resultierenden  $EC_x$ -Wert.
36. Zur Bestimmung der LOEC/NOEC-Werte (optionaler Endpunkt) sollte die niedrigste Testkonzentration so gering sein, dass das Wachstum nicht stark von dem Wachstum bei den Kontrollpflanzen abweicht. Außerdem muss die höchste Testkonzentration so hoch sein, dass das Wachstum signifikant geringer ist als das Wachstum der Kontrollgruppe. Bei Verwendung von mehr Replikaten steigt die statistische Aussagekraft des NOEC/ANOVA-Plans.

### **Limit-Test**

37. Wenn ein Dosisfindungstest darauf hindeutet, dass die Prüfchemikalie bei Konzentrationen bis zu 100 mg/l bzw. bis zur Grenze der Löslichkeit im Prüfmedium oder im Falle einer Formulierung bis zur Dispersibilitätsgrenze keine schädigende Wirkung hat, kann ein Limit-Test durchgeführt werden, in dem die Reaktionen einer Kontrollgruppe und einer Behandlungsgruppe (100 mg/l bzw. eine mit der Löslichkeitsgrenze identische Konzentration oder 1000 mg/kg Trockensediment) verglichen werden. Dieser Test sollte den allgemeinen Grundsätzen eines standardmäßigen Dosis-Wirkungs-Tests folgen, jedoch mit der Ausnahme, dass eine Erhöhung der Mindestanzahl an Replikaten auf sechs Prüfgefäße pro Kontrolle und Konzentration empfohlen wird. Das Wachstum der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe kann mit einem statistischen Test zum Vergleich der Mittelwerte analysiert werden (z. B. mit einem Student-t-Test).

### **Testlösungen**

38. Die Testlösungen werden gewöhnlich durch Verdünnung einer Stammlösung hergestellt, die durch Lösung oder Dispergierung der Prüfchemikalie in Smart & Barko-Medium unter Verwendung von entmineralisiertem (d. h. destilliertem oder entionisiertem) Wasser hergestellt wird (siehe Anlage 1).
39. Die höchste Testkonzentration sollte in der Regel die Wasserlöslichkeit der Prüfchemikalie oder im Falle von Formulierungen die Dispersibilität bei den jeweiligen Testbedingungen nicht überschreiten.

40. Bei Prüfchemikalien mit geringerer Wasserlöslichkeit muss unter Umständen mit einem organischen Lösungsmittel oder einem Dispergiermittel eine konzentrierte Stammlösung oder eine Dispersion der Chemikalie hergestellt werden, damit die exakten Mengen der Prüfchemikalie zum Prüfmedium leichter hinzugegeben werden können und die Dispergierung und die Auflösung der Chemikalie begünstigt wird. Die Verwendung solcher Lösungs- oder Dispergiermittel sollte unbedingt vermieden werden. Durch die Verwendung von Lösungs- oder Dispergiermitteln sollte keine Phytotoxizität entstehen. Häufig verwendete Lösungsmittel, die bei Konzentrationen bis zu 100 µl/l keine phytotoxische Wirkung haben, sind z. B. Aceton und Dimethylformamid. Wenn ein Lösungsmittel oder ein Dispergiermittel verwendet wird, muss die Endkonzentration protokolliert und auf ein Minimum ( $\leq 100 \mu\text{l/l}$ ) beschränkt werden. Unter diesen Umständen müssen alle behandelten Proben und die Kontrollproben das Lösungsmittel bzw. das Dispergiermittel in derselben Konzentration enthalten. Unbehandelte Kontrollreplikate, die kein Lösungs- oder Dispergiermittel enthalten, werden ebenfalls in den Versuchsplan eingeschlossen. Weitere Informationen zur Verwendung von Dispergiermitteln sind einem *OECD Guidance Document* (11) zu entnehmen.

## **TESTVERFAHREN**

41. Das Testverfahren variiert je nach Applikationsweg der Prüfchemikalie (d. h. über die Wasser- oder Sedimentphase). Das wahrscheinliche Verhalten der Prüfchemikalie in einem Wasser-Sediment-System sollte bei der Wahl der in der Prüfung verwendeten Expositionscharakteristik (d. h. statisch oder statisch mit Erneuerung, gespiktes Wasser oder gespiktes Sediment) berücksichtigt werden. Bei Chemikalien, die sich voraussichtlich stark im Sediment verteilen, sind in einigen Fällen Prüfungen mit gespiktem Sediment vorzuziehen.

### **Etablierungsphase**

42. Von den Kulturpflanzen werden gesunde Sprossspitzen, d. h. ohne Seitensprosse, abgeschnitten, sodass man eine Sprosslänge von 6 cm ( $\pm 1$  cm) erhält. Bei Versuchsplan A (ein Spross pro Topf und drei Töpfe pro Gefäß) werden einzelne Sprossspitzen in jeden Topf eingepflanzt. Bei Versuchsplan B (drei Sprosse pro Topf und ein Topf pro Gefäß) werden vier bis fünf Sprossspitzen in jeden Topf mit Sediment eingepflanzt.

43. In beiden Fällen sollten zusätzliche Töpfe bepflanzt werden, damit zu Beginn der Prüfung einheitliche Pflanzen ausgewählt werden können und damit Ersatzpflanzen vorhanden sind, an denen das Wurzelwachstum unmittelbar vor der Behandlung überprüft werden

kann. Diese Ersatzpflanzen sollten zudem für Biomasse- und Längenmessungen an Sprossen an Tag 0 verwendet werden.

44. Die Sprosse werden so eingesetzt, dass sich ca. 3 cm, wobei mindestens zwei Knoten abgedeckt sind, unter der Sedimentoberfläche befinden.
45. Die Töpfe werden dann unter den gleichen Expositionsbedingungen wie in der Expositionsphase in die Prüfgefäße umgesetzt und sieben Tage in Smart & Barko-Medium gehalten, um Wurzelbildung hervorzurufen.
46. Nach dieser Zeit sollten mehrere Pflanzen in Ersatztöpfen entfernt werden, um das Wurzelwachstum zu überprüfen. Ist kein Wurzelwachstum erkennbar (d. h. sind keine Wurzelspitzen sichtbar), sollte die Etablierungsphase verlängert werden, bis Wurzelwachstum festzustellen ist. Mit diesem Schritt soll sichergestellt werden, dass die Pflanzen zum Zeitpunkt des Testbeginns aktiv wachsen.

#### **Auswahl von einheitlichem Pflanzenmaterial**

47. Bei Versuchsplan A (ein Spross pro Topf und drei Töpfe pro Gefäß) werden die Töpfe vor Testbeginn nach Einheitlichkeit ausgesucht. Bei Versuchsplan B (drei Sprosse pro Topf und ein Topf pro Gefäß) werden überschüssige Pflanzen entfernt, sodass drei Pflanzen, die in Größe und Aussehen einheitlich sind, übrig bleiben.

#### **Exposition über die Wasserphase**

48. Die nach Einheitlichkeit ausgesuchten Töpfe werden entsprechend den Anforderungen des Versuchsplans in die Prüfgefäße gestellt. Anschließend wird den Prüfgefäßen Smart & Barko-Medium hinzugegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass das Sediment nicht gestört wird. Zu diesem Zweck können die Medien mithilfe eines Trichters hinzugegeben werden oder unter Zuhilfenahme einer Kunststoffscheibe, mit der das Sediment während des Einfüllens des Mediums in die Prüfgefäße abgedeckt wird, sofern die Scheibe unmittelbar danach wieder entfernt wird. Alternativ können die Pflanztöpfe nach Zugabe der Medien in die Prüfgefäße gestellt werden. In beiden Fällen können am Anfang der Expositionsphase gegebenenfalls frische Medien verwendet werden, um die potenzielle Algen- und Bakterienbildung auf ein Minimum zu beschränken und die Vorbereitung einzelner Testlösungschargen für die Replikate zu ermöglichen.
49. Die Sprosslänge über dem Sediment wird entweder vor oder nach Zugabe des Mediums gemessen.
50. Die jeweiligen Mengen der Prüfchemikalie können dem Prüfmedium hinzugefügt werden, bevor dieses in die Prüfgefäße gegeben wird. Alternativ kann die Prüfchemikalie nach dem Hinzugeben in die Prüfgefäße in das Medium gegeben werden. In diesem Fall



sollte sichergestellt werden, dass die Prüfchemikalie innerhalb des Testsystems ohne Störung des Sediments homogen verteilt wird.

51. In allen Fällen wird das Aussehen (z. B. klar, trüb usw.) der Prüfmedien am Anfang der Prüfung protokolliert.

### **Exposition über das Sediment**

52. Gespikte Sedimente der gewählten Konzentration werden durch Zugabe einer Lösung der Prüfchemikalie direkt in frisches Sediment hergestellt. Eine Stammlösung der in entionisiertem Wasser gelösten Prüfchemikalie wird mittels Walzwerk, Mischwerk oder Mischen von Hand mit dem formulierten Sediment gemischt. Falls in Wasser schlecht löslich, kann die Prüfchemikalie in einer möglichst geringen Menge eines geeigneten organischen Lösungsmittels (z. B. Hexan, Aceton oder Chloroform) gelöst werden. Diese Lösung wird dann für ein Prüfgefäß mit ca. 10 g feinem Quarzsand gemischt. Anschließend lässt man das Lösungsmittel verdampfen. Der Sand wird dann mit einer geeigneten Menge an Sediment pro Prüfgefäß gemischt. Zum Lösen, Dispergieren oder Emulgieren der Prüfchemikalie dürfen nur leicht flüchtige Mittel verwendet werden. Es ist zu beachten, dass das Volumen/Gewicht des mit der Prüfchemikalie gespikten Sands bei der endgültigen Herstellung des Sediments berücksichtigt werden muss (d. h. dass das Sediment mit weniger Sand hergestellt werden sollte). Die Prüfchemikalie sollte mit dem Sediment gut durchmischt werden, um eine homogene Verteilung im Sediment zu gewährleisten.
53. Das gespikte Sediment wird in die Töpfe gefüllt (wie oben beschrieben). Die nach Einheitlichkeit und adäquatem Wurzelsystem ausgewählten Pflanzen werden aus den während der Etablierungsphase verwendeten Töpfen genommen und wie oben beschrieben in das gespikte Sediment umgesetzt.
54. Die Töpfe werden entsprechend den Anforderungen des Versuchsplans in die Prüfgefäße gestellt. Anschließend wird Smart & Barko-Medium vorsichtig hinzugegeben (z. B. mithilfe eines Trichters), um eine Störung des Sediments zu vermeiden. Die Sprosslänge über dem Sediment wird entweder vor oder nach dem Hinzugeben der Medien gemessen.

### **Erhaltung der Wasserpegel während der Testdauer**

55. Das endgültige Wasservolumen muss protokolliert und der Wasserpegel an jedem Prüfgefäß markiert werden. Wenn mehr als 10 % Wasser während der Prüfung verdampfen, sollte der Wasserpegel mit destilliertem Wasser aufgefüllt werden. Die Prüfgefäße können gegebenenfalls mit einer transparenten Abdeckung wie z. B. transparenten Kunststoffdeckeln locker bedeckt werden, um die Verdampfung und Verunreinigung mit Algensporen auf ein Minimum zu beschränken.

## **Prüfbedingungen**

56. Durch fluoreszierende Beleuchtung mit warmem und/oder kaltweißem Licht wird eine Bestrahlungsstärke hergestellt, die bei Messung unter photosynthetisch aktiver Strahlung (400-700 nm) an der Wasseroberfläche bei ca.  $140 (\pm 20) \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  liegt. Dabei wird ein Hell-/Dunkel-Zyklus von 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit verwendet. Abweichungen von der gewählten Bestrahlungsstärke dürfen im Testbereich höchstens  $\pm 15 \%$  betragen.
57. Die Temperatur der Prüfgefäße beträgt  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ .
58. Der pH-Wert des Kontrollmediums darf während des Tests höchstens um 1,5 Einheiten ansteigen. Auch bei Abweichungen von mehr als 1,5 Einheiten sind Testergebnisse dann nicht ungültig, wenn nachgewiesen werden kann, dass die oben angegebenen Validitätskriterien erfüllt sind.

## **Testdauer**

59. Die Expositionsdauer beträgt 14 Tage.

## **Messungen und analytische Bestimmungen**

60. Nach der Etablierungsphase und unmittelbar vor der Behandlung (d. h. an Tag 0) werden Ersatzpflanzen aus fünf randomisiert ausgewählten Töpfen bei dem Versuchsplan mit drei Pflanzen je Topf oder 15 Töpfen bei dem Versuchsplan mit einer Pflanze je Topf entnommen, um die Sprosslänge und die Frisch- und Trockenmasse wie nachfolgend beschrieben zu bewerten.
61. Bei Pflanzen, die in der Expositionsphase transferiert werden, werden die in Tabelle 1 angegebenen Bewertungen wie folgt vorgenommen:
  - Die Bewertungen der Haupt sprosslänge, der Anzahl der Seitensprosse und der Seitensprosslänge werden mindestens am Ende der Expositionsphase protokolliert (z. B. an Tag 14).
  - Die optischen Bewertungen der Pflanzengesundheit werden mindestens dreimal während der Expositionsphase protokolliert (z. B. an den Tagen 0, 7 und 14).
  - Die Bewertungen der Sprossfrisch- und -trockenmasse werden am Testende durchgeführt (d. h. an Tag 14).
62. Die Sprosslänge wird mit einem Lineal gemessen. Falls Seitensprosse vorhanden sind, sollten deren Anzahl bestimmt und deren Länge gemessen werden.

63. Die optischen Bewertungen der Pflanzengesundheit werden durch Protokollierung des Aussehens der Pflanzen und des allgemeinen Zustands des Prüfmediums durchgeführt. Folgende Beobachtungen sind zu protokollieren:

- Nekrose, Chlorose oder sonstige Verfärbung wie z. B. übermäßige Rötung im Vergleich zu den Kontrollpflanzen;
- Entwicklung von Verunreinigung durch Bakterien oder Algen;
- Wachstumsanomalien wie z. B. Verkümmern, veränderter Internodienabstand, gekrümmte Sprosse/Blätter, Wucherung der Seitensprosse, Blattverlust, Turgorverlust und Stängelfragmentierung.
- Die optischen Bewertungen der Wurzelgesundheit werden am Testende durchgeführt, indem das Sediment vorsichtig von den Wurzeln abgewaschen wird, damit das Wurzelsystem untersucht werden kann. Folgende Skala wird für die Bewertung im Vergleich zu den Kontrollpflanzen vorgeschlagen:

- 1) keine Wurzeln vorhanden
- 2) wenige Wurzeln vorhanden
- 3) mäßige Wurzelbildung
- 4) sehr gute Wurzelbildung, vergleichbar mit den Kontrollpflanzen

64. Die Bewertungen der Frischmasse werden am Testanfang und -ende durchgeführt, indem der Spross auf Sedimenthöhe abgeschnitten und dann vor dem Wiegen trockengetupft wird. Sedimentpartikel, die unten an der Sprosse haften könnten, sind vorsichtig zu entfernen. Das Sprossmaterial wird dann in einen Trocknungsofen bei 60 °C gelegt und auf ein konstantes Gewicht getrocknet, bevor es erneut gewogen und die Trockenmasse protokolliert wird.

65. Eine Übersicht über die biologischen Bewertungen, die während der Testdauer mindestens durchgeführt werden müssen, ist Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1:** Bewertungsplan

Tag nach Behandlung	<i>Myriophyllum spicatum</i>			
	Sprosslänge,	Optische	Sprossfrisch-	pH

(DAT)	Seitensprosslänge und -anzahl	Bewertung der Sprosse	und -trockenmasse Optische Bewertung der Wurzeln	O <sub>2</sub>
0	A	A	A	A
4	-	-	-	-
7	-	A	-	A
14	A	A	A	A

A : Bewertungen erforderlich  
 - : keine Bewertungen erforderlich

*Häufigkeit der Messungen und der analytischen Bestimmungen*

66. Die Temperatur des Mediums in einem in der Wachstumskammer bzw. im Inkubator oder im jeweiligen Raum unter denselben Bedingungen gehaltenen Zusatzgefäß ist mindestens täglich (oder kontinuierlich mit einem Datenlogger) zu protokollieren.
67. In allen Replikatgefäßen sind der pH-Wert und die Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Prüfmedium am Anfang der Prüfung, mindestens einmal während der Prüfung und am Ende der Prüfung zu messen. Die Messungen sollten jeweils zur selben Tageszeit erfolgen. Wenn bei der Zubereitung aller Replikate bei jeder Testkonzentration Bulklösungen verwendet werden, ist eine einzige Messung jeder Bulklösung an Tag 0 akzeptabel.
68. Die Lichtintensität sollte in der Wachstumskammer, im Inkubator oder im jeweiligen Raum an Punkten gemessen werden, die dem Niveau der Wasseroberfläche entsprechen. Die Messungen sollten mindestens am Anfang der Prüfung oder während der Prüfung vorgenommen werden. Dabei ist zu beachten, dass die Messwerte von der Methode zur Feststellung und zur Messung der Lichtintensität (insbesondere vom Sensortyp) abhängen. Kugelförmige Sensoren (die auf Licht aus allen Winkeln über und unter der Messebene reagieren) sowie „Kosinus“-Sensoren (die auf Licht aus allen Winkeln über der Messebene ansprechen) sind gegenüber unidirektionalen Sensoren zu bevorzugen, da diese Sensoren bei Mehrpunkt-Lichtquellen des hier beschriebenen Typs höhere Messwerte ergeben.

*Analytische Messungen der Prüfchemikalie*

69. Die korrekte Applikation der Prüfchemikalie sollte durch analytische Messungen der Prüfchemikalienkonzentrationen unterstützt werden.
70. Unmittelbar nach Beginn der Prüfung (d. h. am Tag der Applikation bei stabilen Prüfchemikalien oder eine Stunde nach Applikation bei instabilen Chemikalien) und am

Ende der Prüfung sollten Wasserproben für die Analyse der Prüfchemikalie bei allen Testkonzentrationen entnommen werden.

71. Die Konzentrationen im Sediment und Porenwasser sollten am Anfang und am Ende der Prüfung mindestens bei der höchsten Testkonzentration bestimmt werden, außer wenn die Prüfchemikalien bekanntermaßen in Wasser stabil sind ( $> 80\%$  des Nominalwerts). Die Messungen im Sediment und Porenwasser sind u. U. nicht notwendig, wenn die Verteilung der Prüfchemikalie zwischen Wasser und Sediment in einem Wasser/Sediment-Versuch unter vergleichbaren Bedingungen (d. h. Sediment/Wasser-Verhältnis, Applikationsmethode, Sedimenttyp) eindeutig bestimmt wurde.
72. Durch die Entnahme von Sedimentproben am Anfang der Prüfung wird das Testsystem wahrscheinlich gestört. Somit können zusätzliche behandelte Prüfgefäße notwendig sein, um analytische Messungen am Anfang und am Ende der Prüfung zu ermöglichen. Wenn Zwischenbewertungen als erforderlich angesehen werden, d. h. an Tag 7, und bei den Analysen größere Sedimentmengen benötigt werden, die nicht ohne Weiteres aus dem Testsystem entnommen werden können, sollten die analytischen Messungen ebenfalls anhand von zusätzlichen Prüfgefäßen durchgeführt werden, die auf dieselbe Weise behandelt wurden wie die für die biologischen Bewertungen verwendeten Prüfgefäße.
73. Zum Trennen des Porenwassers wird eine Zentrifugierung, z. B. bei 10 000 g und 4 °C für 30 Minuten, empfohlen. Wenn sich die Prüfchemikalie jedoch nachweislich nicht an Filter adsorbiert, ist auch eine Filtration akzeptabel. Bei zu kleinen Probenvolumina kann es vorkommen, dass sich die Konzentrationen im Porenwasser nicht analysieren lassen.
74. Bei semistatischen Prüfungen (d. h. Exposition über die Wasserphase), bei denen nichtdavon ausgegangen wird, dass die Konzentration der Prüfchemikalie(n) während der Testdauer ohne Erneuerung der Testlösungen innerhalb von  $\pm 20\%$  der Nominalkonzentration konstant bleibt, sollten bei jeder Erneuerung gebrauchte und frisch zubereitete Testlösungen für Analysen der Prüfchemikalienkonzentration entnommen werden.
75. In Fällen, in denen die gemessene Ausgangskonzentration der Prüfchemikalie zwar nicht innerhalb von  $\pm 20\%$  der Nominalkonzentration liegt, für die aber hinreichend nachgewiesen werden kann, dass die Ausgangskonzentrationen wiederholbar und stabil sind (d. h. dass die Konzentrationen im Bereich von 80-120 % der Ausgangskonzentration liegen), sind chemische Bestimmungen nur bei der höchsten und der niedrigsten Konzentration erforderlich.
76. In allen Fällen braucht die Bestimmung der Prüfchemikalienkonzentrationen nur an einem Replikatgefäß bei jeder Testkonzentration vorgenommen zu werden. Alternativ

können die Testlösungen aller Replikate für jede Konzentration für Analysen zusammengefasst werden.

77. Wenn nachgewiesen wird, dass die Prüfchemikalienkonzentration während des Tests zufriedenstellend innerhalb von  $\pm 20\%$  der Nominalkonzentration oder der gemessenen Ausgangskonzentration aufrechterhalten werden konnte, kann die Analyse der Ergebnisse und die anschließende Ableitung der Endpunkte auch ausgehend von den Nominalwerten bzw. von den gemessenen Ausgangswerten erfolgen.
78. In diesen Fällen sollten die Wirkungskonzentrationen auf den nominalen oder gemessenen Wasserkonzentrationen am Anfang der Prüfung basieren.
79. Wird jedoch nachgewiesen, dass die Konzentration während der Prüfung abgenommen hat (d. h. nicht innerhalb von  $\pm 20\%$  der Nominalkonzentration oder der gemessenen Ausgangskonzentration in der behandelten Kammer aufrechterhalten werden konnte), sollte bei der Analyse der Ergebnisse vom geometrischen Mittel der Konzentration während der Expositionsdauer oder von Modellen ausgegangen werden, die den Rückgang der Prüfchemikalienkonzentration in der behandelten Kammer beschreiben (11).

## AUSWERTUNG DER DATEN

80. In Fällen, in denen ein Lösungs-/Dispergiermittel erforderlich ist, können die Daten aus Lösungsmittel- und unbehandelten Kontrollen für statistische Analysen zusammengefasst werden, sofern die Reaktionen der Lösungsmittel- und unbehandelten Kontrollen nicht statistisch signifikant unterschiedlich sind.

### Reaktionsvariablen

81. Mit der Prüfung sollen die Wirkungen der Prüfchemikalie auf das vegetative Wachstum der Testspezies unter Verwendung von zwei Reaktionsvariablen, der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate und des Zellertrags, bestimmt werden:

#### *Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate*

82. Diese Reaktionsvariable wird auf der Grundlage von Veränderungen der Logarithmen der Hauptprosslänge, der Gesamtsprossfrischmasse und der Gesamtsprosstrockenmasse im Zeitablauf in den Kontrollen und einzelnen Behandlungsgruppen berechnet. Diese Variable wird für jedes Replikat jeder Kontroll- und Behandlungsgruppe berechnet. Die mittlere Länge und das mittlere Gewicht der drei Pflanzen pro Prüfgefäß (Replikat) und anschließend die Wachstumsrate für jedes Replikat sollten anhand der folgenden Formel berechnet werden:

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

Dabei sind:

$\mu_{i-j}$ : durchschnittliche spezifische Wachstumsrate vom Zeitpunkt i bis zum Zeitpunkt j

$N_i$ : Messvariable im Prüfgefäß bzw. im Kontrollgefäß zum Zeitpunkt i

$N_j$ : Messvariable im Prüfgefäß bzw. im Kontrollgefäß zum Zeitpunkt j

t: Zeitraum vom Zeitpunkt i bis zum Zeitpunkt j

83. Anhand der Reaktionen der Replikate sind für jede Behandlungsgruppe und für jede Kontrollgruppe die mittlere Wachstumsrate und die Varianzschätzungen zu berechnen.
84. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate wird für die gesamte Testdauer berechnet. (In der vorstehenden Formel bezeichnet „i“ den Beginn der Prüfung und „j“ das Ende der Prüfung.) Für alle Konzentrationen der Testlösungen und der Kontrolllösungen sind ein Mittelwert für die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate zu berechnen und die entsprechenden Varianzschätzungen vorzunehmen.
85. Die Hemmung der Wachstumsrate in Prozent ( $I_r$ ) kann anschließend für jede Testkonzentration (Behandlungsgruppe) nach der folgenden Formel berechnet werden:

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

Dabei sind:

$\% I_r$ : Hemmung der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate in Prozent

$\mu_C$ : Mittelwert für  $\mu$  in der Kontrollgruppe

$\mu_T$ : Mittelwert für  $\mu$  in der Behandlungsgruppe

#### *Zellertrag*

86. Diese Reaktionsvariable wird auf der Grundlage von Veränderungen der Gesamtsprosslänge, der Gesamtsprossfrischmasse und der Gesamtsprosstrockenmasse im Zeitablauf in den Kontrollen und einzelnen Behandlungsgruppen berechnet. Die mittlere prozentuale Hemmung des Zellertrags ( $\% I_y$ ) kann für jede Behandlungsgruppe wie folgt berechnet werden:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

Dabei sind:

%  $I_y$ : Verringerung des Zellertrags in Prozent

$b_C$ : Biomasse am Ende des Tests abzüglich der Biomasse am Anfang des Tests (Kontrollgruppe)

$b_T$ : Biomasse am Ende des Tests abzüglich der Biomasse am Anfang des Tests (Behandlungsgruppe)

### **Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven**

87. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der mittleren Hemmung der Reaktionsvariablen in Prozent ( $I_r$  oder  $I_y$ , wie oben beschrieben berechnet) und die logarithmische Konzentration der Prüfchemikalie werden grafisch dargestellt.

### **EC<sub>x</sub>-Schätzung**

88. Schätzungen der EC<sub>x</sub>-Werte (z. B. EC<sub>50</sub>) sollten sowohl auf der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate ( $E_r C_x$ ) als auch auf dem Zellertrag ( $E_y C_x$ ) beruhen, und beide Werte sollten ihrerseits von der Gesamtsprossfrischmasse, Gesamtsprossrockenmasse und der Gesamtsprosslänge ausgehen.

89. Es wird darauf hingewiesen, dass die mit diesen beiden Reaktionsvariablen berechneten EC<sub>x</sub>-Werte nicht vergleichbar sind; der entsprechende Unterschied muss bei der Verwendung der Testergebnisse berücksichtigt werden. Die mit der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate ( $E_r C_x$ ) berechneten Werte für EC<sub>x</sub> werden im Allgemeinen höher sein als die anhand des Zellertrags ( $E_y C_x$ ) ermittelten Werte, wenn die für diese Prüfmethode vorgesehenen Bedingungen eingehalten werden; dies ist auf die unterschiedliche mathematische Grundlage der beiden Berechnungsverfahren zurückzuführen. Die auftretenden Unterschiede sollten jedoch nicht als Anzeichen für eine unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Reaktionsvariablen betrachtet werden; die Werte sind einfach mathematisch verschieden.

### **Statistische Verfahren**

90. Ziel ist die Ermittlung einer quantitativen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durch Regressionsanalyse. Im Anschluss an eine linearisierte Transformation der Reaktionsdaten (z. B. in Einheiten nach dem Probit-, Logit- oder Weibull-Modell) (13) kann eine gewichtete lineare Regression vorgenommen werden; nicht-lineare Regressionsverfahren, mit denen die unvermeidlichen Unregelmäßigkeiten der Daten und Abweichungen von gleichförmigen Verteilungen besser verarbeitet werden können, werden jedoch bevorzugt. Im Bereich von Null bzw. der vollständigen Hemmung können



diese Unregelmäßigkeiten durch die Transformation vergrößert werden und die Analyse beeinträchtigen (13). Es wird darauf hingewiesen, dass Standard-Analysemethoden mit Probit-, Logit- oder Weibull-Transformationen für quantale Daten (z. B. Mortalität oder Überlebensraten) vorgesehen sind und zur Verwendung in Verbindung mit Wachstums- oder Zellertragsdaten entsprechend modifiziert werden sollten. Spezifische Verfahren zur Bestimmung von  $EC_x$ -Werten aus kontinuierlichen Daten sind den Quellen (14) (15) (16) (17) zu entnehmen.

91. Für jede zu analysierende Reaktionsvariable sind aufgrund der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung  $EC_x$ -Werte zu ermitteln. Die 95 %-Konfidenzgrenzen sollten für jeden ermittelten Wert bestimmt werden. Die Qualität der Übereinstimmung der Reaktionsdaten mit dem Regressionsmodell sollte grafisch oder statistisch bewertet werden. Die Regressionsanalyse wird mit den Reaktionen der einzelnen Replikate (und nicht mit den Mittelwerten der Behandlungsgruppe) durchgeführt.
92. Schätzwerte für  $EC_{50}$  und für die Konfidenzintervalle können auch durch lineare Interpolation mit einem Bootstrapping-Algorithmus (18) erzielt werden, wenn die verfügbaren Regressionsmodelle/-methoden für die betreffenden Daten nicht geeignet sind.
93. Für eine Schätzung der LOEC-Werte und entsprechend auch der NOEC-Werte müssen die Mittelwerte der behandelten Lösungen durch Varianzanalyseverfahren (ANOVA) verglichen werden. Der Mittelwert der einzelnen Konzentrationen ist dann anhand einer geeigneten Prüfmethode mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe zu vergleichen (z. B. Dunnett-Test, Williams-Test) (19) (20) (21) (22). Die ANOVA-Annahme der Normalverteilung (NV) und der Varianzhomogenität (VH) muss einer Überprüfung unterzogen werden. Diese Überprüfung sollte durch einen Shapiro-Wilks-Test (NV) oder Levene-Test (VH) durchgeführt werden. Wenn die Annahme der Normalverteilung und der Varianzhomogenität nicht erfüllt ist, kann gelegentlich eine Korrektur durch logarithmische Datentransformation erfolgen. Bei außerordentlicher Varianzheterogenität und/oder Abweichung von der Normalverteilung, die durch Transformation nicht korrigiert werden kann, sollten Analysen durch Methoden wie z. B. Bonferroni-Welch-t-Test, Jonckheere-Terpstra-Test (Step-Down) und Bonferroni-Median-Test erwogen werden. Weitere Hinweise zur Bestimmung von NOEC-Werten sind Quelle (16) zu entnehmen.

## **BERICHTERSTATTUNG**

94. Der Prüfbericht muss folgende Informationen 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.

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.

*Testspezies*

- wissenschaftliche Bezeichnung und Herkunft.

*Prüfbedingungen*

- Dauer und Bedingungen der Etablierungsphase;
- angewandtes Testverfahren (statisch, semistatisch, gepulst);
- Datum des Testbeginns und Dauer des Tests;
- Prüfmedium, d. h. Sediment und flüssiges Nährmedium;
  - Beschreibung des Prüfprotokolls: Wachstumskammer/-raum oder Labor, Prüfgefäße und Abdeckungen, Lösungsvolumina, Länge und Gewicht der Testpflanzen pro Prüfgefäß am Anfang des Tests, Verhältnis zwischen Sediment- und Wasseroberfläche, Verhältnis zwischen Sediment- und Wasservolumen;
  - Testkonzentrationen (Nominalkonzentrationen bzw. gemessene Konzentrationen) und Anzahl der Replikate pro Konzentration;
  - Methoden zur Herstellung von Stamm- und Testlösungen einschließlich der Verwendung von Lösungsmitteln und Dispergiernmitteln;
  - Temperatur während des Tests;
  - Lichtquelle, Bestrahlungsstärke ( $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )

- pH-Werte der Prüf- und Kontrollmedien sowie Aussehen der Prüfmedien bei Beginn und am Ende des Tests;
- Sauerstoffkonzentrationen;
- Analysemethoden mit geeigneten Daten zur Qualitätsbewertung (Validierungsstudien, Standardabweichungen oder Konfidenzgrenzen der Analysen);
- Methoden zur Bestimmung der Messvariablen, z. B. Länge, Trockenmasse, Frischmasse;
- sämtliche Abweichungen von dieser Prüfmethode.

### *Ergebnisse*

- Rohdaten: Sprosslänge und Sprossmasse der Pflanzen/Topf und sonstige Messvariablen in jedem Prüf- und Kontrollgefäß bei jeder Beobachtung und Analyse gemäß dem in Tabelle 1 enthaltenen Bewertungsplan;
- Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Messvariablen;
- Wachstumskurven für jede Konzentration;
- Verdopplungszeit/Wachstumsraten in der Kontrolle basierend auf Sprosslänge und Frischmasse, einschließlich Variationskoeffizient für den Zellertrag der Frischmasse;
- berechnete Reaktionsvariablen für alle behandelten Replikate mit Mittelwerten und dem Variationskoeffizienten für Replikate;
- grafische Darstellung der Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung;
- Schätzung der toxischen Endpunkte für die Reaktionsvariablen, z. B. EC<sub>50</sub>, und entsprechende Konfidenzintervalle. Wenn berechnet, sind die LOEC-Werte und/oder die NOEC-Werte sowie die zur jeweiligen Berechnung verwendeten statistischen Methoden anzugeben;
- bei Durchführung von Varianzanalysen (ANOVA) der Umfang der nachweisbaren Auswirkungen (z. B. geringster signifikanter Unterschied);
- jegliche in behandelten Proben festgestellte Wachstumsstimulation;

- alle offensichtlichen Anzeichen einer Phytotoxizität sowie Beobachtungen an den Testlösungen;
- Diskussion der Ergebnisse einschließlich aller Auswirkungen auf das Testergebnis, die auf Abweichungen von dieser Prüfmethode zurückzuführen sind.

## LITERATURHINWEISE

- (1) Kapitel C.26 dieses Anhangs: *Lemna* sp. - Wachstumsinhibitionstest.
- (2) Kapitel C.3 dieses Anhangs: Süßwasseralgen und Cyanobakterien: Wachstumsinhibitionstest.
- (3) Maltby, L. et al. (2010), *Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides*, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14.-16. Januar 2008.
- (4) Arts, G.H.P. et al. (2008), *Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests*, *Environmental Pollution*, Vol. 153, 199-206.
- (5) ISO 16191:2013 Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der toxischen Wirkung von Sedimenten auf das Wachstumsverhalten von *Myriophyllum aquaticum*.
- (6) Knauer, K. et al. (2006), *Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants*, *Pest Management Science*, Vol. 62/8, 715-722.
- (7) Kapitel C.50 dieses Anhangs: Sedimentfreier *Myriophyllum spicatum*-Toxizitätstest.
- (8) Kapitel C.28 dieses Anhangs: Chironomiden-Toxizitätstest in Sediment-Wasser-Systemen mit gespiktem Wasser.
- (9) Ratte, M., H. Ratte (2014), *Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using M. aquaticum and M. spicatum grown in a water-sediment system*, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment*, No. 206, OECD Publishing, Paris.
- (10) Davies, J. et al. (2003), *Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study*, *Pest Management Science*, Vol. 59/2, 231 – 237.
- (11) OECD (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, *OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment*, No. 23, OECD Publishing, Paris.

- (12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), *Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments*, *Aquatic Botany*, Vol. 21/3, 251-263.
- (13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), *Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves*, *Environmental Science Technology*, Vol. 18/9, 713-718.
- (14) Nyholm, N. et al. (1992), *Statistical treatment of data from microbial toxicity tests*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/2, 157-167.
- (15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), *A statistical procedure for modelling continuous toxicity data*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, 1485-1494.
- (16) OECD (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, *OECD Environmental Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment No. 54*, OECD, Paris.
- (17) Brain, P., R. Cousens (1989), *An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses*, *Weed Research*, Vol. 29/2, 93-96.
- (18) Norberg-King, T.J. (1988), *An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach*, *National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88*. US EPA, Duluth, MN.
- (19) Dunnett, C.W. (1955), *A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control*, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, 1096-1121.
- (20) Dunnett, C.W. (1964), *New tables for multiple comparisons with a control*, *Biometrics*, Vol. 20/3, 482-491.
- (21) Williams, D.A. (1971), *A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control*, *Biometrics*, Vol. 27/1, 103-117.
- (22) Williams, D.A. (1972), *The comparison of several dose levels with a zero dose control*, *Biometrics*, Vol. 28/2, 519-531.

## Anlage 1

### ZUSAMMENSETZUNG DES SMART & BARKO-MEDIUMS

<b>Komponente</b>	<b>Reagenzmenge, die Wasser zugesetzt wird* (mg/l)</b>
CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	91,7
MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	69,0
NaHCO <sub>3</sub>	58,4
KHCO <sub>3</sub>	15,4
pH (Luftgleichgewicht)	7,9

\* entmineralisiertes (d. h. destilliertes oder entionisiertes) Wasser

## Anlage 2

### DEFINITIONEN

**Biomasse** ist die Frisch- und/oder Trockenmasse des in einer Population enthaltenen lebenden Materials. In diesem Test entspricht die Biomasse der Summe aus Hauptspross, allen Seitenästen und allen Wurzeln.

**Chemikalie** ist ein Stoff oder Gemisch.

**Chlorose** ist eine Farbveränderung von grün nach gelb des Testorganismus, insbesondere der Wirteln.

**EC<sub>x</sub>** ist die Konzentration der im Prüfmedium aufgelösten Prüfchemikalie, bei der sich binnen einer festgelegten Expositionsdauer eine Reduzierung des Wachstums von *Myriophyllum spicatum* um x % (z. B. 50 %) ergibt. (Die Expositionsdauer ist ausdrücklich zu nennen, wenn die Dauer von der vollständigen oder normalen Testdauer abweicht.) Um einen von der Wachstumsrate bzw. vom Zellertrag abgeleiteten EC-Wert eindeutig zu kennzeichnen, wird die Bezeichnung „E<sub>r</sub>C“ für die Wachstumsrate und „E<sub>y</sub>C“ für den Zellertrag jeweils gefolgt von der verwendeten Messvariablen (z. B. E<sub>r</sub>C (Hauptsprosslänge) verwendet.

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

**Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)** ist die niedrigste geprüfte Konzentration, bei der beobachtet wurde, dass die Chemikalie binnen einer bestimmten Expositionsdauer gegenüber der Kontrollprobe eine statistisch signifikante Wachstumsreduzierung bewirkt (bei  $p < 0,05$ ); Alle Testkonzentrationen oberhalb der LOEC müssen jedoch eine schädigende Wirkung haben, die gleich den bei der LOEC beobachteten Wirkungen oder größer als diese ist. Können diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden, muss ausführlich erklärt werden, wie die LOEC (und damit auch die NOEC) ausgewählt wurde.



**Messvariablen** sind alle Variablentypen, die gemessen werden, um mit mindestens einer Reaktionsvariablen den Endpunkt des Tests zu beschreiben. Bei dieser Prüfmethode bilden Hauptsprosslänge, Gesamtseitenastlänge, Gesamtsprosslänge, Gesamtwurzellänge, Frischmasse, Trockenmasse und Anzahl der Wirteln die Messvariablen.

**Monokultur** ist eine Kultur mit einer Pflanzenart.

**Nekrose** ist abgestorbenes (d. h. weißes oder dunkelbraunes) Gewebe des Testorganismus.

**No Observed Effect Concentration (NOEC)** ist die Testkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC.

**Prüfchemikalie bezeichnet einen Stoff oder ein Gemisch, der bzw. das nach dieser Methode geprüft wird.**

**Prüfmedium** ist das gesamte synthetische Nährmedium, in dem die zu prüfenden Pflanzen wachsen, wenn sie der Prüfchemikalie ausgesetzt werden; die Prüfchemikalie wird im Allgemeinen im Prüfmedium aufgelöst.

**Reaktionsvariable** ist eine Variable für die geschätzte Toxizität, abgeleitet aus beliebigen gemessenen Variablen zur Beschreibung der Biomasse durch verschiedene Berechnungsmethoden. Bei dieser Prüfmethode sind die Wachstumsrate und der Zellertrag die Reaktionsvariablen, die aus Messvariablen wie z. B. Hauptsprosslänge, Gesamtsprosslänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln abgeleitet werden.

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

**Statischer Test** ist eine Prüfmethode, bei der die Testlösung während der Testdauer nicht erneuert wird.

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

**Wachstum** ist eine Zunahme der Messvariablen, z. B. Hauptsprosslänge, Gesamtseitenastlänge, Gesamtsprosslänge, Gesamtwurzellänge, Frischmasse, Trockenmasse oder Anzahl der Wirteln während der Testdauer.

**Wachstumsrate** (durchschnittliche spezifische Wachstumsrate) ist die logarithmische Zunahme der Messvariablen während der Expositionsdauer. *Hinweis:* Die auf die Wachstumsrate bezogenen Reaktionsvariablen sind unabhängig von der Testdauer, solange das Wachstumsmuster der nicht exponierten Kontrollorganismen exponential ist.

**Zellertrag** ist der Wert einer Messvariablen zur Beschreibung der Biomasse am Ende der Expositionsdauer abzüglich der Messvariablen am Anfang der Expositionsdauer. *Hinweis:* Im Falle eines exponentialen Wachstumsmusters der nicht exponierten Organismen verringern sich die auf den Zellertrag bezogenen Reaktionsvariablen mit der Testdauer.“