**Dieses Dokument ist lediglich eine Dokumentationshilfe, für deren Richtigkeit die Organe der Union keine Gewähr übernehmen**

►**B** **VERORDNUNG (EG) Nr. 440/2008 DER KOMMISSION**

**vom 30. Mai 2008**

**zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)**

**(Text von Bedeutung für den EWR)**

(ABl. L 142 vom 31.5.2008, S. 1)

Geändert durch:

| | | Amtsblatt | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Nr. | Seite | Datum |
| ►**M1** | Verordnung (EG) Nr. 761/2009 der Kommission vom 23. Juli 2009 | L 220 | 1 | 24.8.2009 |
| ►**M2** | Verordnung (EU) Nr. 1152/2010 der Kommission vom 8. Dezember 2010 | L 324 | 13 | 9.12.2010 |
| ►**M3** | Verordnung (EU) Nr. 640/2012 der Kommission vom 6. Juli 2012 | L 193 | 1 | 20.7.2012 |
| ►**M4** | Verordnung (EU) Nr. 260/2014 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 26. Februar 2014 | L 81 | 1 | 19.3.2014 |

▼B

# VERORDNUNG (EG) Nr. 440/2008 DER KOMMISSION

**vom 30. Mai 2008**

**zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)**

**(Text von Bedeutung für den EWR)**

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission ([1]), insbesondere auf Artikel 13 Absatz 3,

in Erwägung nachstehender Gründe:

(1) Für die Prüfung von Stoffen sind gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 auf Gemeinschaftsebene Prüfmethoden festzulegen, wenn solche Prüfungen erforderlich sind, um Informationen über inhärente Stoffeigenschaften zu gewinnen.

(2) Die Richtlinie 67/548/EWG des Rates vom 27. Juni 1967 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe ([2]) enthält in Anhang V Methoden zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften, der Toxizität und der Ökotoxizität von Stoffen und Zubereitungen. Anhang V der Richtlinie 67/548/EWG ist mit der Richtlinie 2006/121/EG mit Wirkung vom 1. Juni 2008 aufgehoben worden.

(3) Die in Anhang V der Richtlinie 67/548/EWG enthaltenen Prüfmethoden sind in die vorliegende Verordnung einzubeziehen.

(4) Diese Verordnung schließt die Anwendung anderer Prüfmethoden nicht aus, sofern deren Anwendung mit Artikel 13 Absatz 3 der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 im Einklang steht.

([1]) ABl. L 396 vom 30.12.2006, S. 1. Berichtigte Fassung im ABl. L 136 vom 29.5.2007, S. 3.

([2]) ABl. 196 vom 16.8.1967, S. 1. Richtlinie zuletzt geändert durch die Richtlinie 2006/121/EG des Europäischen Parlaments und des Rates (ABl. L 396 vom 30.12.2006, S. 850. Berichtigte Fassung im ABl. L 136 vom 29.5.2007, S. 281) – *mit den geeigneten Bezugnahmen zu aktualisieren, sobald das 30. ATP veröffentlicht ist.*

▼B

(5) Bei der Ausarbeitung der Prüfmethoden sind die Grundsätze, nach denen die Verwendung von Tieren bei Verfahren ersetzt, verringert und verfeinert werden soll, umfassend zu berücksichtigen, insbesondere, wenn geeignete validierte Verfahren zur Verfügung stehen, mit denen Tierversuche ersetzt, verringert oder verfeinert werden können.

(6) Die in dieser Verordnung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des gemäß Artikel 133 der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 eingesetzten Ausschusses —

HAT FOLGENDE VERORDNUNG ERLASSEN:

*Artikel 1*

Die im Sinne der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 anzuwendenden Prüfmethoden sind im Anhang der vorliegenden Verordnung aufgeführt.

*Artikel 2*

Die Kommission nimmt gegebenenfalls eine Überprüfung der in der vorliegenden Verordnung enthaltenen Prüfmethoden im Hinblick auf eine Ersetzung, Verringerung oder Verfeinerung von Versuchen an Wirbeltieren vor.

*Artikel 3*

Alle Bezugnahmen auf Anhang V der Richtlinie 67/548/EWG gelten als Bezugnahmen auf diese Verordnung.

*Artikel 4*

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

Sie gilt ab dem 1. Juni 2008.

▼B

*ANHANG*

**TEIL A: METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER PHYSIKALISCH-CHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN**

INHALTSVERZEICHNIS


A.1. SCHMELZ-/GEFRIERTEMPERATUR

A.2. SIEDETEMPERATUR

A.3. RELATIVE DICHTE

A.4. DAMPFDRUCK

A.5. OBERFLÄCHENSPANNUNG

A.6. WASSERLÖSLICHKEIT

A.8. VERTEILUNGSKOEFFIZIENT

A.9. FLAMMPUNKT

A.10. ENTZÜNDLICHKEIT (FESTE STOFFE)

A.11. ENTZÜNDLICHKEIT (GASE)

A.12. ENTZÜNDLICHKEIT (BERÜHRUNG MIT WASSER)

A.13. PYROPHORE EIGENSCHAFTEN VON FESTEN UND FLÜSSIGEN STOFFEN

A.14. EXPLOSIONSGEFAHR

A.15. ZÜNDTEMPERATUR (FLÜSSIGKEITEN UND GASE)

A.16. RELATIVE SELBSTENTZÜNDUNGSTEMPERATUR FÜR FESTSTOFFE

A.17. BRANDFÖRDERNDE EIGENSCHAFTEN (FESTSTOFFE)

A.18. ZAHLENGEMITTELTE MOLMASSE UND MOLMASSENVERTEILUNG VON POLYMEREN

A.19. NIEDERMOLEKULARER ANTEIL VON POLYMEREN

A.20. LÖSUNGS-/EXTRAKTIONSVERHALTEN VON POLYMEREN IN WASSER

A.21. BRANDFÖRDERNDE EIGENSCHAFTEN (FLÜSSIGE STOFFE)

A.22. LÄNGENGEWICHTETER MITTLERER GEOMETRISCHER DURCHMESSER VON FASERN


▼M4


A.23. 1-OCTANOL/WASSER-VERTEILUNGSKOEFFIZIENT: METHODE ZUR PRÜFUNG UNTER LANGSAMEM RÜHREN

▼B

## A.1. SCHMELZ-/GEFRIERTEMPERATUR

### 1. METHODEN

Den meisten der hier beschriebenen Methoden liegt die OECD-Prüfrichtlinie (1) zugrunde. Die Grundprinzipien sind in (2) und (3) angegeben.

### 1.1. EINLEITUNG

Die hier beschriebenen Methoden und Geräte sind zur Bestimmung der Schmelztemperatur der Substanzen ohne jede Einschränkung in Bezug auf ihren Reinheitsgrad anzuwenden.

Die Wahl der bestgeeigneten Methode hängt von der Natur der Prüfsubstanz ab. Die Anwendbarkeit ist davon abhängig, ob sich der betreffende Stoff leicht, schwierig oder überhaupt nicht pulverisieren lässt.

Für bestimmte Stoffe bietet sich eher eine Bestimmung der Gefrier- oder Erstarrungstemperatur an: Folglich wurden Vorschriften für diese Bestimmungen gleichfalls in diese Methodik aufgenommen.

Wo sich aufgrund der besonderen Eigenschaften des Stoffes keiner der oben genannten Parameter ohne weiteres messen lässt, kann die Messung eines Stockpunktes angebracht sein.

### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Als Schmelztemperatur bezeichnet man diejenige Temperatur, bei der unter atmosphärischem Druck der Übergang zwischen fester und flüssiger Phase stattfindet; unter idealen Bedingungen entspricht diese Temperatur der Gefriertemperatur.

Da bei vielen Stoffen der Phasenübergang in einem Temperaturbereich stattfindet, wird dieser Übergang auch oft als Schmelzbereich bezeichnet.

Umrechnung der Einheiten (K in $^{o}$C):

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius-Temperatur, in Grad Celsius ( $^{o}$C)

T: thermodynamische Temperatur, in Kelvin (K)

### 1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Methode von Zeit zu Zeit zu überprüfen und einen Vergleich mit den Ergebnissen aus anderen Methoden zu ermöglichen.

Einige der Eichsubstanzen sind in der Literatur (4) zu finden.

▼B

1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Man bestimmt die Temperatur (den Temperaturbereich) der Phasenumwandlung vom festen in den flüssigen Zustand oder vom flüssigen in den festen Zustand. In der Praxis wird eine Probe der zu untersuchenden Substanz bei Atmosphärendruck erhitzt/abgekühlt, und dabei werden die Temperaturen des Schmelz-/Gefrierbeginns sowie des vollständigen Schmelzens/Gefrierens bestimmt. Fünf Typen von Methoden werden beschrieben: Kapillarmethode, Heiztischmethoden, Gefriertemperaturbestimmungen, Methoden der thermischen Analyse und Bestimmung des Stockpunktes (entwickelt für Erdöl).

In einigen Fällen kann es von Nutzen sein, statt der Schmelztemperatur die Gefriertemperatur zu messen.

1.4.1. **Die Kapillarmethode**

1.4.1.1. *Schmelztemperaturgeräte mit Flüssigkeitsbad*

Eine geringe Menge der fein zerriebenen Substanz wird in ein Kapillarröhrchen gegeben und durch Klopfen verdichtet. Das Röhrchen wird zusammen mit einem Thermometer erhitzt, und dabei wird der Temperaturanstieg so eingestellt, dass er während des eigentlichen Schmelzvorgangs weniger als 1 K pro Minute beträgt. Man notiert die Temperaturen bei Schmelzbeginn und bei Schmelzende.

1.4.1.2. *Schmelztemperaturgeräte mit Metallblock*

Wie in 1.4.1.1, jedoch mit dem Unterschied, dass das Kapillarröhrchen und das Thermometer in einem erwärmten Metallblock befestigt sind und sich durch Öffnungen in dem Block beobachten lassen.

1.4.1.3. *Bestimmung mit Fotozelle*

Die in dem Kapillarröhrchen befindliche Substanzprobe wird in einem Metallzylinder automatisch erwärmt. In dem Zylinder befindet sich eine Öffnung, und ein gebündelter Lichtstrahl wird auf diesem Wege durch die Probe auf eine genauestens geeichte Fotozelle gerichtet. Die optischen Eigenschaften der meisten Substanzen ändern sich beim Schmelzen von opak nach durchsichtig. In diesem Augenblick steigt also die Lichtintensität in der Fotozelle, und ein Stoppsignal wird zur Digitalanzeige übertragen, die die Temperatur des in der Heizkammer befindlichen Platin-Widerstandsthermometers anzeigt. Allerdings eignet sich diese Methode nicht für einige stark gefärbte Substanzen.

1.4.2. **Heiztische**

1.4.2.1. *Kofler-Heizbank*

Die Wirkungsweise der Kofler-Heizbank beruht auf zwei elektrisch beheizten Metallblöcken unterschiedlicher Wärmeleitfähigkeit, wobei die Bank selbst so ausgelegt ist, dass auf ihrer gesamten Länge ein fast linearer Temperaturgradient herrscht. Der Temperaturbereich der Heizbank liegt im Allgemeinen zwischen 283 K und 573 K. Die Bank verfügt über eine spezielle Temperaturableseeinrichtung, bestehend aus einem Zeiger und einer für die jeweilige Heizbank ausgelegten Skala. Zur Schmelztemperaturbestimmung wird die betreffende Substanz in einer dünnen Schicht direkt auf die Oberfläche der Heizbank aufgebracht. In wenigen Sekunden zeichnet sich eine scharfe Trennlinie zwischen der flüssigen und der festen Phase ab. Zur Ablesung der Temperatur wird der Zeiger auf die Trennlinie eingestellt.

▼B

1.4.2.2. *Das Schmelzmikroskop*

Zur Schmelztemperaturbestimmung mit sehr kleinen Stoffmengen sind verschiedene Heiztische mit Mikroskop im Gebrauch. Die meisten Heiztische bedienen sich zur Temperaturablesung empfindlicher Thermoelemente, doch werden gelegentlich auch Quecksilberthermometer verwendet. Das typische Schmelztemperaturbestimmungsgerät mit Heiztisch besitzt eine Heizkammer mit einer Metallplatte, auf welcher die auf einem Objektträger befindliche Probe angebracht wird. Durch eine Öffnung im Mittelpunkt der Metallplatte wird über den Beleuchtungsspiegel des Mikroskops ein Lichtbündel gerichtet. Bei Messungen wird die Heizkammer durch eine Glasplatte abgedeckt, damit der Probenbereich vor Lufteinflüssen geschützt wird.

Das Aufheizen der Probe wird durch einen Regelwiderstand kontrolliert. Für sehr genaue Messungen an optisch anisotropen Substanzen kann polarisiertes Licht verwendet werden.

1.4.2.3. *Die Meniskusmethode*

Diese Methode wird vor allem für Polyamide angewandt.

Die Temperatur, bei der sich ein zwischen dem Heiztisch und einem durch die Polyamidprobe getragenen Deckglas eingeschlossener Silikonölmeniskus verlagert, wird visuell bestimmt.

1.4.3. **Methode zur Bestimmung der Gefriertemperatur**

Die Probe wird in ein dazu bestimmtes Reagenzglas gefüllt und in ein Gerät zur Bestimmung der Gefriertemperatur gestellt. Während des Abkühlens wird die Probe langsam und kontinuierlich gerührt und die Temperatur in geeigneten Zeitabständen gemessen. Diejenige Temperatur, korrigiert um den Thermometerfehler, bei der der Temperaturverlauf während einiger Ablesungen konstant bleibt, wird als Gefriertemperatur notiert.

Eine Unterkühlung ist durch Erhalt des Gleichgewichts zwischen der festen und der flüssigen Phase zu vermeiden.

1.4.4. **Thermische Analyse**

1.4.4.1. *Differentialthermoanalyse (DTA)*

Mit diesem Verfahren wird der Temperaturunterschied zwischen der Substanz und einem Referenzmaterial in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet, während die Substanz und das Referenzmaterial demselben kontrollierten Temperaturprogramm ausgesetzt werden. Wenn die Probe eine Phasenumwandlung mit Änderung der Enthalpie durchläuft, dann wird diese Änderung durch ein endothermes (Schmelzen) oder exothermes (Gefrieren) Abweichen vom Ausgangsniveau der Temperaturaufzeichnung angezeigt.

▼B

1.4.4.2. *Differentialscanningkalorimetrie (DSK)*

Mit diesem Verfahren wird der Unterschied in der Energieaufnahme zwischen einer Substanz und einem Referenzmaterial in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet, während die Substanz und das Referenzmaterial demselben kontrollierten Temperaturprogramm ausgesetzt werden. Bei der Energie handelt es sich um diejenige Energie, die notwendig ist, um einen Temperaturabgleich zwischen der Substanz und dem Referenzmaterial zu erreichen. Wenn die Probe eine Phasenumwandlung mit Änderung der Enthalpie durchläuft, dann wird diese Änderung durch ein endothermes (Schmelzen) oder exothermes (Gefrieren) Abweichen vom Ausgangsniveau des Wärmeflussbildes angezeigt.

1.4.5. **Stockpunkt**

Dieses Verfahren wurde zur Verwendung bei Erdölen entwickelt; es eignet sich für ölige Substanzen mit einer niedrigen Schmelztemperatur.

Die Probe wird nach vorherigem Aufheizen mit einer bestimmten Geschwindigkeit abgekühlt und in Abständen von 3 K auf ihre Fließeigenschaften untersucht. Die niedrigste Temperatur, bei der noch eine Bewegung der Substanz beobachtet wird, wird als Stockpunkt notiert.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Der Anwendungsbereich und die Genauigkeit der verschiedenen Methoden zur Bestimmung von Schmelztemperatur/Schmelzbereich sind nachstehender Tabelle zu entnehmen:

TABELLE: ANWENDBARKEIT DER BESCHRIEBENEN METHODEN

A. **Kapillarmethoden**

| Messmethode | Pulverisierbare Substanzen | Nicht ohne weiteres pulverisierbare Substanzen | Temperaturbereich | Geschätzte Genauigkeit (1) | Existierende Methode oder Norm |
|---|---|---|---|---|---|
| Schmelztemperaturgeräte mit Flüssigkeitsbad | ja | nur wenige | 273 K bis 573 K | ± 0,3 K | JIS K 0064 |
| Schmelztemperaturgeräte mit Metallblock | ja | nur wenige | 293 K bis > 573 K | ± 0,5 K | ISO 1218 (E) |
| Fotozellengeräte | ja | verschiedene, unter Verwendung verschiedener Zusatzgeräte | 253 K bis 573 K | ± 0,5 K | |

(1) Je nach dem verwendeten Gerätetyp und dem Reinheitsgrad des verwendeten Stoffes.

▼B

B. **Heiztische und Gefriertemperaturbestimmungen**

| Messmethode | Pulverisierbare Substanzen | Nicht ohne weiteres pulverisierbare Substanzen | Temperaturbereich | Geschätzte Genauigkeit (1) | Existierende Methode oder Norm |
|---|---|---|---|---|---|
| Kofler-Heizbank | ja | nein | 283 K bis >573 K | ± 1,0 K | ANSI/ASTM D 3451-76 |
| Schmelzmikroskop | ja | nur wenige | 273 K bis >573 K | ± 0,5 K | DIN 53736 |
| Meniskusmethode | nein | speziell für Polyamide | 293 K bis >573 K | ± 0,5 K | ISO 1218 (E) |
| Gefriertemperaturmethoden | ja | ja | 223 K bis 573 K | ± 0,5 K | zum Beispiel BS 4695 |

(1) Je nach dem verwendeten Gerätetyp und dem Reinheitsgrad des verwendeten Stoffes.

C. **Thermische Analyse**

| Messmethode | Pulverisierbare Substanzen | Nicht ohne weiteres pulverisierbare Substanzen | Temperaturbereich | Geschätzte Genauigkeit (1) | Existierende Methode oder Norm |
|---|---|---|---|---|---|
| Differentialthermoanalyse | ja | ja | 173 K bis 1 273 K | bis 600 K: ± 0,5 K bis 1 273 K: ± 2,0 K | ASTM E 537-76 |
| Differentialscanningkalorimetrie | ja | ja | 173 K bis 1 273 K | bis 600 K: ± 0,5 K bis 1 273 K: ± 2,0 K | ASTM E 537-76 |

(1) Je nach dem verwendeten Gerätetyp und dem Reinheitsgrad des verwendeten Stoffes.

D. **Stockpunkt**

| Messmethode | Pulverisierbare Substanzen | Nicht ohne weiteres pulverisierbare Substanzen | Temperaturbereich | Geschätzte Genauigkeit (1) | Existierende Methode oder Norm |
|---|---|---|---|---|---|
| Stockpunkt | für Erdöl und ölige Substanzen | für Erdöl und ölige Substanzen | 223 K bis 323 K | ± 3,0 K | ASTM D 97-66 |

(1) Je nach dem verwendeten Gerätetyp und dem Reinheitsgrad des verwendeten Stoffes.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODEN

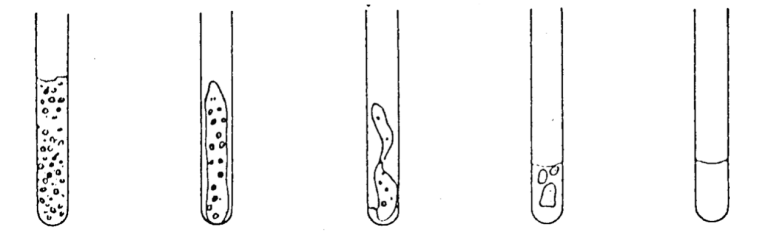
Die Durchführung fast aller hier aufgeführten Prüfmethoden ist in nationalen und internationalen Normen beschrieben (siehe Anlage).

1.6.1. **Methoden mit Kapillarrohr**

Fein pulverisierte Substanzen lassen im Verlauf eines langsamen Temperaturanstiegs im Allgemeinen die in Abbildung 1 dargestellten Schmelzstadien erkennen.

▼B

*Abbildung 1*




Stadium A (Schmelzbeginn): Feine Tröpfchen haften gleichmäßig an der Innenwand des Kapillarrohrs.

Stadium B Aufgrund des Schrumpfens der Probe bildet sich zwischen Innenwand und Probe ein klarer Flüssigkeitsfilm.

Stadium C Die geschrumpfte Probe beginnt nach unten zusammenzufallen und wird flüssig.

Stadium D An der Oberfläche bildet sich ein vollständiger Meniskus, aber ein erheblicher Teil der Probe ist noch fest.

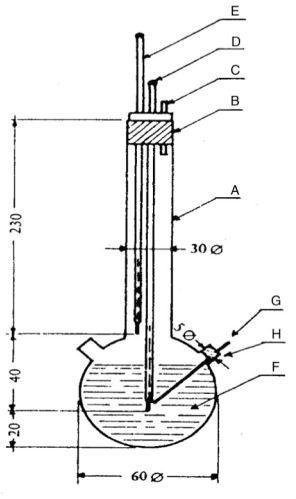
Stadium E (Endstadium des Schmelzens): Die Probe enthält keine festen Teilchen mehr.

Während der Bestimmung der Schmelztemperatur werden die Temperaturen zu Beginn und zu Ende des Schmelzvorgangs registriert.

1.6.1.1. *Schmelztemperaturbestimmungsgeräte mit Flüssigkeitsbad*

Abbildung 2 zeigt eine genormte Glasapparatur zur Bestimmung der Schmelztemperatur (JIS K 0064). Alle Dimensionsangaben in mm.

*Abbildung 2*




A: Messkolben
B: Stopfen
C: Druckausgleich
D: Thermometer
E: Hilfsthermometer
F: Badflüssigkeit
G: Kapillarrohr aus Glas, 80 bis 100 mm lang mit einem inneren Durchmesser von 1,0 mm ± 0,2 mm und einer Wandstärke von 0,2 bis 0,3 mm
H: seitlicher Stutzen

▼B

*Badflüssigkeit*

Es sollte eine geeignete Flüssigkeit gewählt werden. Die Wahl der Flüssigkeit hängt von der zu bestimmenden Schmelztemperatur ab, z. B. flüssiges Paraffin für Schmelztemperaturen nicht über 473 K, Silikonöl für Schmelztemperaturen nicht über 573 K.

Für Schmelztemperaturen über 523 K kann eine Mischung aus drei Gewichtsteilen Schwefelsäure und zwei Gewichtsteilen Kaliumsulfat benutzt werden. Bei Verwendung einer solchen Mischung sollten geeignete Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden.

*Thermometer*

Es sollten nur solche Thermometer verwendet werden, die den Anforderungen der nachstehenden oder anderer gleichwertiger Normen entsprechen:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

*Durchführung*

Die getrocknete Substanz wird in einem Mörser fein zerrieben und anschließend in ein an einem Ende zugeschmolzenes Kapillarröhrchen gefüllt. Nach Verdichten durch Klopfen sollte die Füllhöhe etwa 3 mm betragen. Zu diesem Zweck lässt man das Kapillarröhrchen aus ca. 700 mm Höhe durch ein Glasrohr auf ein Uhrglas fallen.

Das gefüllte Kapillarröhrchen wird derart in das Bad eingebracht, dass der mittlere Teil der Quecksilberkugel des Thermometers das Kapillarröhrchen an der Stelle berührt, an der sich die Probe befindet. Gewöhnlich führt man das Kapillarröhrchen etwa 10 K vor Erreichen der Schmelztemperatur in das Gerät ein.

Das Flüssigkeitsbad wird so beheizt, dass der Temperaturanstieg etwa 3 K pro Minute beträgt. Dabei soll die Flüssigkeit gerührt werden. Etwa 10 K vor Erreichen der erwarteten Schmelztemperatur wird der Temperaturanstieg auf maximal 1 K pro Minute reduziert.

*Berechnung*

Die Berechnung der Schmelztemperatur wird folgendermaßen durchgeführt:

$T = T_D + 0{,}00016\ (T_D - T_E)\ n$

Darin bedeuten:

$T$ = korrigierte Schmelztemperatur in K

$T_D$ = Temperaturablesung am Thermometer D in K

$T_E$ = Temperaturablesung am Thermometer E in K

$n$ = Anzahl der Grade, die der Quecksilberfaden des Thermometers D aus der Flüssigkeit herausragt

1.6.1.2. *Schmelztemperaturbestimmungsgeräte mit Metallblock*

*Gerät*

*Das Gerät besteht aus:*

— einem zylindrischen Metallblock, dessen oberer Teil hohl ist und eine Heizkammer bildet (vgl. Abbildung 3),

— einer Abdeckplatte aus Metall mit zwei oder mehreren Öffnungen, durch welche die Schmelzpunktröhrchen in den Metallblock eingebracht werden können,

▼B

— einem Heizsystem für den Metallblock, beispielsweise mit einem in den Metallblock eingeschlossenen elektrischen Heizwiderstand,

— einem Regelwiderstand zur Regulierung der Leistungsaufnahme bei elektrischer Heizung,

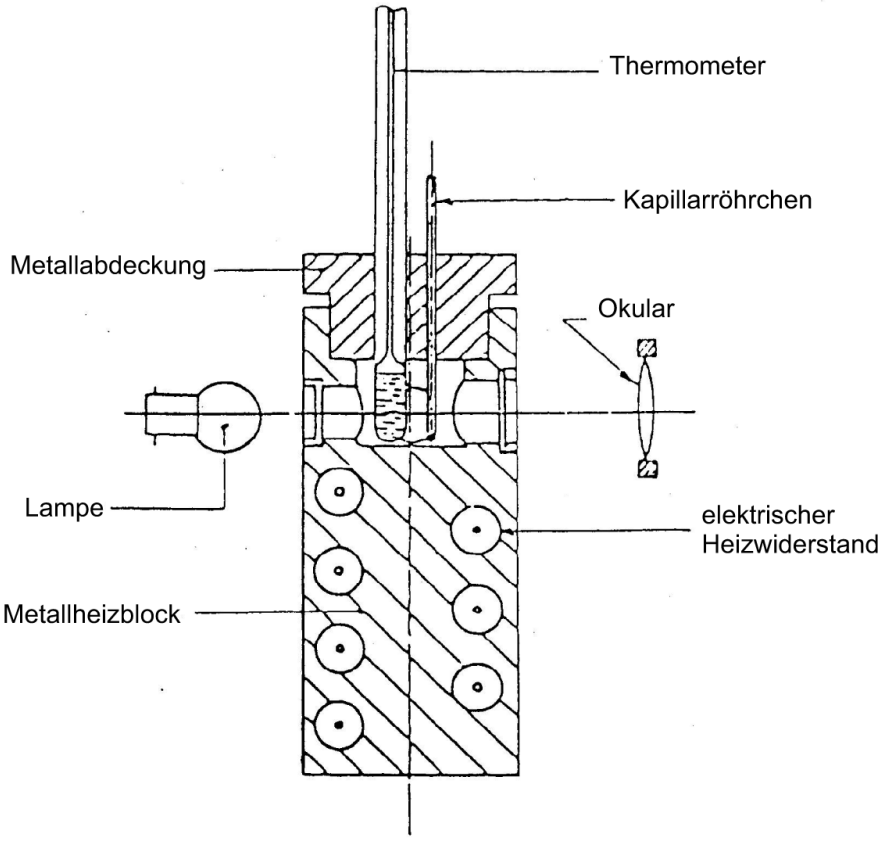
— vier Fenstern aus hitzebeständigem Glas, die sich an den Seitenwänden der Heizkammer rechtwinklig gegenüberliegen. Vor einem dieser Fenster befindet sich ein Okular zur Beobachtung des Kapillarröhrchens. Die drei anderen Fenster dienen zur Beleuchtung des Innenraumes mittels Lampen, und

— einem an einem Ende zugeschmolzenen Kapillarröhrchen aus hitzebeständigem Glas (siehe 1.6.1.1).

*Thermometer*

Siehe die Normen in 1.6.1.1. Es können ebenfalls thermoelektrische Messgeräte mit vergleichbarer Genauigkeit verwendet werden.

*Abbildung 3*




1.6.1.3. *Bestimmung mit Fotozelle (automatisch)*

*Gerät und Verfahren*

Das Gerät besteht aus einer Metallkammer mit automatischer Heizvorrichtung. Drei Kapillarröhrchen werden nach 1.6.1.1 gefüllt und in die Heizkammer gestellt.

▼B

Zur Kalibrierung des Gerätes stehen mehrere lineare Temperaturanstiegsraten zur Verfügung; der geeignete Temperaturanstieg wird elektrisch auf eine im Voraus festgelegte lineare Anstiegsrate gebracht. Die jeweilige Temperatur der Heizkammer und die Temperatur des in den Kapillarröhrchen enthaltenen Stoffes werden mit Registriergeräten aufgezeichnet.

1.6.2. **Heiztische**

1.6.2.1. *Kofler-Heizbank*

Siehe Anlage.

1.6.2.2. *Schmelzmikroskop*

Siehe Anlage.

1.6.2.3. *Meniskusmethode (Polyamide)*

Siehe Anlage.

Im Bereich der Schmelztemperatur sollte die Heizgeschwindigkeit weniger als 1 K/min betragen.

1.6.3. **Methoden zur Bestimmung der Gefriertemperatur**

Siehe Anlage.

1.6.4. **Thermoanalyse**

1.6.4.1. *Differentialthermoanalyse*

Siehe Anlage.

1.6.4.2. *Differentialscanningkalorimetrie*

Siehe Anlage.

1.6.5. **Stockpunktbestimmung**

Siehe Anlage.

2. **DATEN**

In bestimmten Fällen ist eine Thermometeranpassung erforderlich.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— verwendetes Verfahren,

— genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen), ggf. Vorreinigung,

— eine ungefähre Angabe zur Genauigkeit.

Der Mittelwert mindestens zweier Messungen, deren Werte im Bereich der ungefähren Genauigkeit (siehe Tabellen) liegen, ist als Schmelztemperatur anzugeben.

▼B

Liegt der Temperaturunterschied zwischen der Anfangs- und der Endphase des Schmelzens innerhalb der Genauigkeitsgrenzen der Methode, so ist die Anfangstemperatur als Schmelztemperatur anzugeben; andernfalls sind beide Temperaturen anzugeben.

Wenn sich der Stoff vor Erreichen der Schmelztemperatur zersetzt oder sublimiert, ist die Temperatur anzugeben, bei der dies beobachtet wird.

Alle zur Bewertung der Ergebnisse notwendigen Informationen und Bemerkungen sind zu notieren, insbesondere diejenigen über Verunreinigungen und den Aggregatzustand des Stoffes.

## 4. LITERATUR

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUP AC, B. Le Neindre, B. Vodar (Hrsg.): Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II, 803-834.

(3) R. Weissberger (Hrsg.): Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

(4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

▼B

*Anlage*

*Weitere technische Einzelheiten können z. B. den folgenden Normen entnommen werden:*

1. **Kapillarmethoden**

1.1. Schmelztemperaturbestimmungsgeräte mit Flüssigkeitsbad

| | |
|---|---|
| ASTM E 324-69 | Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals |
| BS 4634 | Method for the determination of melting point and/or melting range |
| DIN 53181 | Bestimmung des Schmelzintervalls von Harzen nach Kapillarverfahren |
| JIS K 00-64 | Testing methods for melting point of chemical products |

1.2. Schmelztemperaturbestimmungsgeräte mit Metallblock

| | |
|---|---|
| DEN 53736 | Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen |
| ISO 1218 (E) | Plastics — polyamides — determination of „melting point“ |

2. **Heiztische**

2.1. Kofler-Heizbank

| | |
|---|---|
| ANSI/ASTM D 3451-76 | Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings |

2.2. Schmelzmikroskop

| | |
|---|---|
| DIN 53736 | Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen |

2.3. Meniskusmethode (Polyamide)

| | |
|---|---|
| ISO 1218 (E) | Plastics — polyamides — determination of „melting point“ |

▼B

| | |
|---|---|
| ANSI/ASTM D 2133-66 | Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials |
| NT T 51 050 | Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion“. Méthode du ménisque |

3. **Methoden zur Gefriertemperaturbestimmung**

| | |
|---|---|
| BS 4633 | Method for the determination of crystallizing point |
| BS 4695 | Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (Cooling Curve) |
| DIN S1421 | Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen |
| ISO 2207 | Cires de pétrole: détermination de la température de figeage |
| DIN 53175 | Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren |
| NF T 60-114 | Point de fusion des paraffines |
| NF T 20-051 | Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation) |
| ISO 1392 | Method for the determination of the freezing point |

4. **Thermoanalyse**

4.1. Differentialthermoanalyse

| | |
|---|---|
| ASTM E 537-76 | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis |
| ASTM E 473-85 | Standard definitions of terms relating to thermal analysis |

▼B

| | |
|---|---|
| ASTM E 472-86 | Standard practice for reporting thermoanalytical data |
| DIN 51005 | Thermische Analyse, Begriffe |

4.2. Differentialscanningkalorimetrie

| | |
|---|---|
| ASTM E 537-76 | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis |
| ASTM E 473-85 | Standard definitions of terms relating to thermal analysis |
| ASTM E 472-86 | Standard practice for reporting thermoanalytical data |
| DIN 51005 | Thermische Analyse, Begriffe |

5. **Stockpunktbestimmung**

| | |
|---|---|
| NBN 52014 | Échantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt |
| ASTM D 97-66 | Standard test method for pour point of petroleum oils |
| ISO 3016 | Petroleum oils — Determination of pour point |

▼B

## A.2. SIEDETEMPERATUR

### 1. METHODEN

Den meisten der hier beschriebenen Methoden liegt die OECD-Prüfrichtlinie (1) zugrunde. Die Grundprinzipien sind in (2) und (3) angegeben.

#### 1.1. EINLEITUNG

Die hier beschriebenen Methoden und Geräte können für flüssige und niedrig schmelzende Substanzen verwendet werden, wenn diese nicht unterhalb der Siedetemperatur chemisch reagieren (z. B. Autooxidation, Umlagerung, Zersetzung usw.). Die Methoden können auf reine und unreine Flüssigkeiten angewendet werden.

Bevorzugt werden die Methoden mit Fotozellendetektion und Thermoanalyse, da diese sowohl die Bestimmung der Schmelz- als auch der Siedetemperatur ermöglichen. Darüber hinaus können die Messungen automatisch durchgeführt werden.

Die „dynamische Methode“ hat den Vorteil, dass sie auch zur Bestimmung des Dampfdrucks verwendet werden kann; dabei ist es nicht erforderlich, die Siedetemperatur auf den Normaldruck (101,325 kPa) zu berichtigen, da der Normdruck während der Messung durch einen Manostaten eingestellt werden kann.

*Bemerkungen*

Der Einfluss von Verunreinigungen auf die Bestimmung der Siedetemperatur hängt weitgehend von der Art der Verunreinigung ab. Wenn hochflüchtige Verunreinigungen in der Probe vertreten sind, die die Ergebnisse beeinträchtigen könnten, kann der Stoff gereinigt werden.

#### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Als Standardsiedetemperatur wird diejenige Temperatur definiert, bei der der Dampfdruck einer Flüssigkeit 101,325 kPa beträgt.

Wenn die Siedetemperatur nicht bei normalem Atmosphärendruck gemessen wird, kann die Temperaturabhängigkeit des Dampfdrucks durch die Clausius-Clapeyron-Gleichung beschrieben werden:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2,3\ RT} + const.$$

Darin bedeuten:

$p$ = Dampfdruck des Stoffes in Pascal

$\Delta H_v$ = Verdampfungswärme in J $mol^{-1}$

$R$ = universelle molare Gaskonstante = 8,314 J $mol^{-1}$ $K^{-1}$

$T$ = thermodynamische Temperatur in K

Die Siedetemperatur wird entsprechend dem Umgebungsdruck bei der Messung eingesetzt.

▼B

*Umrechnungen*

Druck (Einheit: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(„bar“ ist weiterhin zulässig, wird aber nicht empfohlen.)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(Die Einheiten „mm Hg“ und „Torr“ sind nicht zugelassen.)

1 atm = Standard-Atmosphäre = 101 325 Pa

(Die Einheit „atm“ ist nicht zugelassen.)

Temperatur (Einheit: K)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius-Temperatur, in Grad Celsius ( °C)

T: thermodynamische Temperatur, in Kelvin (K)

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Methode von Zeit zu Zeit zu überprüfen und einen Vergleich mit den Ergebnissen aus anderen Methoden zu ermöglichen.

Einige der Eichsubstanzen sind in den in der Anlage aufgeführten Methoden zu finden.

1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Fünf Methoden zur Bestimmung der Siedetemperatur (Siedebereich) beruhen auf der Messung der Siedetemperatur, zwei weitere auf der Thermoanalyse.

1.4.1. **Bestimmung mit dem Ebulliometer**

Ebulliometer wurden ursprünglich zur Bestimmung des Molekulargewichtes durch Erhöhung der Siedetemperatur entwickelt, eignen sich aber auch für genaue Messungen der Siedetemperatur. In ASTM D 1120-72 wird ein sehr einfaches Gerät beschrieben (siehe Anlage). Die Flüssigkeit wird in diesem Gerät unter Gleichgewichtsbedingungen bei atmosphärischem Druck erhitzt, bis sie siedet.

1.4.2. **Dynamische Methode**

Messung der Rekondensationstemperatur des Dampfes mit Hilfe eines geeigneten Thermometers im Rückfluss während des Siedeprozesses. Bei dieser Methode kann der Druck geändert werden.

1.4.3. **Destillationsmethode für die Siedetemperatur**

Destillation der Flüssigkeit und Messung der Rekondensationstemperatur des Dampfes sowie Bestimmung der Destillatmenge.

▼B

1.4.4. **Verfahren nach Siwoloboff**

Erhitzung einer Probe in einem Probenröhrchen, das in ein Wärmebad eingetaucht wird. Ein zugeschmolzenes Kapillarröhrchen, in dessen unterem Teil ein Luftbläschen enthalten ist, wird in das Probenröhrchen getaucht.

1.4.5. **Fotozellendetektion**

Entsprechend dem Prinzip nach Siwoloboff wird unter Verwendung der aufsteigenden Bläschen eine automatische fotoelektrische Messung durchgeführt.

1.4.6. **Differentialthermoanalyse**

Mit diesem Verfahren wird der Temperaturunterschied zwischen der Substanz und einem Referenzmaterial in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet, während die Substanz und das Referenzmaterial demselben kontrollierten Temperaturprogramm ausgesetzt werden. Wenn die Probe eine Phasenumwandlung mit Änderung der Enthalpie durchläuft, dann wird diese Änderung durch ein endothermes Abweichen (Sieden) von der Basis der Temperaturaufzeichnung angezeigt.

1.4.7. **Differentialscanningkalorimetrie**

Mit diesem Verfahren wird der Unterschied in der Energieaufnahme zwischen einer Substanz und einem Referenzmaterial in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet, während die Substanz und das Referenzmaterial demselben kontrollierten Temperaturprogramm ausgesetzt werden. Bei der Energie handelt es sich um diejenige Energie, die notwendig ist, um einen Temperaturabgleich zwischen der Substanz und dem Referenzmaterial zu erreichen. Wenn die Probe eine Phasenumwandlung mit Änderung der Enthalpie durchläuft, dann wird diese Änderung durch ein endothermes Abweichen (Sieden) von der Basis des Wärmeflussbildes angezeigt.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Der Anwendungsbereich und die Genauigkeit der Methoden zur Bestimmung von Siedetemperatur/Siedebereich sind Tabelle 1 zu entnehmen:

*Tabelle 1*

**Vergleich der Methoden**

| Messmethode | Geschätzte Genauigkeit | Existierende Methoden oder Normen |
|---|---|---|
| Ebulliometer | ± 1,4 K (bis 373 K) (1) (2) | ASTM D 1120-72 (1) |
| | ± 2,5 K (bis 600 K) (1) (2) | |
| Dynamische Methode | ± 0,5 K (bis 600 K) (2) | |
| Destillationsmethode (Siedebereich) | ± 0,5 K (bis 600 K) | ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71 |
| nach Siwoloboff | ± 2 K (bis 600 K) (2) | |
| Fotozellendetektion | ± 0,3 K (bei 373 K) (2) | |
| Differentialthermoanalyse | ± 0,5 K (bis 600 K) | ASTM E 537-76 |
| | ± 2,0 K (bis 1 273 K) | |
| Differentialscanningkalorimetrie | ± 0,5 K (bis 600 K) | ASTM E 537-76 |
| | ± 2,0 K (bis 1 273 K) | |

(1) Diese Genauigkeit gilt nur für das einfache Gerät, wie es z. B. in ASTM D 1120-72 beschrieben wird; sie kann durch verfeinerte Ebulliometergeräte verbessert werden.

(2) Gilt nur für reine Substanzen. Die Verwendung in anderen Fällen ist zu begründen.

▼B

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODEN

Die Durchführung einiger der hier aufgeführten Prüfmethoden ist in nationalen und internationalen Normen beschrieben (siehe Anlage).

1.6.1. **Ebulliometer**

Siehe Anlage.

1.6.2. **Dynamische Methode**

Siehe Prüfmethode A.4 für die Bestimmung des Dampfdrucks.

Die bei einem Druck von 101,325 kPa beobachtete Siedetemperatur wird notiert.

1.6.3. **Destillationsverfahren (Siedebereich)**

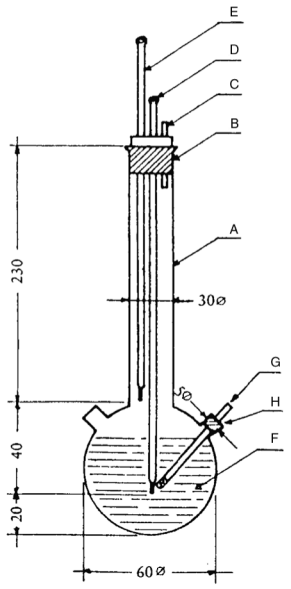
Siehe Anlage.

1.6.4. **Verfahren nach Siwoloboff**

Die Probe wird in einem Probenröhrchen — Durchmesser etwa 5 mm — in einer Apparatur zur Bestimmung der Schmelztemperatur erhitzt (Abbildung 1).

Abbildung 1 zeigt einen Typ einer genormten Apparatur zur Bestimmung der Schmelz- und Siedetemperatur (JIS K 0064); (Glas, alle Dimensionsangaben in mm).

*Abbildung 1*




A: Messkolben
B: Stopfen
C: Druckausgleich
D: Thermometer
E: Hilfsthermometer
F: Badflüssigkeit
G: Probenröhrchen, Außendurchmesser max. 5 mm, mit einem ca. 100 mm langen Kapillarröhrchen mit einem Innendurchmesser von ca. 1 mm und einer Wandstärke von *ca.* 0,2 bis 0,3 mm
H: seitlicher Stutzen

Ein etwa 1 cm über dem unteren Ende zugeschmolzenes Kapillarröhrchen (Siedekapillare) wird in das Probenröhrchen gegeben. Der Pegel, bis zu dem die Prüfsubstanz aufgefüllt wird, ist so zu wählen, dass der zugeschmolzene Abschnitt der Kapillare unter der Flüssigkeitsoberfläche liegt. Das die Siedekapillare enthaltende Probenröhrchen wird entweder mit einem Gummiband am Thermometer oder an einer seitlichen Halterung befestigt (siehe Abbildung 2).

▼B

*Abbildung 2*

**Prinzip nach Siwoloboff**

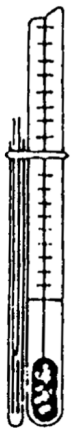
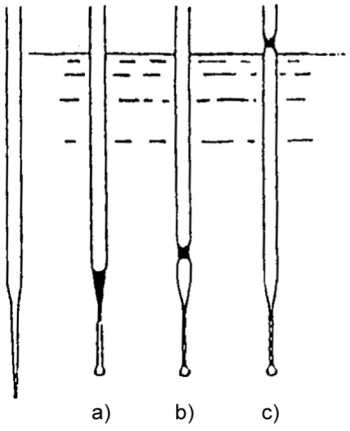


*Abbildung 3*

**Modifiziertes Prinzip**




Die Badflüssigkeit wird entsprechend der Siedetemperatur ausgewählt. Bei Temperaturen bis zu 573 K kann Silikonöl verwendet werden. Paraffinöl darf nur bis 473 K verwendet werden. Die Erhitzung der Badflüssigkeit sollte zunächst mit einer Temperaturrate von 3 K/min erfolgen. Die Badflüssigkeit muss gerührt werden. Ca. 10 K unterhalb der erwarteten Siedetemperatur wird die Erhitzung verlangsamt, so dass die Temperaturerhöhung bei weniger als 1 K/min liegt. Beim Erreichen der Siedetemperatur beginnen Bläschen schnell aus der Siedekapillare aufzusteigen.

Als Siedetemperatur ist diejenige anzugeben, bei welcher die Bläschenkette unter Kühlung abbricht und die Flüssigkeit plötzlich in der Kapillare aufzusteigen beginnt. Der entsprechende Thermometerstand ist gleich der Siedetemperatur der Substanz.

Beim modifizierten Prinzip (Abbildung 3) wird die Siedetemperatur in einem Schmelztemperaturröhrchen bestimmt. Es ist bis auf eine etwa 2 cm lange feine Spitze ausgezogen (a): Eine geringe Menge der Probe wird angesaugt. Das offene Ende des freien Röhrchens wird zugeschmolzen, so dass sich am Ende ein feines Luftbläschen befindet. Bei der Erhitzung in der Apparatur zur Bestimmung der Schmelztemperatur (b) dehnt sich das Luftbläschen aus. Die Siedetemperatur entspricht der Temperatur, bei der der Pfropfen der Substanz den Oberflächenpegel der Badflüssigkeit erreicht (c).

1.6.5. **Fotozellendetektion**

Die Probe wird in einem Kapillarröhrchen in einem Metallblock erhitzt.

Durch entsprechende Öffnungen im Block wird ein Lichtstrahl durch die Substanz auf eine genau kalibrierte Fotozelle ausgerichtet.

Bei der Erhöhung der Temperatur der Probe steigen einzelne Luftbläschen aus der Siedekapillare auf. Wenn die Siedetemperatur erreicht ist, nimmt die Zahl der Bläschen stark zu. Dies führt zu einer von einer Fotozelle aufgezeichneten Änderung in der Lichtintensität und löst ein Signal im Messgerät aus, das die Temperatur eines im Block gelegenen Platin-Widerstandsthermometers anzeigt.

Dieses Verfahren ist besonders nützlich, da es Bestimmungen unterhalb der Raumtemperatur bis zu 253,15 K (– 20 °C) ohne jede apparative Änderung ermöglicht. Das Instrument muss lediglich in ein Kühlbad gestellt werden.

▼B

1.6.6. **Thermoanalyse**

1.6.6.1. *Differentialthermoanalyse*

Siehe Anlage.

1.6.6.2. *Differentialscanningkalorimeter*

Siehe Anlage.

2. **DATEN**

Bei geringfügigen Abweichungen vom Normaldruck (maximal ± 5 kPa) werden die Siedetemperaturen mit Hilfe der nachstehenden Sidney-Young-Zahlen-Wert-Gleichung auf $T_n$ umgerechnet:

$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$

Darin bedeuten:

$\Delta p$ = (101,325 - p) [Vorzeichen beachten]

p = Barometermessung in kPa

$f_T$ = Korrekturfaktor für die Änderung der Siedetemperatur in Abhängigkeit vom Druck in K/kPa

T = gemessene Siedetemperatur in K

$T_n$ = Siedetemperatur, berichtigt auf Normaldruck in K

Die Temperatur-Korrekturfaktoren $f_T$ und die Gleichungen für ihre Näherung sind für zahlreiche Stoffe in den erwähnten internationalen und nationalen Normen (Anlage) aufgeführt.

So gibt beispielsweise die Vorschrift nach DIN 53171 die folgenden ungefähren Korrekturen für Lösungsmittel in Anstrichstoffen.

*Tabelle 2*

**Temperatur-Korrekturfaktoren $f_T$**

| Temperatur T (K) | Korrekturfaktor $f_T$ (K/kPa) |
|---|---|
| 323,15 | 0,26 |
| 348,15 | 0,28 |
| 373,15 | 0,31 |
| 398,15 | 0,33 |
| 423,15 | 0,35 |
| 448,15 | 0,37 |
| 473,15 | 0,39 |
| 498,15 | 0,41 |
| 523,15 | 0,44 |
| 548,15 | 0,45 |
| 573,15 | 0,47 |

▼B

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— verwendetes Verfahren,

— genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen), ggf. Vorreinigung,

— eine ungefähre Angabe zur Genauigkeit.

Der Mittelwert mindestens zweier Messungen, deren Werte im Bereich der ungefähren Genauigkeit (siehe Tabelle 1 oben) liegen, ist als Siedetemperatur anzugeben.

Die gemessenen Siedetemperaturen und ihr Mittelwert sowie der Druck (die Drücke) in kPa, bei dem (bei denen) die Messungen durchgeführt wurden, sind anzugeben. Der Druck sollte möglichst nahe beim Normaldruck liegen.

Alle zur Bewertung der Ergebnisse notwendigen Informationen und Bemerkungen sind zu notieren, insbesondere diejenigen über Verunreinigungen und den Aggregatzustand des Stoffes.

4. **LITERATUR**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar (Hrsg.): Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger (Hrsg.): Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

▼B

*Anlage*

*Zu weiteren technischen Einzelheiten können beispielsweise folgende Normen herangezogen werden:*

1. **Ebulliometer**

1.1. Schmelztemperaturbestimmungsgeräte mit Flüssigkeitsbad

| | |
|---|---|
| ASTM D 1120-72 | Standard test method for boiling point of engine anti-freezes |

2. **Destillationsverfahren (Siedebereich)**

| | |
|---|---|
| ISO/R 918 | Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range) |
| BS 4349/68 | Method for determination of distillation of petroleum products |
| BS 4591/71 | Method for the determination of distillation characteristics |
| DIN 53171 | Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufs |
| NF T 20-608 | Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation |

3. **Differentialthermoanalyse und Differentialscanningkalorimetrie**

| | |
|---|---|
| ASTM E 537-76 | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis |
| ASTM E 473-85 | Standard definitions of terms relating to thermal analysis |
| ASTM E 472-86 | Standard practice for reporting thermoanalytical data |
| DIN 51005 | Thermische Analyse: Begriffe |

▼B

## A.3. RELATIVE DICHTE

### 1. METHODEN

Den hier beschriebenen Methoden liegt die OECD-Prüfrichtlinie (1) zugrunde. Die Grundprinzipien sind in (2) angegeben.

#### 1.1. EINLEITUNG

Die hier beschriebenen Methoden zur Bestimmung der relativen Dichte gelten für Feststoffe und Flüssigkeiten ohne jede Einschränkung in Bezug auf ihren Reinheitsgrad. Die verschiedenen zu verwendenden Methoden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

#### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Die relative Dichte von Feststoffen oder Flüssigkeiten ist das Verhältnis zwischen der Masse eines bestimmten Volumens der Prüfsubstanz, gemessen bei 20 °C, und der Masse des gleichen Volumens Wasser, bestimmt bei 4 °C. Die relative Dichte hat keine Einheit.

Die Dichte $\rho$ eines Stoffes ist gleich dem Quotienten aus seiner Masse m und seinem Volumen v.

Die Dichte $\rho$ wird in SI-Einheiten ($kg/m^3$) angegeben.

#### 1.3. REFERENZSUBSTANZEN (1) (3)

Bei der Messung der relativen Dichte von Prüfsubstanzen brauchen im Allgemeinen Referenzsubstanzen nicht verwendet zu werden. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Methode von Zeit zu Zeit zu überprüfen und einen Vergleich mit den Ergebnissen aus anderen Methoden zu ermöglichen.

#### 1.4. PRINZIP DER METHODEN

Es werden vier Messprinzipien verwendet.

##### 1.4.1. **Auftriebsmethoden**

###### 1.4.1.1. *Aräometer* (für Flüssigkeiten)

Hinreichend genaue und schnelle Bestimmungen der Dichte können mit Aräometern erreicht werden, bei denen die Dichte einer Flüssigkeit durch Ablesen der Eintauchtiefe des Schwimmkörpers an einer graduierten Skala ermittelt werden kann.

###### 1.4.1.2. *Hydrostatische Waage* (für Flüssigkeiten und Feststoffe)

Der Unterschied zwischen dem Gewicht eines in Luft und in einer geeigneten Flüssigkeit (z. B. Wasser) gemessenen Prüfkörpers kann zur Bestimmung seiner Dichte verwendet werden.

Bei Feststoffen ist die gemessene Dichte nur für die verwendete Probe repräsentativ. Zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten wird ein Körper eines bekannten Volumens v zunächst in der Luft und dann in der Flüssigkeit gewogen.

###### 1.4.1.3. *Tauchkörpermethode* (für Flüssigkeiten) (4)

Bei dieser Methode wird die Dichte einer Flüssigkeit aus der Differenz zwischen den Ergebnissen der Wägung des Tauchkörpers bekannten Volumens vor und nach dem Eintauchen dieses Körpers in die Prüfflüssigkeit ermittelt.

▼B

1.4.2. **Pyknometer-Methoden**

Für Feststoffe oder Flüssigkeiten können Pyknometer verschiedener Formen mit bekannten Volumina verwendet werden. Die Dichte wird aus der Differenz zwischen der Wägung des vollen und des leeren Pyknometers und seinem bekannten Volumen errechnet.

1.4.3. **Luftvergleichspyknometer** (für Feststoffe)

Die Dichte eines Feststoffes beliebiger Form kann bei Raumtemperatur mit dem Gasvergleichspyknometer gemessen werden. Das Volumen einer Substanz wird in der Luft oder in einem Inertgas in einem Zylinder mit veränderbarem kalibrierten Volumen gemessen. Zur Berechnung der Dichte wird nach Abschluss der Volumenmessung eine Wägung durchgeführt.

1.4.4. **Schwingungsdichtemesser** (5) (6) (7)

Die Dichte einer Flüssigkeit kann mit einem Schwingungsdichtemesser gemessen werden. Ein in Form eines U-Rohres gebauter mechanischer Oszillator wird in Schwingungen versetzt; die Resonanzfrequenz des Oszillators hängt von dessen Masse ab. Bei Einführung einer Probe in das U-Rohr ändert sich die Resonanzfrequenz des Oszillators. Das Gerät muss mit Hilfe von zwei Flüssigkeiten bekannter Dichte kalibriert werden. Diese Flüssigkeiten sollten möglichst so gewählt werden, dass ihre Dichte den zu messenden Bereich einschließt.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Der Anwendungsbereich der verschiedenen zur Bestimmung der relativen Dichte verwendeten Methoden ist der nachstehenden Tabelle zu entnehmen.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODEN

Die als Beispiel aufgeführten Normen, die im Hinblick auf weitere technische Einzelheiten herangezogen werden müssen, sind als Anlage beigefügt.

Die Prüfungen sind bei 20 °C durchzuführen, wobei mindestens zwei Messungen vorzunehmen sind.

2. **DATEN**

Siehe Normen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— verwendetes Verfahren,

— genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen), ggf. Vorreinigung.

Die relative Dichte $D_4^{20}$ soll gemäß 1.2 zusammen mit dem Aggregatzustand des gemessenen Stoffes angegeben werden.

Alle zur Bewertung der Ergebnisse notwendigen Informationen und Bemerkungen sind zu notieren, insbesondere diejenigen über Verunreinigungen des Stoffes.

▼B

*Tabelle*

**Anwendbarkeit der Methoden**

| Messmethode | Dichte | | Möglicher Höchstwert der dynamischen Viskosität | Existierende Normen |
|---|---|---|---|---|
| | Feststoffe | Flüssigkeit | | |
| 1.4.1.1. Aräometer | | ja | 5 Pa s | ISO 387,<br>ISO 649-2,<br>NF T 20-050 |
| 1.4.1.2. Hydrostatische Waage | | | | |
| a) Feststoffe | ja | | | ISO 1183 (A) |
| b) Flüssigkeit | | ja | 5 Pa s | ISO 901 und 758 |
| 1.4.1.3. Tauchkörpermethode | | ja | 20 Pa s | DIN 53217 |
| 1.4.2. Pyknometer | | | | ISO 3507, |
| a) Feststoffe | ja | | | ISO 1183 (B),<br>NF T 20-053, |
| b) Flüssigkeit | | ja | 500 Pa s | ISO 758 |
| 1.4.3. Luftvergleichspyknometer | ja | | | DIN 55990 Teil 3,<br>DIN 53243 |
| 1.4.4. Schwingungsdichtemesser | | ja | 5 Pa s | |

4. **LITERATUR**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger (Hrsg.), Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508,

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen (tm), 1979, vol. 11, 427-430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297-302.

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717-726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253-255.

▼B

*Anlage*

*Für weitere technische Einzelheiten können beispielsweise folgende Normen herangezogen werden:*

1. **Auftriebsmethoden**

1.1. Aräometer

| | |
|---|---|
| DIN 12790, ISO 387 | Aräometer; allgemeine Bestimmungen |
| DIN 12791 | Teil 1: Dichte-Aräometer; Grundserien, Ausführung, Justierung und Anwendung<br>Teil 2: Dichte-Aräometer; Normgrößen, Bezeichnungen<br>Teil 3: Anwendung und Prüfung |
| ISO 649-2 | Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose |
| NF T 20-050 | Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method |
| DIN 12793 | Laborgeräte aus Glas: Sucharäometer für Vormessung und rohe Betriebsmessung |

1.2. Hydrostatische Waage

*Für Feststoffe:*

| | |
|---|---|
| ISO 1183 | Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics |
| NF T 20-049 | Chemical products for industrial use — Determination of the density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method |
| ASTM-D-792 | Specific gravity and density of plastics by displacement |
| DIN 53479 | Prüfung von Kunststoffen und Elastomeren; Bestimmung der Dichte |

*Für Flüssigkeiten:*

| | |
|---|---|
| ISO 901 | ISO 758 |

▼B

| | | |
|---|---|---|
| | DIN 51757 | Prüfung von Mineralölen und verwandten Stoffen; Bestimmung der Dichte |
| | ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 und ASTM D 1481-62 | |
| | ASTM D 1298 | Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method |
| | BS 4714 | Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method |
| 1.3. | Tauchkörpermethode | |
| | DIN 53217 | Prüfung von Anstrichstoffen; Bestimmung der Dichte; Tauchkörpermethode |
| 2. | **Pyknometer-Methoden** | |
| 2.1. | Für Flüssigkeiten: | |
| | ISO 3507 | Pycnometers |
| | ISO 758 | Liquid chemical products; determination of density at 20 °C |
| | DIN 12797 | Pyknometer nach Gay-Lussac (für nicht besonders viskose, nicht flüchtige Flüssigkeiten) |
| | DIN 12798 | Pyknometer nach Lipkin (für Flüssigkeiten mit einer kinematischen Viskosität von weniger als 100, $10^{-6}$ $m^2$ $s^{-1}$ bei 15 °C) |
| | DIN 12800 | Pyknometer nach Sprengel (für Flüssigkeiten wie in DIN 12798) |
| | DIN 12801 | Pyknometer nach Reischauer (für Flüssigkeiten mit einer kinematischen Viskosität von weniger als 100, $10^{-6}$ $m^2$ $s^{-1}$ bei 20 °C; kann insbesondere auf Kohlenwasserstoffe sowie auf Flüssigkeiten mit hohem Dampfdruck — etwa 1 bar bei 90 °C — angewendet werden) |

▼B

| | |
|---|---|
| DIN 12806 | Pyknometer nach Hubbard (für viskose Flüssigkeiten aller Arten, die keinen zu hohen Dampfdruck aufweisen, insbesondere auch für Anstrichstoffe und Bitumen) |
| DIN 12807 | Pyknometer nach Bingham (für Flüssigkeiten wie in DIN 12801) |
| DIN 12808 | Pyknometer nach Jaulmes (insbesondere für Ethanol-Wasser-Gemisch) |
| DIN 12809 | Pyknometer mit eingeschliffenem Thermometer und Seitenkapillaren (für nicht besonders viskose Flüssigkeiten) |
| DIN 53217 | Prüfung von Anstrichstoffen; Bestimmung der Dichte mit dem Pyknometer |
| DIN 51757 | Punkt 7: Prüfung von Mineralölen und verwandten Stoffen; Bestimmung der Dichte |
| ASTM D 297 | (Section 15: Rubber products — chemical analysis) |
| ASTM D 2111 | (Method C: Halogenated organic compounds) |
| BS 4699 | Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method) |
| BS 5903 | Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method |
| NF T 20-053 | Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pycnometric method |

▼B

2.2. Für Feststoffe:

| | |
|---|---|
| ISO 1183 | Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics |
| NF T 20-053 | Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pycnometric method |
| DIN 19683 | Bestimmung der Dichte von Böden |

3. **Luftvergleichspyknometer**

| | |
|---|---|
| DIN 55990 | Teil 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte |
| DIN 53243 | Anstrichstoffe; chlorhaltige Polymere; Prüfung |

▼M1

## A.4. DAMPFDRUCK

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der Prüfrichtlinie OECD TG 104 (2004).

### 1.1. EINLEITUNG

Diese geänderte Fassung von Methode A.4 (1) beinhaltet als zusätzliche Methode die „Effusionsmethode: isotherme Thermogravimetrie“; diese Methode wurde entwickelt für Substanzen mit sehr niedrigen Drücken (bis zu einem Mindestdruck von $10^{-10}$ Pa). Angesichts der Verfahrenserfordernisse, insbesondere bei der Ermittlung des Dampfdrucks für Substanzen mit niedrigem Dampfdruck, werden auch andere Verfahren zur Anwendung dieser Methode im Hinblick auf sonstige Einsatzbereiche neu bewertet.

Bei thermodynamischem Gleichgewicht hängt der Dampfdruck einer reinen Substanz ausschließlich von der Temperatur ab. Die zugrunde liegenden Prinzipien werden an anderer Stelle erläutert (2)(3).

Kein einzelnes Messverfahren ist für sämtliche Dampfdrucke von unter $10^{-10}$ Pa bis zu $10^5$ Pa geeignet. Entsprechend umfasst diese Beschreibung acht Methoden zur Messung des Dampfdrucks, die in verschiedenen Dampfdruckbereichen eingesetzt werden können. Die vorgesehenen Einsatzmöglichkeiten und Messbereiche der einzelnen Methoden sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Methoden können nur im Zusammenhang mit Verbindungen eingesetzt werden, bei denen unter den Testbedingungen kein Abbau erfolgt. In Fällen, in denen die Versuchsmethoden aus technischen Gründen nicht eingesetzt werden können, kann der Dampfdruck auch geschätzt werden; eine empfohlene Schätzmethode wird in der Anlage beschrieben.

### 1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND EINHEITEN

Als Dampfdruck einer Substanz wird der Sättigungsdruck über einer festen oder flüssigen Substanz bezeichnet.

In den Messungen sollte die Einheit Pascal (Pa) als SI-Einheit für Druckwerte verwendet werden. Im Folgenden sind weitere, früher verwendete Einheiten jeweils mit den entsprechenden Umrechnungsfaktoren zusammengestellt:

| | | |
|---|---|---|
| 1 Torr | = 1 mm Hg | = $1{,}333 \times 10^2$ Pa |
| 1 Atmosphäre | = $1{,}013 \times 10^5$ Pa | |
| 1 bar | = $10^5$ Pa | |

Die SI-Einheit der Temperatur ist Kelvin (K). Angaben in Grad Celsius werden mit folgender Formel in Kelvin umgerechnet:

$$T = t + 273{,}15$$

wobei T = Kelvin oder thermodynamische Temperatur und t = Temperatur in Grad Celsius

▼**M1**

*Tabelle 1*

| Messmethode | Substanzen | | Geschätzte Wiederholbarkeit | Geschätzte Reproduzierbarkeit | Empfohlener Bereich |
|---|---|---|---|---|---|
| | Fest | Flüssig | | | |
| Dynamische Methode | niedriger Schmelzpunkt | ja | bis zu 25 %<br>1 bis 5 % | bis zu 25 %<br>1 bis 5 % | $10^3$ Pa bis $2 \times 10^3$ Pa<br>$2 \times 10^3$ Pa bis $10^5$ Pa |
| Statische Methode | ja | ja | 5 bis 10 % | 5 bis 10 % | 10 Pa bis $10^5$ Pa<br>$10^{-2}$ Pa bis $10^5$ Pa (1) |
| Isoteniskopmethode | ja | ja | 5 bis 10 % | 5 bis 10 % | $10^2$ Pa bis $10^5$ Pa |
| Effusionsmethode: Dampfdruckgleichgewicht | ja | ja | 5 bis 20 % | bis zu 50 % | $10^{-3}$ bis 1 Pa |
| Effusionsmethode: Knudsen-Zelle | ja | ja | 10 bis 30 % | — | $10^{-10}$ bis 1 Pa |
| Effusionsmethode: isotherme Thermogravimetrie | ja | ja | 5 bis 30 % | bis zu 50 % | $10^{-10}$ bis 1 Pa |
| Gassättigungsmethode | ja | ja | 10 bis 30 % | bis zu 50 % | $10^{-10}$ bis $10^3$ Pa |
| Rotationsmethode | ja | ja | 10 bis 20 % | — | $10^{-4}$ bis 0,5 Pa |

(1) In Verbindung mit einem Kapazitätsmanometer.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Im Allgemeinen wird der Dampfdruck bei verschiedenen Temperaturen gemessen. In einem begrenzten Temperaturbereich ist der Logarithmus des Dampfdrucks einer reinen Substanz eine lineare Umkehrfunktion der thermodynamischen Temperatur gemäß der vereinfachten Clapeyron-Clausius-Gleichung:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2,3RT} + constant$$

wobei

p = Dampfdruck in Pascal

ΔHv = Verdampfungswärme in J $mol^{-1}$

R = universale Gaskonstante, 8,314 J $mol^{-1}$ $K^{-1}$

T = Temperatur in K

▼**M1**

1.4. REFERENZSUBSTANZEN

Referenzsubstanzen brauchen nicht unbedingt verwendet zu werden. Sie dienen in erster Linie zur gelegentlichen Überprüfung der Leistungsfähigkeit einer Methode und sollen Vergleiche der mit unterschiedlichen Methoden erzielten Ergebnisse ermöglichen.

1.5. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.5.1. **Dynamische Methode (Cottrell-Verfahren)**

1.5.1.1. *Prinzip*

Der Dampfdruck wird durch die Messung der Siedetemperatur einer Substanz bei verschiedenen vorgegebenen Drücken zwischen etwa $10^3$ und $10^5$ Pa gemessen. Diese Methode wird auch für die Bestimmung der Siedetemperatur empfohlen. Für diesen Zweck kann die Methode bei Temperaturen bis zu 600 K eingesetzt werden. Wegen des hydrostatischen Drucks der Flüssigkeitssäule liegen die Siedetemperaturen von Flüssigkeiten bei einer Tiefe von 3 bis 4 cm etwa 0,1 °C höher als an der Oberfläche. Beim Cottrell-Verfahren (4) wird das Thermometer über der Flüssigkeit in den Dampf gebracht und die siedende Flüssigkeit kontinuierlich über die Thermometerkugel gepumpt. Eine dünne Flüssigkeitsschicht, die sich bei Atmosphärendruck im Gleichgewicht mit dem Dampf befindet, bedeckt die Kugel. Das Thermometer gibt dann den echten Siedepunkt an; Fehler durch Überhitzung oder hydrostatischen Druck werden ausgeschlossen. Die ursprünglich von Cottrell verwendete Pumpe ist in Abbildung 1 dargestellt. Rohr A enthält die siedende Flüssigkeit. Ein Platindraht B, der in den Boden eingesiegelt wurde, begünstigt ein gleichmäßiges Siedeverhalten. Das seitliche Rohr C führt zu einem Kondensator, und der Spritzschutz D verhindert, dass das kalte Kondensat in das Thermometer E gelangt. Wenn die Flüssigkeit in A siedet, werden die entstehenden Blasen und die Flüssigkeit mit dem Trichter abgetrennt und über die beiden Arme der Pumpe F über die Thermometerkugel gegossen.

*Abbildung 1*

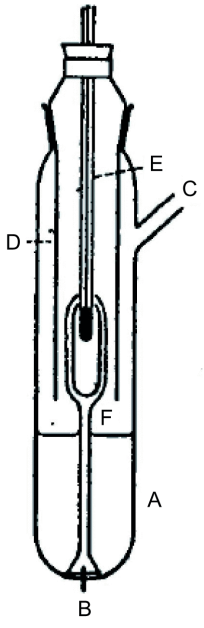
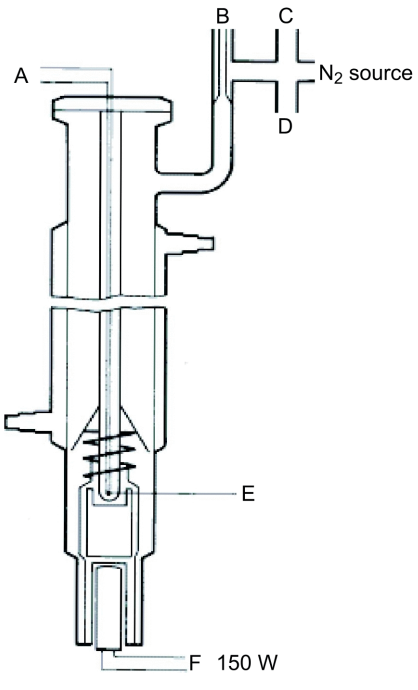



*Abbildung 2*



▼**M1**

Cottrell-Pumpe (4)

A: Thermoelement

B: Vakuum-Puffervolumen

C: Druckmesser

D: Unterdruck

E: Messpunkt

F: Heizelement ca. 150 W

1.5.1.2. *Apparatur*

In Abbildung 2 ist eine sehr genaue Apparatur dargestellt, die auf dem Cottrell-Prinzip beruht. Die Apparatur besteht aus einem Rohr mit einem Siedebereich im unteren Teil, einem Kühler im mittleren Bereich und einem Auslass und einem Flansch im oberen Bereich. Die Cottrell-Pumpe befindet sich im Siedebereich, der mit einer elektrischen Patrone beheizt wird. Die Temperatur wird mit einem ummantelten Thermoelement oder einem Widerstandsthermomenter gemessen, das über den oben befindlichen Flansch in das Gerät geführt wird. Der Auslass ist mit einem Druckregelsystem verbunden. Letzteres besteht aus einer Vakuumpumpe, einem Puffervolumen, einem Druckwächter zur Druckregulierung unter Stickstoffeinleitung und einem Druckmesser.

1.5.1.3. *Verfahren*

Die Substanz wird in den Siedebereich gebracht. Bei nicht pulverigen Feststoffen können Probleme auftreten, die sich gelegentlich aber durch Beheizung des Kühlmantels beheben lassen. Die Apparatur ist am Flansch versiegelt, und die Prüfsubstanz wird entgast. Schäumende Substanzen können mit dieser Methode nicht gemessen werden.

In der Apparatur wird der niedrigste gewünschte Druck eingestellt und die Heizung eingeschaltet. Dann wird der Temperatursensor mit einem Aufzeichnungsgerät verbunden.

Das Gleichgewicht ist dann erreicht, wenn eine gleichbleibende Siedetemperatur bei konstantem Druck aufgezeichnet wird. Insbesondere ist darauf zu achten, dass während des Siedevorgangs nicht gegen die Apparatur gestoßen wird. Außerdem muss auf dem Kühler eine vollständige Kondensation erfolgen. Bei der Bestimmung des Dampfdrucks von niedrigschmelzenden Feststoffen ist darauf zu achten, dass der Kondensator nicht verblockt.

Nach der Aufzeichnung dieses Gleichgewichtspunkts wird ein höherer Druck eingestellt. Der Prozess wird auf diese Weise fortgesetzt, bis ein Druck von $10^5$ Pa erreicht ist (insgesamt etwa 5 bis 10 Messpunkte). Zur Kontrolle sind die Gleichgewichtspunkte bei abnehmenden Drücken zu reproduzieren.

1.5.2. **Statische Methode**

1.5.2.1. *Prinzip*

Bei der statischen Methode (5) wird der Dampfdruck bei thermodynamischem Gleichgewicht und einer gegebenen Temperatur bestimmt. Diese Methode eignet sich für Substanzen und für aus mehreren Bestandteilen bestehende Flüssigkeiten und Feststoffe im Druckbereich von $10^{-1}$ bis $10^5$ Pa sowie bei entsprechend sorgfältiger Vorgehensweise auch im Bereich von 1 bis 10 Pa.

▼**M1**

1.5.2.2. *Apparatur*

Die Apparatur besteht aus einem Bad mit konstanter Temperatur (Genauigkeit ± 0,2 K), einem mit einer Unterdruckleitung verbundenen Probenbehälter, einem Druckmesser und einem System zur Druckregelung. Die Probenkammer (Abbildung 3a) ist über ein Ventil und einen Differenzdruckmesser (ein U-Rohr mit einer geeigneten Manometerflüssigkeit) verbunden, das als Nullpunktanzeige dient. Im Differenzdruckmesser können Quecksilber, Silikone und Phthalate verwendet werden; maßgeblich sind der jeweilige Druckbereich und das chemische Verhalten der Prüfsubstanz. Aus Gründen des Umweltschutzes sollte nach Möglichkeit jedoch auf Quecksilber verzichtet werden. Die Prüfsubstanz darf sich nicht merklich in der im U-Rohr enthaltenen Flüssigkeit auflösen oder mit dieser reagieren. Statt eines U-Rohrs kann auch ein Druckmesser verwendet werden (Abbildung 3b). Für den Druckmesser kann Quecksilber im Bereich des Atmosphärendrucks bis zu einem Mindestdruck von $10^2$ Pa eingesetzt werden; Silikon-Flüssigkeiten und Phthalate sind für Drücke unter $10^2$ Pa bis zu 10 Pa geeignet. Unter $10^2$ Pa können sonstige Druckmesser eingesetzt werden; Kapazitätsmanometer mit Heizmembran können sogar bei Drücken unter $10^{-1}$ Pa verwendet werden. Die Temperatur wird an der Außenwand des Probenbehälters oder im Behälter selbst gemessen.

1.5.2.3. *Verfahren*

In der in Abbildung 3a beschriebenen Apparatur wird das U-Rohr mit der gewählten Flüssigkeit gefüllt; vor Durchführung der Messungen ist die Flüssigkeit bei höherer Temperatur zu entgasen. Die Prüfsubstanz wird in die Apparatur gebracht und bei niedrigerer Temperatur entgast. Bei aus mehreren Bestandteilen bestehenden Proben sollte die Temperatur so niedrig sein, dass die Zusammensetzung des jeweiligen Materials erhalten bleibt. Durch Rühren kann das erforderliche Gleichgewicht schneller herbeigeführt werden. Die Probe kann dann mit flüssigem Stickstoff oder mit Trockeneis abgekühlt werden. Dabei ist allerdings sicherzustellen, dass die Luft oder die Pumpflüssigkeit nicht kondensieren. Bei geöffnetem Ventil über der Probe wird über mehrere Minuten ein Sog ausgeübt, um die eingeschlossene Luft zu entfernen. Wenn erforderlich, wird die Entgasung mehrmals wiederholt.

*Abbildung 3a*

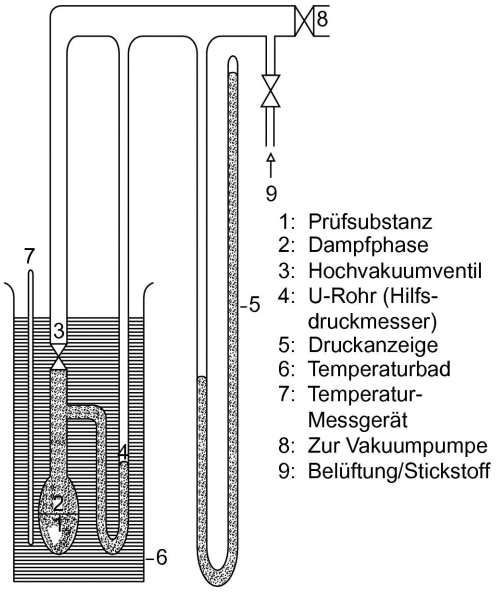
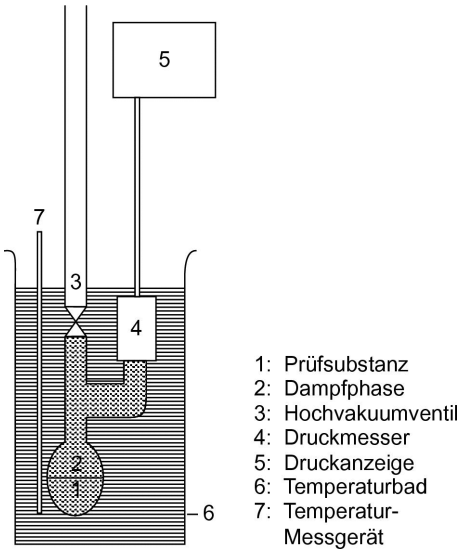



*Abbildung 3b*



▼**M1**

Wenn die Probe bei geschlossenem Ventil beheizt wird, erhöht sich der Dampfdruck. Dadurch ändert sich das Gleichgewicht der Flüssigkeit im U-Rohr. Um die Änderung auszugleichen, wird Stickstoff oder Luft in die Apparatur geleitet, bis die Differenzdruckanzeige wieder auf null steht. Der dazu erforderliche Druck kann an einem Druckmesser oder an einem genaueren Messgerät abgelesen werden. Dieser Druck entspricht dem Dampfdruck der Substanz bei der Messtemperatur. Bei der in Abbildung 3b dargestellten Apparatur wird der Dampfdruck direkt abgelesen.

Der Dampfdruck wird in geeigneten geringen Temperaturintervallen (insgesamt etwa 5 bis 10 Messpunkte) bis zur gewünschten Höchsttemperatur gemessen.

Zur Kontrolle sind Messungen bei niedrigen Temperaturen durchzuführen. Wenn die in den mehrfachen Messungen ermittelten Werte nicht auf der Kurve liegen, die sich bei den höheren Temperaturen ergibt, kann dies auf eine der folgenden Ursachen zurückzuführen sein:

i) Die Probe enthält noch Luft (z. B. bei hoch viskosen Materialien) oder Substanzen mit niedrigem Siedepunkt, die während der Erwärmung freigesetzt werden.

ii) Die Substanz durchläuft im untersuchten Temperaturbereich eine chemische Reaktion (z. B. eine Zersetzung oder eine Polymerisierung).

1.5.3. **Isoteniskopmethode**

1.5.3.1. *Prinzip*

Das Isoteniskop (6) beruht auf dem Prinzip der statischen Methode. Bei dieser Methode wird eine Probe in einen Kolben gebracht, in dem eine gleichbleibende Temperatur besteht, und der mit einem Druckmesser und einer Vakuumpumpe verbunden ist. Verunreinigungen mit höherer Flüchtigkeit als die Prüfsubstanz werden durch Entgasen bei reduziertem Druck entfernt. Der Dampfdruck der Probe bei bestimmten Temperaturen wird durch einen mit einem inerten Gas ausgeübten bekannten Druck ausgeglichen. Das Isoteniskop wurde entwickelt, um den Dampfdruck bestimmter flüssiger Kohlenwasserstoffe zu messen, kann aber auch zur Untersuchung von Feststoffen eingesetzt werden. Für Systeme mit mehreren Bestandteilen ist diese Methode im Allgemeinen nicht geeignet. Die Ergebnisse weisen nur leichte Fehler bei Proben mit nicht flüchtigen Verunreinigungen auf. Die Methode wird für den Bereich $10^2$ bis $10^5$ Pa empfohlen.

1.5.3.2. *Apparatur*

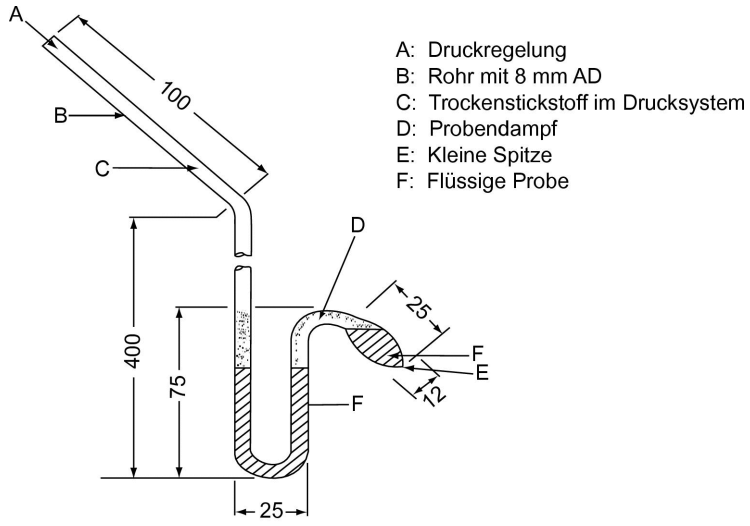
In Abbildung 4 wird ein Messsystem dargestellt. Eine vollständige Beschreibung ist ASTM D 2879-86 (6) zu entnehmen.

▼**M1**

1.5.3.3. *Verfahren*

Bei Flüssigkeiten dient die Substanz selbst als Flüssigkeit im Differenzdruckmesser. In das Isoteniskop wird so viel Flüssigkeit eingebracht, dass der Kolben und der kurze Fuß des Druckmessers gefüllt sind. Das Isoteniskop wird mit einem Vakuumsystem verbunden und mit Hilfe des Vakuumsystems vollständig entleert. Anschließend wird das Isoteniskop mit Stickstoff gefüllt. Die Absaugung und die Reinigung des Systems wird zweimal wiederholt, um den verbliebenen Sauerstoff zu entfernen. Das befüllte Isoteniskop wird in horizontal ausgerichtet, damit sich die Probe in Kolben und Druckmesser als dünne Schicht ausbreitet. Der Systemdruck wird auf 133 Pa reduziert, und die Probe wird allmählich erwärmt, bis eben der Siedepunkt erreicht ist (Abtrennung gelöster Gase). Danach wird das Isoteniskop so ausgerichtet, dass die Probe wieder in den Kolben zurückfließt und den kurzen Fuß des Druckmessers ausfüllt. Dabei wird ein Druck von 133 Pa aufrechterhalten. Die vorgezogene Spitze des Probenkolbens wird mit kleiner Flamme erwärmt, bis sich der freigesetzte Probendampf hinreichend ausgedehnt hat, um einen Teil der Probe aus dem oberen Bereich des Kolbens und des Druckmesserarms in den Druckmesser hinein zu verdrängen und somit einen stickstofffreien Raum mit Dampf gefüllt hat. Darauf wird das Isoteniskop in ein Bad mit konstanter Temperatur gebracht, und Druck und Stickstoffzufuhr werden so eingestellt, dass sie mit dem Druck und dem Stickstoffanteil der Probe übereinstimmen. Wenn das erwünschte Gleichgewicht erreicht ist, entspricht der Stickstoffdruck dem Dampfdruck der Prüfsubstanz.

*Abbildung 4*




(Abmessungen in mm)

Bei Feststoffen sowie je nach Druck- und Temperaturbereich werden Manometerflüssigkeiten wie z. B. Silikon-Flüssigkeiten oder Phthalate verwendet. Die entgaste Manometerflüssigkeit wird in eine dafür vorgesehene Aufwölbung am langen Arm des Isoteniskops gebracht. Anschließend wird der zu prüfende Feststoff in den Probenkolben gegeben und bei einer höheren Temperatur entgast. Darauf wird das Isoteniskop so geneigt, dass die Manometerflüssigkeit in das U-Rohr fließen kann.

▼M1

1.5.4. **Effusionsmethode: Dampfdruckgleichgewicht** (7)

1.5.4.1. *Prinzip*

Eine Probe der Prüfsubstanz wird in einem kleinen Ofen erhitzt und in eine Gasglocke gebracht, in der ein Unterdruck hergestellt wurde. Der Ofen wird mit einem Deckel verschlossen, in dem sich kleine Löcher mit einem bestimmten Durchmesser befinden. Der aus der Substanz erzeugte Dampf entweicht durch eines dieser Löcher und wird unmittelbar auf die Schale einer hoch empfindlichen Waage geleitet, die sich ebenfalls im Vakuum der Glasglocke befindet. Bei manchen Ausführungen ist die Waagschale von einem Kühlgefäß umgeben, über das die Wärme thermisch abgeleitet und unter Abstrahlung der Wärme so gekühlt wird, dass sich der entweichende Dampf darauf niederschlägt. Die Energie des Dampfstrahls wirkt als Kraft auf die Waage. Der Dampfdruck kann auf zweierlei Weise ermittelt werden: entweder direkt aus der auf die Waagschale wirkenden Kraft oder mit Hilfe der Hertz-Knudsen-Gleichung aufgrund der Verdampfungsgeschwindigkeit (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\pi RT \times 10^3}{M}}$$

wobei

G = Verdampfungsgeschwindigkeit (kg $s^{-1}$ $m^{-2}$)

M = Molmasse (g $mol^{-1}$)

T = Temperatur (K)

R = Universale Gaskonstante (J $mol^{-1}$ $K^{-1}$)

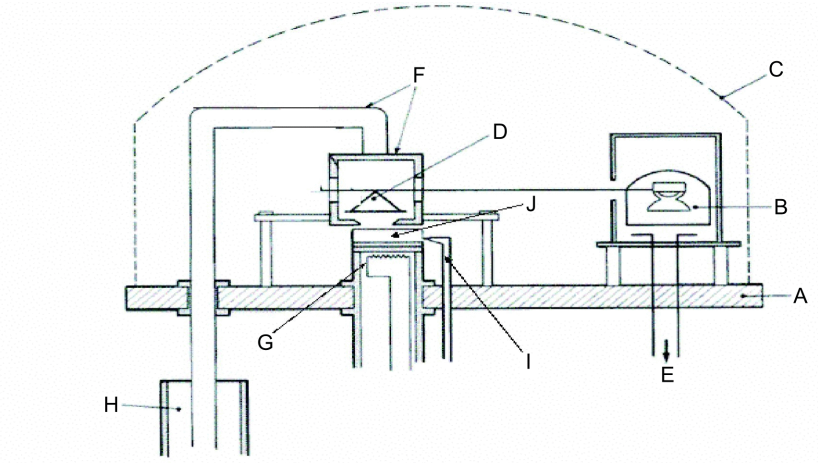
P = Dampfdruck (Pa)

Der empfohlene Bereich liegt zwischen $10^{-3}$ und 1 Pa.

1.5.4.2. *Apparatur*

Abbildung 5 veranschaulicht das Grundprinzip der Apparatur:

*Abbildung 5*




A: Bodenplatte
B: Bewegliches Kühlinstrument
C: Gasglocke
D: Waage mit Waagschale
E: Vakuummessgerät
F: Kühlgehäuse und Kühlschiene
G: Verdampfungsofen
H: Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff
I: Messung der Probentemperatur
J: Prüfsubstanz

▼**M1**

1.5.5. **Effusionsmethode: Knudsen-Zelle**

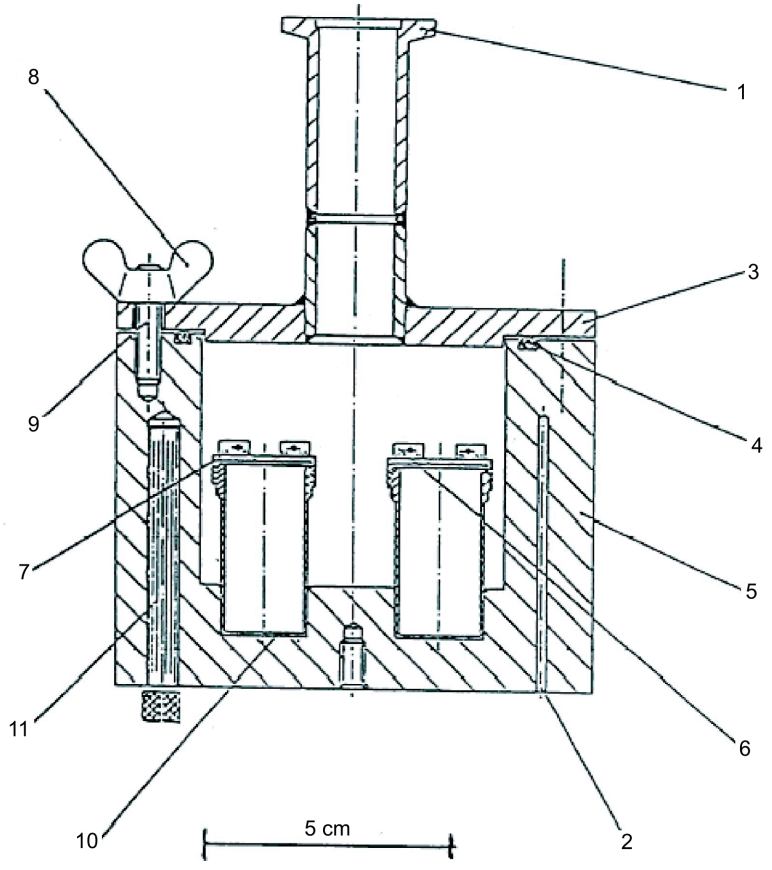
1.5.5.1. *Prinzip*

Die Methode beruht auf der Schätzung der Masse der Prüfsubstanz, die im Ultravakuum pro Zeiteinheit aus einer Knudsen-Zelle (8) als Dampf durch eine Mikrobohrung strömt. Die Masse des ausströmenden Dampfs kann entweder aufgrund des Masseverlustes der Zelle oder durch Kondensation des Dampfs bei niedriger Temperatur und anschließende chromatographische Messung der Menge der verflüchtigten Substanz bestimmt werden. Der Dampfdruck wird mit Hilfe der Hertz-Knudsen-Gleichung (siehe Abschnitt 1.5.4.1) unter Berücksichtigung von Korrekturfaktoren berechnet, die von den Parametern der jeweiligen Apparatur abhängen (9). Empfohlen wird diese Methode für den Bereich $10^{-10}$ bis 1 Pa (10)(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Apparatur*

Abbildung 6 veranschaulicht das Grundprinzip der Apparatur:

*Abbildung 6*




1: Verbindung zum Vakuum

2: Bohrungen des Platinwiderstand-Thermometers oder Temperaturmessung und Kontrolle

3: Deckel Vakuumtank

4: O-Ring

5: Aluminum-Vakuumtank

6: Vorrichtung zum Einsetzen und Abnehmen der Effusionszellen

7: Deckel mit Schraubgewinde

8: Flügelmuttern

9: Schrauben

10: Edelstahl-Effusionszellen

11: Heizpatrone

▼**M1**

1.5.6. **Effusionsmethode: isotherme Thermogravimetrie**

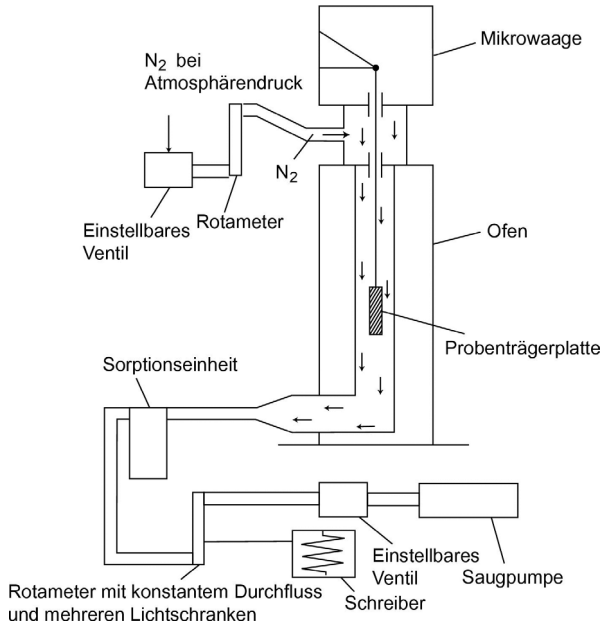
1.5.6.1. *Prinzip*

Die Methode beruht auf der Bestimmung der Geschwindigkeit einer beschleunigten Verdampfung der Prüfsubstanz bei höheren Temperaturen und bei Umgebungsdruck durch Thermogravimetrie (10)(15)(16)(17)(18)-(19)(20). Die Verdampfungsgeschwindigkeiten $v_T$ ergeben sich daraus, dass die jeweils ausgewählte Verbindung einer Atmosphäre mit einem langsam strömenden inerten Gas ausgesetzt wird; bei gegebenen isothermen Temperaturen T (ausgedrückt in Kelvin) wird dann über bestimmte Zeitspannen der Gewichtsverlust überwacht. Die Dampfdrücke $p_T$ werden aus den Werten für $v_T$ aufgrund der linearen Beziehung zwischen dem Logarithmus des Dampfdrucks und dem Logarithmus der Verdampfungsgeschwindigkeit bestimmt. Wenn erforderlich, kann durch eine Regressionsanalyse von log $p_T$ bezogen auf 1/T eine Extrapolierung auf Temperaturen von 20 und 25 °C erfolgen. Diese Methode kommt für Substanzen mit Mindestdampfdrücken bis zu $10^{-10}$ Pa ($10^{-12}$ mbar) in Betracht; um Fehlinterpretationen der gemessenen Gewichtsverluste zu vermeiden, sollte die Reinheit annähernd 100 % betragen.

1.5.6.2. *Apparatur*

In Abbildung 7 wird das allgemeine Prinzip der Apparatur dargestellt:

*Abbildung 7*




Die in einer Kammer mit Temperaturüberwachung an einer Mikrowaage aufgehängte Probenträgerplatte wird von trockenem Stickstoffgas umströmt, in dem die verdampften Moleküle der Prüfsubstanz geführt werden. Nach dem Verlassen der Kammer wird der Gasstrom durch eine Sorptionseinheit gereinigt.

1.5.6.3. *Verfahren*

Die Prüfsubstanz wird als homogene Schicht auf eine aufgeraute Glasplatte aufgebracht. Bei Feststoffen wird die Platte gleichförmig mit einer Lösung befeuchtet, in der die Prüfsubstanz in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst wurde; anschließend wird die Lösung in einer inerten Atmosphäre getrocknet. Für die Messung wird die beschichtete Platte in den Thermogravimetrie-Analysator gehängt, dort wird der Gewichtsverlust kontinuierlich als zeitabhängige Funktion bestimmt.

▼M1

Aus dem Gewichtsverlust Δm der Probenplatte wird die Verdampfungsgeschwindigkeit $v_T$ bei einer bestimmten Temperatur mit der folgenden Formel berechnet:

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \left( gcm^{-2}h^{-1} \right)$$

wobei F = Oberfläche der beschichteten Prüfsubstanzen (im Allgemeinen die Oberfläche der Probenplatte) und t = Dauer des Gewichtsverlusts Δm

Der Dampfdruck $p_T$ wird ausgehend von der Funktion der Verdampfungsgeschwindigkeit $v_T$ wie folgt berechnet:

$$\text{Log } p_T = C + D \text{ log } v_T$$

wobei C und D spezifische Konstanten für die jeweilige Apparatur sind und vom Durchmesser der Messkammer sowie vom Gasstrom abhängen. Diese Konstanten sind einmal zu bestimmen, indem eine Reihe von Verbindungen mit bekanntem Dampfdruck gemessen und dann durch Regressionsanalyse log $p_T$ gegenüber log $v_T$ ermittelt wird (11)(21)(22).

Die Beziehung zwischen dem Dampfdruck $p_T$ und der Temperatur T in Kelvin wird wie folgt ausgedrückt:

$$\text{Log } p_T = A + B \; 1/T$$

Dabei sind A und B Konstanten, die sich aus der Regressionsanalyse von log $p_T$ gegenüber 1/T ergeben. Mit dieser Formel kann der Dampfdruck für jede beliebige Temperatur extrapoliert werden.

1.5.7. **Gassättigungsmethode** (23)

1.5.7.1. *Prinzip*

Das inerte Gas wird bei Raumtemperatur und mit einer bekannten Durchflussgeschwindigkeit so langsam durch bzw. über eine Probe der Prüfsubstanz geleitet, dass eine Sättigung eintreten kann. Die Herbeiführung der Sättigung in der Gasphase ist von entscheidender Bedeutung. Die mitgeführte Substanz wird eingeschlossen (im Allgemeinen mit einem Sorptionsmittel); anschließend wird die Menge der abgetrennten Substanz bestimmt. Alternativ zum Dampfeinschluss mit anschließender Analyse kommen in den Gasstrom integrierte Analyseverfahren wie z. B. die Gaschromatographie zur quantitativen Bestimmung des mitgeführten Materials in Betracht. Der Dampfdruck wird ausgehend von der Annahme berechnet, dass sich der Gasstrom entsprechend dem idealen Gasgesetz verhält und dass der Gesamtdruck eines Gasgemischs mit der Summe der Drücke der einzelnen enthaltenen Gase übereinstimmt. Der Teildruck der Prüfsubstanz, d. h. der Dampfdruck, wird aus dem bekannten Volumen des gesamten Gasstroms und aus dem Gewicht des mitgeführten Materials berechnet.

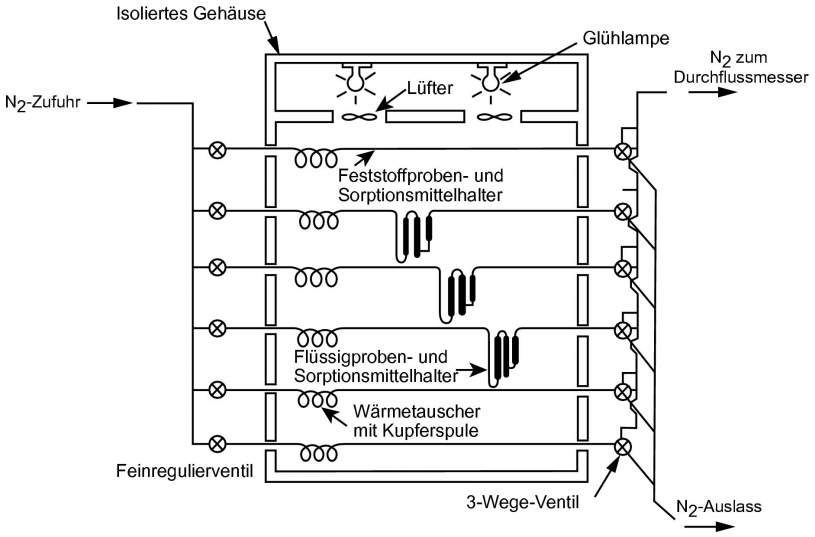
Das Gassättigungsverfahren ist für feste und flüssige Substanzen geeignet. Es kann bei Mindestdampfdrücken bis zu $10^{-10}$ Pa genutzt werden (10)(11)(12)(13)(14). Bei Dampfdrücken unter $10^3$ Pa ist diese Methode die zuverlässigste Methode. Über $10^3$ Pa werden die Dampfdrücke im Allgemeinen überschätzt; dies ist wahrscheinlich auf die Bildung von Aerosolen zurückzuführen. Da die Dampfdruckmessungen bei Raumtemperatur erfolgen, brauchen keine Extrapolierungen hoher Temperaturen vorgenommen zu werden; entsprechend entfallen die häufig mit der Extrapolierung hoher Temperaturen verbundenen schwerwiegenden Fehler.

1.5.7.2. *Apparatur*

Für das Verfahren wird ein Behälter mit konstanter Temperatur benötigt. In Abbildung 8 ist ein Behälter mit Haltern für jeweils drei feste und flüssige Proben skizziert, in dem jeweils drei wahlweise feste oder flüssige Proben analysiert werden können. Die Temperatur wird mit einer Genauigkeit von mindestens ± 0,5 °C überwacht.

▼M1

*Abbildung 8*




Im Allgemeinen wird Stickstoff als inertes Trägergas verwendet; gelegentlich können aber auch sonstige Gase erforderlich sein (24). Das Trägergas muss trocken sein. Der Gasstrom wird in sechs Teilströme getrennt, die jeweils durch Kegelventile (mit Bohrungen von ca. 0,79 mm) geregelt und über ein Kupferrohr mit einem Innendurchmesser von 3,8 mm in den Behälter geleitet werden. Nach dem Temperaturausgleich strömt das Gas durch die Probe und verlässt den Behälter durch die Adsorptionsfalle.

Feste Proben werden in ein mit Glaswollestopfen verschlossenes Glasrohr mit einem Innendurchmesser von 5 mm gegeben (siehe Abbildung 9). In Abbildung 10 sind ein Halter für feste Proben und ein Sorptionssystem dargestellt. Die am besten reproduzierbare Methode zur Messung des Dampfdrucks von Flüssigkeiten besteht darin, die zu prüfende Flüssigkeit auf Glasperlen oder auf ein inertes Sorptionsmittel wie z. B. Kieselerde aufzubringen und den Halter mit diesen Perlen zu packen. Alternativ kann das Trägergas auch über eine grobe Fritte und eine Blase durch die Säule mit der flüssigen Prüfsubstanz geleitet werden.

*Abbildung 9*

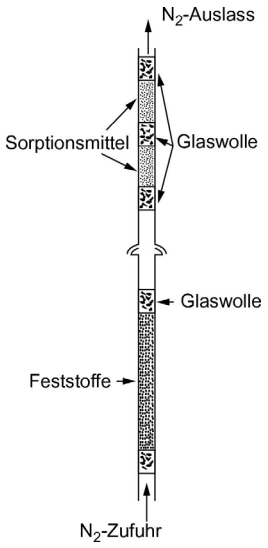
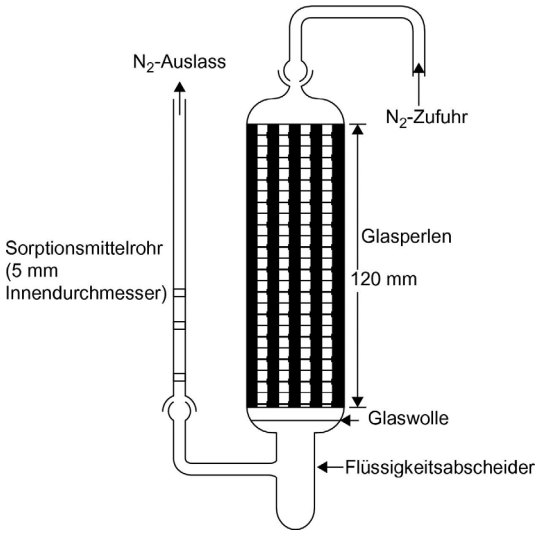



*Abbildung 10*



▼M1

Das Sorptionssystem enthält einen vorderen und einen hinteren Sorptionsabschnitt. Bei sehr niedrigen Dampfdrücken werden nur geringe Anteile vom Sorptionsmittel abgetrennt; dabei kann die Adsorption auf der Glaswolle und im Glasrohr zwischen der Probe und dem Sorptionsmittel ein ernsthaftes Problem sein.

Mit festem $CO_2$ gekühlte Abscheider stellen eine weitere wirksame Möglichkeit zur Aufnahme des verdampften Materials dar. Diese Abscheider verursachen keinerlei Gegendruck auf die Sättigungssäule; außerdem lässt sich das abgetrennte Material leicht quantitativ bestimmen.

1.5.7.3. *Verfahren*

Die Durchflussgeschwindigkeit des ausströmenden Trägergases wird bei Raumtemperatur gemessen. Während der Messung wird die Durchflussgeschwindigkeit häufig geprüft, um sicherzustellen, dass das Gesamtvolumen des Trägergases zuverlässig ermittelt wird. Vorzugsweise erfolgt eine kontinuierliche Überwachung mit einem Mengendurchflussmesser. Die Sättigung der Gasphase kann eine beträchtliche Kontaktzeit und entsprechend verhältnismäßig geringe Gasdurchflüsse erfordern (25).

Im Anschluss an die Messungen werden der vordere und der hintere Sorptionsabschnitt getrennt analysiert. Die Verbindungen in den einzelnen Abschnitten werden durch Zugabe eines Lösungsmittels desorbiert. Die entstehenden Lösungen werden einer quantitativen Analyse unterzogen, um die jeweils aus den Abschnitten desorbierten Gewichte zu bestimmen. Die Wahl der Analysemethode (sowie die Wahl des Sorptionsmittels und des desorbierenden Lösungsmittels) hängt von der Beschaffenheit des zu prüfenden Materials ab. Die Desorptionsleistung wird bestimmt, indem eine bekannte Probenmenge auf das Sorptionsmittel gespritzt, die Substanz desorbiert und anschließend die zurückgewonnene Menge analysiert wird. Die Desorptionsleistung muss mit der gleichen oder zumindest annähernd gleichen Probenkonzentration wie in der eigentlichen Prüfung bestimmt werden.

Um sicherzustellen, dass das Trägergas mit der Prüfsubstanz gesättigt ist, werden drei verschiedene Durchflussgeschwindigkeiten eingestellt. Wenn sich der berechnete Dampfdruck auch bei unterschiedlichen Durchflüssen nicht ändert, wird angenommen, dass das Gas gesättigt ist.

Der Dampfdruck wird mit folgender Gleichung berechnet:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

wobei

p = Dampfdruck (Pa)

W = Gewicht der verdampften Prüfsubstanz (g)

V = Volumen des gesättigten Gases ($m^3$)

R = universale Gaskonstante 8,314 (J $mol^{-1}$ $K^{-1}$)

T = Temperatur (K)

M = Molmasse der Prüfsubstanz (g $mol^{-1}$)

Die gemessenen Volumina sind unter Berücksichtigung von Druck- und Temperaturunterschieden zwischen Durchflussmesser und Sättigungssäule zu korrigieren.

▼M1

1.5.8. **Rotationsmethode**

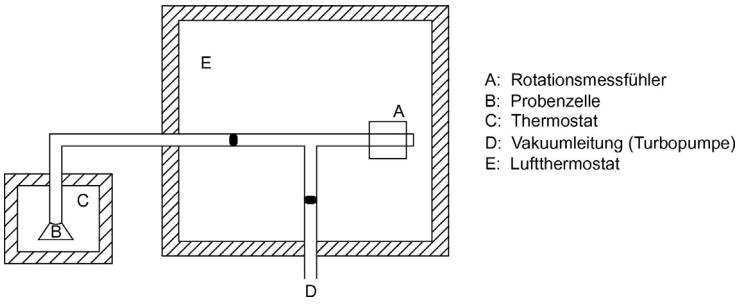
1.5.8.1. *Prinzip*

Bei dieser Methode wird ein Rotationsviskosimeter eingesetzt, bei dem das Messelement aus einer kleinen Stahlkugel besteht, die in einem Magnetfeld aufgehängt durch Drehfelder in Drehungen versetzt wird (26)(27)(28). Aufnehmerspulen ermöglichen eine Messung der Drehzahl. Wenn die Kugel eine bestimmte Drehzahl erreicht hat (in der Regel etwa 400 Umdrehungen pro Sekunde), wird die Erregung unterbrochen, und infolge der Gasreibung erfolgt eine Verzögerung. Der Rückgang der Drehzahl wird zeitabhängig gemessen. Aus der druckabhängigen Verlangsamung der Stahlkugel wird der Dampfdruck abgeleitet. Diese Methode wird für den Bereich von $10^{-4}$ bis 0,5 Pa empfohlen.

1.5.8.2. *Apparatur*

In Abbildung 11 ist die Apparatur schematisch dargestellt. Der Messfühler wird in ein Gehäuse mit konstanter Temperatur gebracht, in dem die Temperatur mit einer Genauigkeit von 0,1 °C geregelt wird. Der Probenbehälter wird in ein getrenntes Gehäuse gesetzt, dessen Temperatur ebenfalls mit einer Genauigkeit von 0,1 °C geregelt wird. Alle übrigen Teile der Apparatur werden auf einer höheren Temperatur gehalten, um eine Kondensatbildung auszuschließen. Die gesamte Apparatur ist mit einem Hochvakuumsystem verbunden.

*Abbildung 11*




2. **DATEN UND ABSCHLUSSBERICHT**

2.1. DATEN

Der Dampfdruck sollte mit den genannten Methoden jeweils bei mindestens zwei Temperaturen gemessen werden. Im Bereich 0 bis 50 °C werden Messungen vorzugsweise bei drei Temperaturen durchgeführt, um zu prüfen, ob die Dampfdruckkurve linear verläuft. Bei der Effusionsmethode (Knudsen-Zelle und isotherme Thermogravimetrie) und bei der Gassättigungsmethode wird statt des üblichen Bereichs von 0 bis 50 °C ein Temperaturbereich von 120 bis 150 °C empfohlen.

2.2. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

— eingesetzte Methode;

▼M1

— genaue Spezifizierung der Substanz (Beschreibung und Verunreinigungen); ggf. ist eine vorläufige Reinigung zu protokollieren;

— mindestens zwei Dampfdruck- und Temperaturwerte — vorzugsweise drei oder mehr — im Temperaturbereich 0 bis 50 °C (bzw. 120 bis 150 °C);

— mindestens einer der Temperaturwerte sollte 25 °C oder weniger betragen, wenn bei der jeweils gewählten Methode technisch möglich;

— alle Originaldaten;

— eine Kurve log p vs. 1/T;

— eine Schätzung des Dampfdrucks bei 20 oder 25 °C.

Wenn ein Übergang (Änderung des Aggregatzustandes oder Zersetzung) beobachtet wird, sollten folgende Informationen vermerkt werden:

— Art der Änderung;

— Temperatur, bei der die Änderung bei Atmosphärendruck auftritt;

— Dampfdruck bei 10 und 20 °C unter der Übergangstemperatur und bei 10 und 20 °C über dieser Temperatur (wenn der Übergang nicht vom festen Zustand in den gasförmigen Zustand erfolgt).

Alle für die Auswertung der Ergebnisse maßgeblichen Informationen und Bemerkungen sind zu protokollieren; dies gilt insbesondere für Verunreinigungen und für die physikalische Beschaffenheit der Prüfsubstanz.

3. **LITERATUR**

1. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* L 383 A, S. 26-47 (1992).

2. Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.

3. Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

4. Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

5. NF T 20-048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from $10^{-1}$ to $10^{5}$ Pa — Static method.

6. ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

7. NF T 20-047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from $10^{-3}$ to 1 Pa — Vapour pressure balance method.

▼**M1**


8. Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

9. Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, S. 1173.

10. Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, S. 521-532.

11. Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000).

12. Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), S. 22-28.

13. Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), S. 269-278.

14. Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), S. 117-122.

15. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973), S. 137-147.

16. Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974), S. 393-400.

17. Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982), S. 161-168.

18. Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995), S. 27-31.

19. Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science 53 (1998), S. 300-310.

20. Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87-(12) (1998), S. 1512-20.

21. Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range — 25 °C to 150 °C.

22. Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

23. 40 CFR, 796. (1993). S. 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

24. Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, S. 435.

25. Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, S. 1375.

26. Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), S. 2440.

27. Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), S. 642.

28. Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), S. 1715.

▼**M1**

*Anlage*

**Schätzmethode**

EINLEITUNG

Geschätzte Dampfdrücke können verwendet werden,

— um zu entscheiden, welche Prüfmethode im Einzelfall am besten geeignet ist, und

— um in den Fällen einen Schätz- oder Grenzwert angeben zu können, in denen eine Prüfmethode aus technischen Gründen nicht zur Anwendung kommen kann.

SCHÄTZMETHODE

Der Dampfdruck von Flüssigkeiten und Feststoffen kann aufgrund der modifizierten Watson-Korrelation geschätzt werden (a). In diesem Fall braucht als Prüfwert nur der normale Siedepunkt bestimmt zu werden. Diese Methode kommt im Druckbereich $10^5$ Pa bis $10^{-5}$ Pa in Betracht.

Detaillierte Informationen zu dieser Methode sind dem „Handbook of Chemical Property Estimation Methods“ zu entnehmen (b). Außerdem wird auf die OECD Environmental Monograph No. 67 verwiesen (c).

BERECHNUNGSVERFAHREN

Der Dampfdruck wird wie folgt berechnet:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln\frac{T}{T_b}\right]$$

wobei

T = maßgebliche Temperatur

$T_b$ = normaler Siedepunkt

$P_{VP}$ = Dampfdruck bei Temperatur T

$\Delta H_{Vb}$ = Verdampfungswärme

$\Delta Z_b$ = Kompressibilitätsfaktor (geschätzt 0,97)

m = empirischer Faktor, abhängig von der physikalischen Beschaffenheit bei der maßgeblichen Temperatur

Außerdem ist folgende Berechnung vorzunehmen:

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F(8,75 + R \ln T_b)$$

wobei $K_F$ ein empirischer Faktor ist, der die Polarität der Substanz berücksichtigt; im Anhang sind die Faktoren $K_F$ für verschiedene Verbindungen zusammengestellt.

▼**M1**

Verhältnismäßig häufig sind Daten verfügbar, bei denen ein Siedepunkt bei reduziertem Druck angegeben wird. In diesen Fällen wird der Dampfdruck wie folgt berechnet:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{vl}}{\Delta Z_b R T_l}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1}\right]$$

wobei $T_1$ = Siedepunkt bei reduziertem Druck $P_1$.

BERICHT

Bei der Schätzmethode sollte die vorgenommene Berechnung im Bericht umfassend dokumentiert werden.

LITERATUR

a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D. H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

c) OECD Environmental Monograph No. 67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

## A.5. OBERFLÄCHENSPANNUNG

### 1. METHODEN

Den meisten der hier beschriebenen Methoden liegt die OECD-Prüfrichtlinie (1) zugrunde. Die Grundprinzipien sind in (2) angegeben.

#### 1.1. EINLEITUNG

Die hier beschriebenen Methoden sind zur Messung der Oberflächenspannung wässriger Lösungen anzuwenden.

Zweckdienlich ist, dass vor der Durchführung dieser Prüfungen Vorabinformationen über die Wasserlöslichkeit, die Struktur, die Hydrolyseeigenschaften und die kritische Konzentration für Mizellbildung des Stoffes vorliegen.

Die nachstehenden Methoden können für die meisten chemischen Substanzen ohne Einschränkung in Bezug auf ihren Reinheitsgrad angewendet werden.

Die Messung der Oberflächenspannung nach der Ringmethode beschränkt sich auf wässrige Lösungen mit einer dynamischen Viskosität unter ca. 200 mPa s.

#### 1.2. DEFINITION UND EINHEITEN

Die freie Oberflächenenthalpie pro Oberflächeneinheit bezeichnet man als Oberflächenspannung.

Die Oberflächenspannung wird in folgenden Einheiten angegeben:

N/m (SI-Einheit) oder

mN/m (SI-Untereinheit)

1 N/m = $10^3$ dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm im veralteten CGS-System

#### 1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Methode von Zeit zu Zeit zu überprüfen und einen Vergleich mit den Ergebnissen aus anderen Methoden zu ermöglichen.

Referenzsubstanzen, die einen weiten Bereich von Oberflächenspannungen abdecken, sind in der Literatur (1) (3) aufgeführt.

#### 1.4. PRINZIP DER METHODEN

Gemessen wird die maximale Kraft, die in vertikaler Richtung auf einen Bügel oder einen Ring ausgeübt werden muss, um diesen aus seinem Kontakt mit der Oberfläche der in ein Messgerät gefüllten Prüfflüssigkeit zu ziehen, bzw. die auf eine Platte ausgeübt werden muss, deren einer Rand in Kontakt mit der Oberfläche steht, um den gebildeten Film hochzuziehen.

Stoffe, die mindestens in einer Konzentration von 1 mg/l in Wasser löslich sind, werden in wässriger Lösung in einer einzigen Konzentration geprüft.

#### 1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Die Genauigkeit dieser Methoden überschreitet wahrscheinlich alle Kontrollerfordernisse des Umweltschutzes.

▼B

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODEN

Eine Lösung der Prüfsubstanz wird in destilliertem Wasser zubereitet. Die Konzentration dieser Lösung sollte bei 90 % der Sättigungslöslichkeit der Substanz in Wasser liegen; wenn diese Konzentration höher liegt als 1 g/l, wird für die Prüfung eine Konzentration von 1 g/l verwendet. Substanzen mit einer Wasserlöslichkeit unter 1 mg/l brauchen nicht geprüft zu werden.

1.6.1. **Plattenmethode**

Siehe ISO 304 und NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Bügelmethode**

Siehe ISO 304 und NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Ringmethode**

Siehe ISO 304 und NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **OECD-Ringmethode**

1.6.4.1. *Apparatur*

Zur Ausführung der in Betracht kommenden Messungen eignen sich handelsübliche Tensiometer. Sie bestehen aus folgenden Teilen:

— einem beweglichen Probentisch,

— einem Kraftmesssystem,

— einem Messkörper (Ring),

— einem Messgefäß.

1.6.4.1.1. Beweglicher Probentisch

Der bewegliche Probentisch dient als Untersatz für das thermostatisierte Messgefäß, in welchem sich die zu untersuchende Flüssigkeit befindet. Er ist zusammen mit dem Kraftmesssystem auf ein Stativ montiert.

1.6.4.1.2. Kraftmesssystem

Das Kraftmesssystem (siehe Abbildung) befindet sich über dem Probentisch. Der Fehler der Kraftmessung sollte einen Wert von $\pm 10^{-6}$ N nicht übersteigen, was einer Fehlergrenze von ± 0,1 mg bei der Massenbestimmung entspricht. In den meisten Fällen erfolgt die Einteilung der Messskala handelsüblicher Tensiometer in mN/m, so dass die Oberflächenspannung direkt in mN/m mit einer Genauigkeit von 0,1 mN/m abgelesen werden kann.

▼B

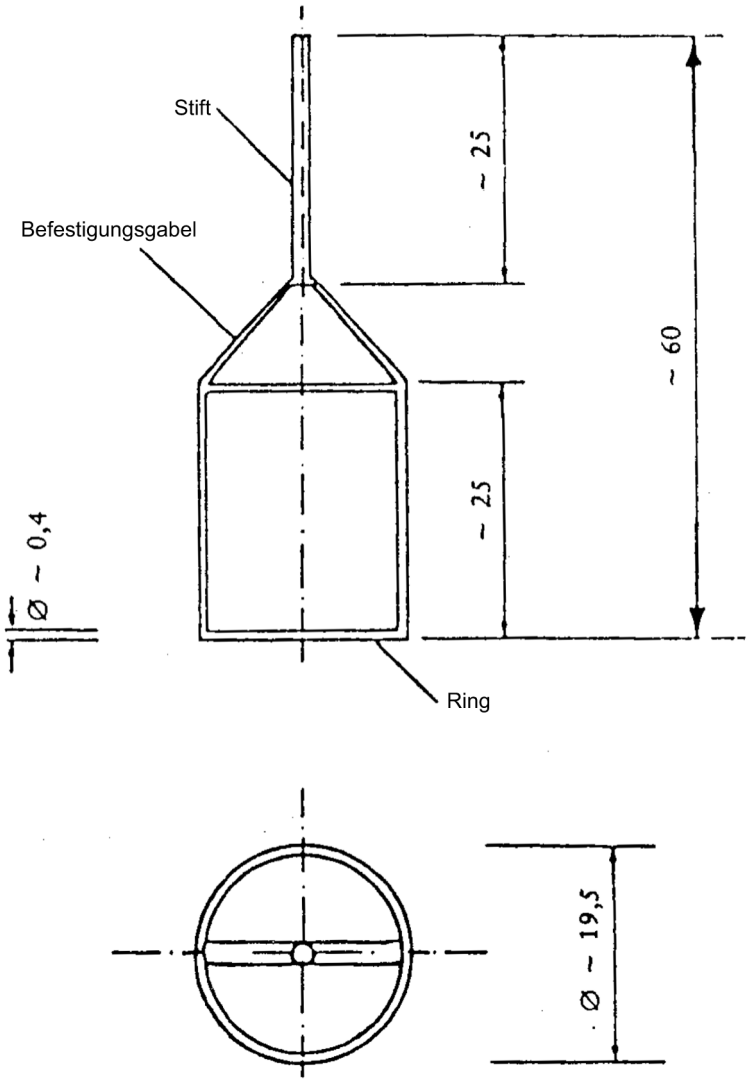
1.6.4.1.3. Messkörper (Ring)

Üblicherweise wird der Ring aus Platin-Iridium-Draht mit einer Stärke von etwa 0,4 mm und einem mittleren Umfang von 60 mm hergestellt. Der Drahtring ist horizontal mittels einer Befestigungsgabel aus Draht und einem Metallstift aufgehängt, welche die Verbindung zum Kraftmesssystem darstellen (siehe Abbildung).

*Abbildung*

**Messkörper**

(alle Abmessungen in mm)




1.6.4.1.4. Messgefäß

Zur Aufnahme der Prüflösung bei den Messungen sollte ein thermostatisiertes Glasgefäß benutzt werden. Die Anordnung sollte so ausgelegt werden, dass während der Messung die Temperatur sowohl der Prüflösung wie auch die der sich über deren Oberfläche befindlichen Gasphase konstant bleiben und die Probe nicht verdampfen kann. Hierfür sollten zylindrische Glasgefäße mit einem Innendurchmesser von nicht weniger als 45 mm zur Anwendung kommen.

▼B

1.6.4.2. *Vorbereitung der Apparatur*

1.6.4.2.1. Reinigung

Die Glasgefäße müssen sorgfältig gereinigt werden. Falls notwendig, sollten sie mit heißer Chromschwefelsäure und anschließend mit sirupartiger Phosphorsäure (83 bis 98 Gew.- % $H_3PO_4$) gewaschen, sorgfältig mit Leitungswasser gespült und schließlich nochmals mit doppelt destilliertem Wasser ausgewaschen werden, bis man eine neutrale Reaktion erhält. Daraufhin trocknet man das Gefäß oder spült es mit der zu untersuchenden Probenlösung aus.

Der Ring sollte zunächst sorgfältig mit Wasser abgewaschen werden, um alle wasserlöslichen Substanzen zu entfernen. Anschließend wird er kurzzeitig in Chromschwefelsäure getaucht, in doppelt destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion gespült und schließlich kurz über einer Methanolflamme erhitzt.

*Anmerkung*

Verunreinigungen durch Substanzen, die weder durch Chromschwefelsäure noch Phosphorsäure gelöst oder zersetzt werden, wie beispielsweise Silikone, sind mittels geeigneter organischer Lösungsmittel zu entfernen.

1.6.4.2.2. Eichung der Apparatur

Die Validierung der Apparatur besteht in einer Überprüfung des Nullpunktes. Dieser sollte so eingestellt werden, dass die Instrumentenanzeige eine zuverlässige Bestimmung in mN/m zulässt.

*Aufstellung*

Das Gerät muss waagerecht aufgestellt werden, was sich beispielsweise unter Zuhilfenahme einer Wasserwaage, die man auf die Grundplatte des Tensiometers legt, und entsprechender Einstellungen mit den dort vorgesehenen Stellschrauben erzielen lässt.

*Nullpunkteinstellung*

Nach der Befestigung des Rings an der Apparatur und vor dem Eintauchen in die Flüssigkeit sind der Nullpunkt der Tensiometeranzeige einzustellen und die Parallelität des Rings zur Flüssigkeitsoberfläche zu überprüfen. Dazu kann man die Flüssigkeitsoberfläche als Spiegel benutzen.

*Eichen*

Das eigentliche Eichen vor den Untersuchungen lässt sich auf zweierlei Weise durchführen:

a) Benutzung einer Masse: Bei diesem Verfahren verwendet man Reiter bekannter Masse zwischen 0,1 g und 1,0 g, die auf diesem Ring angebracht werden. Der Eichfaktor $\Phi_a$, mit dem alle am Instrument abgelesenen Werte multipliziert werden müssen, lässt sich entsprechend der Gleichung (1) bestimmen:

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

Hierbei ist:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = Masse des Reiters

g = Erdbeschleunigung (981 cm $s^{-2}$ in Meereshöhe)

b = mittlerer Umfang des Rings (cm)

$\sigma_a$ = abgelesener Wert am Tensiometer nach dem Anbringen des Reiters auf dem Ring (mN/m)

▼B

b) Verwendung von Wasser: Bei diesem Verfahren benutzt man reines Wasser, dessen Oberflächenspannung bei 23 °C einen Wert von 72,3 mN/m besitzt. Dieses Verfahren ist bei weitem schneller durchführbar als die Eichung mit Gewichten, doch läuft man hierbei immer Gefahr, dass die Oberflächenspannung des Wassers durch Spurenverunreinigungen mit oberflächenaktiven Substanzen verfälscht wird.

Der Eichfaktor $\Phi_b$, mit dem alle am Instrument abgelesenen Werte multipliziert werden müssen, lässt sich entsprechend der Gleichung (2) bestimmen:

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

Hierbei ist:

$\sigma_o$ = angegebener Literaturwert für die Oberflächenspannung von Wasser (mN/m)

$\sigma_g$ = gemessener Wert der Oberflächenspannung von Wasser (mN/m) beide bei der gleichen Temperatur.

1.6.4.3. *Vorbereitung der Proben*

Von den zu untersuchenden Substanzen sind wässrige Lösungen in den erforderlichen Konzentrationen herzustellen. Die Lösungen dürfen keine ungelösten Bestandteile enthalten.

Die Lösung ist bei konstanter Temperatur zu halten (± 0,5 °C). Da sich die Oberflächenspannung der im Messbehälter befindlichen Lösung im Verlauf der Zeit verändert, sollten Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen und entsprechend eine Kurve erstellt werden, die die Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Zeit darstellt. Ein Gleichgewichtszustand ist erreicht, sobald keine weiteren Änderungen auftreten.

Verschmutzung durch Staub oder gasförmige Substanzen beeinträchtigt die Messung. Aus diesem Grunde sollten die Arbeiten unter einer Schutzhaube vorgenommen werden.

1.6.5. **Prüfbedingungen**

Die Messungen sind bei etwa 20 °C auszuführen, und die Temperaturkonstanz sollte mit ± 0,5 °C eingehalten werden.

1.6.6. **Durchführung der Prüfung**

Die zu messenden Lösungen werden in das sorgfältig gereinigte Messgefäß gefüllt, wobei darauf geachtet werden sollte, Schaumbildung zu vermeiden. Anschließend wird das Messgefäß auf den Tisch der Testapparatur gestellt. Das Tischoberteil mit dem Messgefäß wird nun so weit hochgeschraubt, bis der Ring unter die Oberfläche der zu messenden Lösung taucht. Daraufhin wird das Tischoberteil langsam und gleichmäßig abgesenkt (mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,5 cm/min), um den Ring aus der Oberfläche herauszuziehen, bis ein maximaler Wert der Kraft erreicht ist. Der am Ring haftende Flüssigkeitsfilm darf nicht von ihm abreißen. Nach Beendigung der Messung wird der Ring wieder unter die Oberfläche getaucht und der Vorgang wiederholt, bis ein konstanter Wert der Oberflächenspannung erreicht ist. Bei jeder Bestimmung sollte die Zeitmessung mit dem Einfüllen der Lösung in das Messgefäß beginnen. Die Ablesung erfolgt jeweils zu dem Zeitpunkt, bei dem die Maximalkraft beim Herausziehen des Rings aus der Flüssigkeitsoberfläche erreicht ist.

▼B

2. **DATEN**

Zur Berechnung der Oberflächenspannung wird zunächst der in mN/m an der Apparatur abgelesene Wert mit dem Eichfaktor $\Phi_a$ oder $\Phi_b$ (je nach dem verwendeten Eichverfahren) multipliziert. Man erhält einen Wert, der jedoch nur annähernd gilt und infolgedessen einer Korrektur bedarf.

Harkins und Jordan (4) haben empirische Korrekturfaktoren für Oberflächenspannungswerte bestimmt, die mit der Ringmethode gemessen wurden. Diese Faktoren sind von den Ringdimensionen, der Dichte der Flüssigkeit und ihrer Oberflächenspannung abhängig.

Da es umständlich ist, für jede einzelne Messung den Korrekturfaktor aus den Tabellen von Harkins und Jordan zu bestimmen, um die Oberflächenspannung wässriger Lösungen zu berechnen, kann eine vereinfachte Methode angewandt werden, die darin besteht, die korrigierten Werte für die Oberflächenspannung direkt aus der nachstehenden Tabelle abzulesen. (Für Ablesewerte, die zwischen den Tabellenwerten liegen, ist eine Interpolation möglich.)

*Tabelle*

**Korrektur der gemessenen Oberflächenspannungswerte**

Nur für wässrige Lösungen, $\rho = 1\ g/cm^3$

| | |
|---|---|
| R | = 9,55 mm (mittlerer Ringradius) |
| r | = 0,185 mm (Radius des Ringdrahtes) |

| Experimenteller Wert (mN/m) | Korrigierter Wert (mN/m) | |
|---|---|---|
| | Eichung mit Gewichten (vgl. 1.6.4.2.2 a) | Eichung mit Wasser (vgl.1.6.4.2.2 b) |
| 20 | 16,9 | 18,1 |
| 22 | 18,7 | 20,1 |
| 24 | 20,6 | 22,1 |
| 26 | 22,4 | 24,1 |
| 28 | 24,3 | 26,1 |
| 30 | 26,2 | 28,1 |
| 32 | 28,1 | 30,1 |
| 34 | 29,9 | 32,1 |
| 36 | 31,8 | 34,1 |
| 38 | 33,7 | 36,1 |
| 40 | 35,6 | 38,2 |
| 42 | 37,6 | 40,3 |
| 44 | 39,5 | 42,3 |
| 46 | 41,4 | 44,4 |
| 48 | 43,4 | 46,5 |
| 50 | 45,3 | 48,6 |
| 52 | 47,3 | 50,7 |
| 54 | 49,3 | 52,8 |
| 56 | 51,2 | 54,9 |

▼B

| Experimenteller Wert (mN/m) | Korrigierter Wert (mN/m) | |
|---|---|---|
| | Eichung mit Gewichten (vgl. 1.6.4.2.2 a) | Eichung mit Wasser (vgl.1.6.4.2.2 b) |
| 58 | 53,2 | 57,0 |
| 60 | 55,2 | 59,1 |
| 62 | 57,2 | 61,3 |
| 64 | 59,2 | 63,4 |
| 66 | 61,2 | 65,5 |
| 68 | 63,2 | 67,7 |
| 70 | 65,2 | 69,9 |
| 72 | 67,2 | 72,0 |
| 74 | 69,2 | — |
| 76 | 71,2 | — |
| 78 | 73,2 | — |

Die Zusammenstellung dieser Tabelle erfolgte auf der Grundlage der Harkins-Jordan-Korrekturen und entsprechend der DIN-Norm (DIN 53914) für Wasser und wässrige Lösungen (Dichte $\rho = 1\ g/cm^3$). Sie gilt für einen handelsüblichen Ring mit folgenden Abmessungen: R = 9,55 mm (mittlerer Ringradius) und r = 0,185 mm (Radius des Ringdrahtes). Die Tabelle enthält korrigierte Werte für Oberflächenspannungsmessungen nach einer Eichung entweder mit Gewichten oder mit Wasser.

Alternativ lässt sich die Oberflächenspannung ohne vorhergehende Eichung nach der folgenden Gleichung berechnen:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

Hierbei ist:

F = die vom Kraftmesssystem angegebene Kraft beim Abreißen des Films

R = der Ringradius

f = der Korrekturfaktor (1)

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— verwendete Methode,

— Art des verwendeten Wassers oder der verwendeten Lösung,

— genaue Spezifizierung der Substanz (Identifizierung und Verunreinigungen),

— Messergebnisse: abgelesene Oberflächenspannungswerte mit Angabe sowohl der Einzelmesswerte und ihres arithmetischen Mittels wie auch des korrigierten Mittelwertes (wobei der Eichfaktor und die Korrekturtabelle berücksichtigt werden),

▼B

— die Konzentration der Lösung,

— die Prüftemperatur,

— das Alter der untersuchten Lösung, insbesondere die Zeitspanne zwischen Zubereitung und Messung der Lösung,

— die Darstellung der Zeitabhängigkeit der Oberflächenspannung nach Einfüllen der Lösung in das Messgefäß,

— alle für die Auswertung der Ergebnisse sachdienlichen Informationen und Bemerkungen, insbesondere in Bezug auf Verunreinigungen und Aggregatzustand des Stoffes.

3.2. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Ausgehend davon, dass destilliertes Wasser bei 20 °C eine Oberflächenspannung von 72,75 mN/m hat, sollten Stoffe mit einer Oberflächenspannung unter 60 mN/m unter den Bedingungen dieses Verfahrens als oberflächenaktiv betrachtet werden.

4. **LITERATUR**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger (Hrsg.), Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, Vol. 48, 511.

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc, 1930, Vol. 52, 1751.

▼M4

## A.6 **WASSERLÖSLICHKEIT**

### EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 105 (1995). Sie ist eine überarbeitete Fassung der ursprünglichen TG 105, die 1981 angenommen wurde. Es gibt keine inhaltlichen Unterschiede zwischen der derzeitigen Fassung und der von 1981. Geändert wurde hauptsächlich das Format. Die Überarbeitung stützte sich auf die EU-Prüfmethode „Wasserlöslichkeit“ ([1]).

### AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

2. Die Wasserlöslichkeit eines Stoffs kann durch Verunreinigungen erheblich beeinflusst werden. Diese Prüfmethode behandelt die Bestimmung der Wasserlöslichkeit von im Wesentlichen reinen Substanzen, die in Wasser stabil und nicht flüchtig sind. Vor Bestimmung der Wasserlöslichkeit sollten Vorinformationen über die Strukturformel, den Dampfdruck, die Dissoziationskonstante und das Hydrolyseverhalten (als Funktion des pH-Wertes) des Stoffes vorliegen.

3. Die beiden nachstehend beschriebenen Methoden, d. h. die Säulen-Elutions-Methode und die Kolbenmethode, decken Löslichkeiten von unter bzw. über $10^{-2}$ g/l ab. Ein einfacher Vorversuch wird ebenfalls beschrieben. Er ermöglicht die Bestimmung der bei der eigentlichen Prüfung zu verwendenden ungefähren Probenmenge und die zum Erreichen der Sättigungskonzentration notwendige Zeit.

### DEFINITIONEN UND EINHEITEN

4. Die Wasserlöslichkeit einer Substanz wird durch ihre Massen-Sättigungskonzentration in Wasser bei einer bestimmten Temperatur angegeben.

5. Die Wasserlöslichkeit wird als Masse des gelösten Stoffs je Lösungsvolumen ausgedrückt. Die SI-Einheit ist $kg/m^3$, aber g/l kann auch verwendet werden.

### REFERENZSUBSTANZEN

6. Bei der Untersuchung der Prüfsubstanz brauchen keine Referenzsubstanzen verwendet zu werden.

### BESCHREIBUNG DER METHODEN

**Prüfbedingungen**

7. Die Prüfung wird vorzugsweise bei 20 ° C ± 0,5 ° C durchgeführt. Die gewählte Temperatur ist in allen wichtigen Teilen der Apparatur konstant zu halten.

**Vorversuch**

8. Etwa 0,1 g der Probe (feste Prüfsubstanzen müssen pulverisiert sein) werden in einen mit Glasstopfen verschließbaren 10-ml-Messzylinder gegeben. Dann werden portionsweise zunehmende Volumen Wasser von Raumtemperatur zugesetzt. Nach jedem Zusatz einer Wassermenge wird die Mischung 10 Minuten geschüttelt und mit bloßem Auge auf ungelöste Teilchen der Probe untersucht. Wenn nach Zusatz von 10 ml Wasser die Probe oder Teile von ihr ungelöst bleiben, ist der Versuch in einem 100-ml-Messzylinder zu wiederholen. Die ungefähre Löslichkeit ist in Tabelle 1 unter

▼M4

demjenigen Volumen Wasser angegeben, bei dem die Probe vollständig gelöst wird. Bei geringer Löslichkeit kann es lange (bis zu 24 Stunden) dauern, bis die Prüfsubstanz gelöst ist. Ist die Prüfsubstanz nach 24 Stunden noch nicht gelöst, sollte der Versuch verlängert werden (maximal 96 Stunden) oder es sollte weiter verdünnt werden, um festzustellen, ob die Säulen-Elutions- oder die Kolben-Methode zu benutzen ist.

*Tabelle 1*

| ml Wasser auf 0,1 g lösliche Substanz | 0,1 | 0,5 | 1 | 2 | 10 | 100 | > 100 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ungefähre Löslichkeit in g/l | > 1 000 | 1 000-200 | 200-100 | 100-50 | 50-10 | 10-1 | < 1 |

**Säulen-Elutions-Methode**

*Prinzip*

9. Diese Methode basiert auf der Elution einer Prüfsubstanz mit Wasser aus einer Mikrosäule, die mit einem inerten Trägermaterial gefüllt ist, welches mit einem Überschuss an Prüfsubstanz beschichtet ist (2). Die Wasserlöslichkeit wird durch die Massenkonzentration des Eluats ausgedrückt, wenn dieses ein Plateau in Abhängigkeit von der Zeit erreicht hat.

*Apparatur*

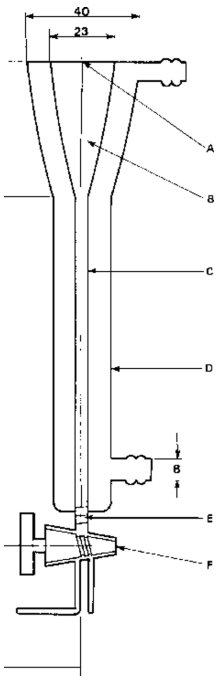
10. Die Apparatur besteht aus einer Mikrosäule (Abbildung 1), die auf konstanter Temperatur gehalten wird. Sie ist entweder mit einer Umwälzpumpe (Abbildung 2) oder mit einem Niveaugefäß (Abbildung 3) verbunden. Die Mikrosäule enthält ein inertes Trägermaterial, das durch einen kleinen Pfropfen aus Glaswolle in der Säule gehalten wird, der gleichzeitig zum Herausfiltern von Partikeln dient. Als Trägermaterial können Glaskugeln, Diatomeenerde oder andere inerte Stoffe verwendet werden.

11. Die Mikrosäule in Abbildung 1 eignet sich für die Apparatur mit Umwälzpumpe. Sie hat einen Kopfraum für fünf Säulenbett-Volumina (werden zu Beginn des Versuchs verworfen) und das Volumen von fünf Proben (werden während des Versuchs entnommen). Der Kopfraum kann kleiner gehalten werden, wenn während des Versuchs Wasser zugegeben werden kann, um die anfänglich mit Verunreinigungen entnommenen fünf Säulenbett-Volumina zu ersetzen. Die Säule ist durch einen Schlauch aus inertem Material mit der Umwälzpumpe verbunden, die mit einem Fluss von etwa 25 ml/h fördern kann. Die Umwälzpumpe kann z. B. eine Schlauch- oder eine Membranpumpe sein. Dabei ist darauf zu achten, dass es nicht zu einer Verunreinigung und/oder Absorption durch das Schlauchmaterial kommt.

12. Abbildung 3 zeigt die schematische Darstellung mit Verwendung eines Niveaugefäßes. In dieser Darstellung ist die Mikrosäule mit einem Einweghahn versehen. Sie wird mit einem Glasschliff-Verbindungsstück und einem Schlauch aus inertem Material an das Niveaugefäß angeschlossen. Die Durchflussrate vom Niveaugefäß sollte etwa 25 ml/h betragen.

▼**M4**

*Abbildung 1*




Abmessungen in mm

A. Anschluss für Glasschliff-Stopfen

B. Kopfraum

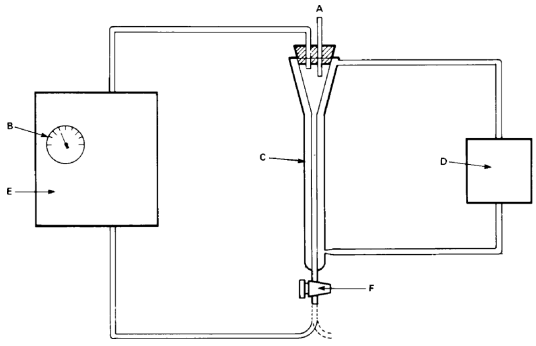
C. Innenmaß 5

D. Außenmaß 19

E. Glaswollpfropfen

F. Absperrhahn

*Abbildung 2*




A. atmosphärischer Druckausgleich

B. Durchflussmesser

C. Mikrosäule

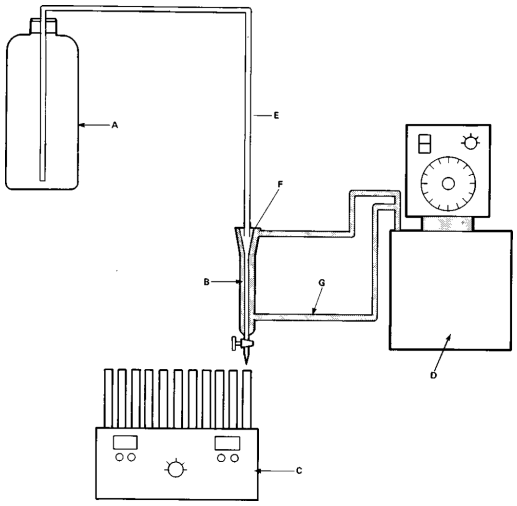
D. thermostatgeregelte Pumpe

E. Umwälzpumpe

F. 2-Wege-Hahn zur Probenentnahme

▼M4

*Abbildung 3*




A. Niveaugefäß (z. B. 2,5-Liter-Kolben)

B. Säule

C. Fraktionssammler

D. Thermostat

E. Teflonschlauch

F. Glasschliff-Stopfen

G. Wasserschlauch (zwischen Thermostat und Säule, Innendurchmesser ungefähr 8 mm)

13. Etwa 600 mg Trägermaterial werden in einen 50-ml-Rundkolben eingefüllt. Eine geeignete Menge Prüfsubstanz wird in einem flüchtigen Lösungsmittel von Analysenqualität gelöst, und eine ausreichende Menge dieser Lösung wird zum Trägermaterial hinzugefügt. Das Lösungsmittel muss vollständig abgezogen werden, z. B. in einem Rotationsverdampfer, da sonst während der Elutionsphase wegen Verteilungseffekten auf der Oberfläche keine vollständige Sättigung dieses Materials mit Wasser erzielt wird. Das beladene Trägermaterial lässt man etwa 2 Stunden lang in etwa 5 ml Wasser quellen. Dann wird die Suspension in die Mikrosäule gefüllt. Es ist auch möglich, das trockene, beladene Trägermaterial in die mit Wasser gefüllte Mikrosäule zu geben. Auch hier wird der Quellvorgang von etwa 2 Stunden abgewartet.

14. Das Aufbringen der Prüfsubstanz auf das Trägermaterial kann problematisch werden und zu fehlerhaften Ergebnissen führen, z. B. wenn sich die Prüfsubstanz ölartig auf dem Träger niederschlägt. Diese Probleme sollten untersucht und Einzelheiten dazu dokumentiert werden.

*Verfahren mit Umwälzpumpe*

15. Der Säulenfluss wird in Gang gesetzt. Eine Durchflussleistung von etwa 25 ml/h wird empfohlen (etwa zehn Säulenbett-Volumina/h bei der beschriebenen Säule). Mindestens die ersten fünf Säulenbett-Volumina werden verworfen, um wasserlösliche Verunreinigungen zu entfernen. Danach lässt man die Umwälzpumpe bis zur Einstellung des Gleichgewichts laufen. Das Gleichgewicht ist erreicht, wenn bei fünf aufeinander folgenden Proben die Konzentrationen um nicht mehr als ± 30 % streuen. Diese Proben sollten in solchen zeitlichen Abständen genommen werden, in denen mindestens zehn Säulenbett-Volumina die Säule durchlaufen haben. Je nach verwendeter Analysemethode kann es ratsam sein, eine Konzentrations-Zeit-Kurve zu erstellen, um zu zeigen, dass das Gleichgewicht erreicht ist.

▼M4

*Verfahren mit Niveaugefäß*

16. Aufeinander folgende Eluatfraktionen werden gesammelt und ihre Konzentrationen mit der gewählten Analysemethode bestimmt. Fraktionen des mittleren Eluatbereichs, bei denen die Konzentrationen in mindestens fünf aufeinander folgenden Proben konstant bleiben (± 30 %), werden zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit benutzt.

17. Das bevorzugte Elutionsmittel ist bidestilliertes Wasser. Es kann auch deionisiertes Wasser mit einem spezifischen Widerstand von mehr als 10 Megaohm/cm und einem Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff unter 0,01 % verwendet werden.

18. Bei beiden Verfahren wird ein zweiter Durchlauf mit halber Durchflussrate durchgeführt. Stimmen die Ergebnisse der beiden Versuche überein, wird das Prüfergebnis als zufriedenstellend betrachtet. Ist die gemessene Löslichkeit bei dem niedrigeren Durchfluss höher, muss die Durchflussleistung so lange weiter halbiert werden, bis zwei aufeinander folgende Versuchsdurchläufe die gleiche Löslichkeit ergeben.

19. Bei beiden Verfahren sollten die Fraktionen durch Prüfung des Tyndall-Effekts auf kolloidale Substanzpartikel untersucht werden. Wenn solche Substanzpartikel vorkommen, ist das Prüfergebnis unbrauchbar. Die Prüfung sollte dann wiederholt werden, nachdem die Filterfunktion der Säule verbessert wurde.

20. Der pH-Wert jeder Probe sollte vorzugsweise mit speziellen Indikatorstäbchen bestimmt werden.

**Kolben-Methode**

*Prinzip*

21. Die Prüfsubstanz (Feststoffe müssen pulverisiert werden) wird bei einer Temperatur in Wasser aufgelöst, die leicht über der Prüftemperatur liegt. Wenn die Sättigung erreicht ist, wird die Lösung abgekühlt und auf der Prüftemperatur gehalten. Alternativ kann die Messung direkt bei der Prüftemperatur durchgeführt werden, wenn durch entsprechende Probenahme gesichert ist, dass das Sättigungsgleichgewicht erreicht ist. Dann wird die Massenkonzentration der Prüfsubstanz in der wässrigen Lösung, die keine ungelösten Substanzpartikel enthalten darf, mit einer geeigneten Analysemethode (3) bestimmt.

*Geräte*

22. Folgende Geräte werden benötigt:

— übliche Laborglasgeräte und -instrumente,

— eine Vorrichtung zum Schütteln der Lösungen bei konstanter Temperatur,

— eine Zentrifuge (möglichst thermostatisiert), falls diese bei Emulsionen erforderlich wird, und

— Analysegeräte.

*Verfahren*

23. Die zur Sättigung des vorgegebenen Wasservolumens erforderliche Prüfsubstanzmenge wird anhand der Ergebnisse des Vorversuches abgeschätzt. Etwa das Fünffache dieser Menge wird jeweils in drei mit Glasstopfen versehene Glasgefäße eingewogen (z. B. Zentrifugenröhrchen oder Kolben). Jedem Gefäß wird ein je nach Analysemethode und Löslichkeitsbereich gewähltes Wasservolumen zugesetzt. Die Gefäße werden fest verschlossen und dann bei 30 °C geschüttelt. Hierzu sollte ein Schüttel- oder Rührgerät verwendet werden, das bei einer konstanten Temperatur arbeitet, z. B. Magnetrührstäbe in einem thermostatisierten Wasserbad. Nach einem Tag wird eines der Gefäße 24 Stunden unter gelegentlichem Schütteln bei Prüftemperatur stehen gelassen, bis sich das Gleichgewicht eingestellt hat. Dann wird der Inhalt des Gefäßes bei Prüftemperatur zentrifugiert und die Konzentration der Prüfsubstanz in der klaren wässrigen Phase mit einem geeigneten Analyseverfahren bestimmt. Mit den beiden anderen Kolben wird

▼M4

nach zwei bzw. drei Tagen genauso verfahren, nachdem zuvor das Sättigungsgleichgewicht bei 30 °C eingestellt wurde. Weichen die gemessenen Konzentrationen bei mindestens den letzten beiden Gefäßen um nicht mehr als 15 % voneinander ab, ist die Prüfung als zufriedenstellend anzusehen. Wenn die Prüfergebnisse der Gefäße 1, 2 und 3 eine steigende Tendenz aufweisen, sollte die gesamte Prüfung unter Verlängerung der Zeiten für die Gleichgewichtseinstellung wiederholt werden.

24. Die Prüfung kann auch ohne Präinkubation bei 30 °C durchgeführt werden. Um den Grad des erreichten Sättigungsgleichgewichts zu bestimmen, werden so lange Proben entnommen, bis die gemessenen Konzentrationen nicht länger von der Rührzeit beeinflusst werden.

25. Der pH-Wert jeder Probe sollte vorzugsweise mit speziellen Indikatorstäbchen bestimmt werden.

**Analytische Bestimmungen**

26. Eine substanzspezifische Methode ist vorzuziehen, da bereits kleine Mengen von löslichen Verunreinigungen große Fehler bei der Bestimmung der Löslichkeit verursachen können. Beispiele für solche Analysemethoden sind: Gas- oder Flüssigchromatographie, Titrierverfahren, fotometrische Methoden, voltametrische Verfahren.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Daten**

*Säulen-Elutions-Methode*

27. Für jeden Durchlauf werden der Mittelwert und die Standardabweichung von mindestens fünf aufeinander folgenden Proben aus dem Bereich des Sättigungsplateaus berechnet. Die für zwei Prüfungen mit unterschiedlichen Durchflussleistungen berechneten Mittelwerte sollten nicht um mehr als 30 % voneinander abweichen.

*Kolben-Methode*

28. Die einzelnen Ergebnisse für jeden der drei Kolben, die nicht um mehr als 15 % voneinander abweichen sollten, werden gemittelt.

**Prüfbericht**

*Säulen-Elutions-Methode*

29. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

— die Ergebnisse des Vorversuchs,

— Angaben zur Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen), gegebenenfalls Vorreinigung,

— die Konzentrationen, Durchflussraten und pH-Werte jeder Probe,

— die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens fünf Proben aus dem Bereich des Sättigungsplateaus eines jeden Durchlaufs,

— den Durchschnitt von mindestens zwei aufeinanderfolgenden Durchläufen,

— die Wassertemperatur während des Sättigungsvorgangs,

— die Analysemethode,

— die Art des verwendeten Trägermaterials,

— die Beladung des Trägermaterials,

— das verwendete Lösungsmittel,

— gegebenenfalls Hinweise auf eine chemische Instabilität der Prüfsubstanz während des Prüfungsvorgangs,

— alle für die Auswertung der Ergebnisse sachdienlichen Informationen und Bemerkungen, insbesondere in Bezug auf Verunreinigungen und den Aggregatzustand der Prüfsubstanz.

▼**M4**

*Kolben-Methode*

30. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

— die Ergebnisse des Vorversuchs,

— Angaben zur Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen), gegebenenfalls Vorreinigung,

— die einzelnen Analysenergebnisse und die Durchschnittswerte, wenn pro Kolben mehr als ein Wert bestimmt wurde,

— den pH-Wert jeder Probe,

— den Mittelwert derjenigen Kolben, deren Ergebnisse übereinstimmen,

— die Prüftemperatur,

— die Analysemethode,

— gegebenenfalls Hinweise auf eine chemische Instabilität der Prüfsubstanz während des Prüfungsvorgangs,

— alle für die Auswertung der Ergebnisse sachdienlichen Informationen und Bemerkungen, insbesondere in Bezug auf Verunreinigungen und den Aggregatzustand der Prüfsubstanz.

*LITERATUR:*

1. Richtlinie 92/69/EWG der Kommission vom 31. Juli 1992 zur siebzehnten Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt, ABl.L 383 vom 29.12.1992, S. 113.

2. NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.

3. NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.

▼B

## A.8. VERTEILUNGSKOEFFIZIENT

### 1. METHODE

Der hier beschriebenen Schüttelmethode liegt die OECD-Prüfrichtlinie (1) zugrunde.

### 1.1. EINLEITUNG

Zur Durchführung der Prüfung ist es nützlich, Vorinformationen über die Strukturformel, die Dissoziationskonstante, die Wasserlöslichkeit, das Hydrolyseverhalten, die n-Oktanol-Löslichkeit und die Oberflächenspannung des Stoffes in wässriger Lösung zu haben.

Messungen von ionischen Substanzen sollten nur an deren nicht ionisierter Form (freie Säure oder freie Base) durch Verwendung eines geeigneten Puffers mit einem pH-Wert von mindestens einer pH-Einheit unter (freie Säure) oder über (freie Base) dem pK-Wert durchgeführt werden.

Diese Prüfmethode beinhaltet zwei getrennte Verfahren: die Schüttelmethode und die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie (HPLC). Die erste findet dann Anwendung, wenn der log-$P_{ow}$-Wert (Definitionen siehe unten) im Bereich — 2 bis 4 liegt, die letzte dann, wenn dieser Wert im Bereich 0 bis 6 liegt. Vor der Messung mit einer der beiden Methoden sollte eine Vorab-Schätzung des Verteilungskoeffizienten durchgeführt werden.

Die Schüttelmethode gilt nur für im Wesentlichen reine Substanzen, die in Wasser und n-Oktanol löslich sind. Sie ist nicht auf oberflächenaktive Stoffe anwendbar (für diese sollte ein berechneter oder ein geschätzter Wert auf der Grundlage der einzelnen Löslichkeiten in n-Oktanol und Wasser vorgelegt werden).

Die HPLC-Methode ist nicht für starke Säuren und Basen, Metallkomplexe, oberflächenaktive Stoffe oder für Substanzen anwendbar, die mit dem Eluenten reagieren. Für diese Stoffe sollte ein berechneter oder ein geschätzter Wert auf der Grundlage der einzelnen Löslichkeiten in n-Oktanol und Wasser vorgelegt werden.

Die HPLC-Methode ist bezüglich Verunreinigungen in der Prüfsubstanz weniger empfindlich als die Schüttelmethode. Dennoch kann die Interpretation der Ergebnisse in einigen Fällen durch das Vorliegen von Verunreinigungen erschwert werden, weil die Zuordnung der Peaks nicht eindeutig ist. Für Mischungen, die ein nicht aufgelöstes Band ergeben, sollten die obere und die untere Grenze des Zehnerlogarithmus (log P) angegeben werden.

### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Als Verteilungskoeffizient (P) bezeichnet man das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen ($c_i$) einer gelösten Substanz in einem Zweiphasensystem aus zwei weitgehend unmischbaren Lösungsmitteln. Im Falle von n-Oktanol und Wasser ergibt sich:

$$P_{ow} = \frac{c_n - \text{Oktanol}}{c_{\text{Wasser}}}$$

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

▼B

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

*Schüttelmethode*

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Methode von Zeit zu Zeit zu überprüfen und einen Vergleich mit den Ergebnissen aus anderen Methoden zu ermöglichen.

*HPLC-Methode*

Um die HPLC-Messdaten einer Substanz mit deren P-Wert zu korrelieren, ist eine Eichkurve log P/chromatografische Daten unter Verwendung von mindestens sechs Bezugspunkten aufzustellen. Die Wahl der geeigneten Referenzsubstanzen obliegt dem Benutzer. Soweit möglich, sollte mindestens eine Referenzsubstanz einen $P_{ow}$-Wert über dem der Prüfsubstanz und eine andere einen $P_{ow}$-Wert unter dem der Prüfsubstanz haben. Für log-P-Werte unter 4 kann bei der Eichung von Daten ausgegangen werden, die mit Hilfe der Schüttelmethode erhalten worden sind. Für log-P-Werte über 4 kann man sich bei der Eichung auf kalibrierte Literaturwerte stützen, sofern diese mit den berechneten Werten übereinstimmen. Aus Gründen einer größeren Genauigkeit sollten vorzugsweise Referenzsubstanzen verwendet werden, die strukturell mit der Prüfsubstanz verwandt sind.

Es liegen umfangreiche Listen mit log-$P_{ow}$-Werten für zahlreiche Gruppen von Chemikalien vor (2) (3). Wenn keine Verteilungskoeffizienten zu strukturell verwandten Verbindungen vorhanden sind, kann eine allgemeinere Eichung auf der Grundlage anderer Referenzsubstanzen vorgenommen werden.

Eine Liste der empfohlenen Referenzsubstanzen und deren $P_{ow}$-Werten ist in Anlage 2 enthalten.

1.4. PRINZIP DER METHODE

1.4.1. **Schüttelmethode**

Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten müssen nach Einstellung des Gleichgewichts zwischen allen wechselwirkenden Komponenten des Verteilungssystems die Konzentrationen der in beiden Phasen gelösten Substanz ermittelt werden. Die einschlägige Literatur zeigt, dass hierfür verschiedene Techniken vorhanden sind, wie z. B. die gründliche Mischung der beiden Phasen mit anschließender Phasentrennung zur Bestimmung der Gleichgewichtskonzentration der untersuchten Substanz.

1.4.2. **HPLC-Methode**

Die HPLC-Methode wird an Analysensäulen durchgeführt, die mit einer handelsüblichen festen Phase mit langen, chemisch an Siliziumdioxid gebundenen Kohlenwasserstoffketten (z. B. $C_8$, $C_{18}$) gefüllt sind. Chemikalien, die in eine solche Säule eingespritzt werden, bewegen sich darin wegen der unterschiedlichen Verteilungsgrade zwischen der mobilen und der stationären (Kohlenwasserstoffe) Phase mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Substanzgemische werden entsprechend dem hydrophoben Charakter der Bestandteile eluiert — zuerst die wasserlöslichen und zuletzt die öllöslichen; dabei erfolgt die Elution proportional zum jeweiligen Kohlenwasserstoff-Wasser-Verteilungskoeffizienten. Dadurch kann die Beziehung zwischen der Retentionszeit an einer solchen (Phasenumkehr-)Säule und dem Verteilungskoeffizienten für n-Oktanol/Wasser aufgestellt werden. Der Verteilungskoeffizient wird vom Kapazitätsfaktor k über die Formel

▼B

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

abgeleitet, wobei $t_R$ die Retentionszeit der Prüfsubstanz und $t_o$ die durchschnittliche Zeit ist, die ein Lösungsmittelmolekül für die Wanderung durch die Säule benötigt (Totzeit).

Quantitative Analysenmethoden sind nicht erforderlich; es müssen lediglich die Elutionszeiten bestimmt werden.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

1.5.1. **Wiederholbarkeit**

*Schüttelmethode*

Um die Genauigkeit des Verteilungskoeffizienten zu gewährleisten, sind Doppelbestimmungen bei drei verschiedenen Prüfbedingungen durchzuführen. Dazu sollen sowohl die eingesetzte Menge der untersuchten Substanz als auch das Verhältnis der Lösungsmittelvolumina verändert werden. Die so ermittelten Werte des Verteilungskoeffizienten, angegeben als deren Zehnerlogarithmus, sollen in einem Bereich von ± 0,3 log-Einheiten liegen.

*HPLC-Methode*

Um die Zuverlässigkeit der Messung zu erhöhen, sind Doppelbestimmungen durchzuführen. Die aus den Einzelmessungen abgeleiteten log-P-Werte sollen in einem Bereich von ± 0,1 log-Einheiten liegen.

1.5.2. **Empfindlichkeit**

*Schüttelmethode*

Der Messbereich der Methode wird durch die Nachweisgrenze des Analysenverfahrens festgelegt. Dieses sollte die Bestimmung von log-$P_{ow}$-Werten innerhalb eines Bereichs von — 2 bis 4 erlauben (sofern es die Bedingungen zulassen, kann dieser Bereich gelegentlich auf $P_{ow}$-Werte bis 5 erweitert werden, wenn die Konzentration der gelösten Substanz in keiner Phase größer als 0,01 Mol/l ist).

*HPLC-Methode*

Die HPLC-Methode erlaubt die Bestimmung von Verteilungskoeffizienten innerhalb eines $P_{ow}$-Bereichs von 0 bis 6.

Normalerweise lässt sich der Verteilungskoeffizient einer Verbindung innerhalb eines Bereichs von ± 1 log-Einheit des bei der Schüttelmethode gewonnenen Wertes bestimmen. Typische Korrelationen sind in der Literatur angegeben (4) (5) (6) (7) (8). Eine höhere Genauigkeit ist gewöhnlich zu erreichen, wenn die Korrelationskurven von strukturell verwandten Referenzsubstanzen ausgehen (9).

▼B

1.5.3. **Anwendbarkeit**

*Schüttelmethode*

Das Nernst'sche Verteilungsgesetz gilt nur für verdünnte Lösungen bei konstanter Temperatur, konstantem Druck und pH-Wert. Es gilt streng nur für eine reine Substanz, die zwischen zwei reinen Lösungsmitteln verteilt ist. Wenn mehrere gelöste Stoffe in einer oder beiden Phasen gleichzeitig vorkommen, kann dadurch das Ergebnis beeinflusst werden.

Dissoziation oder Assoziation gelöster Moleküle führen zu Abweichungen vom Nernst'schen Verteilungsgesetz. Solche Abweichungen zeigen sich darin, dass der Verteilungskoeffizient von der Konzentration der Lösung abhängig wird.

Wegen der auftretenden multiplen Verteilungsgleichgewichte sollte diese Prüfmethode für ionische Verbindungen nicht ohne entsprechende Korrekturen angewendet werden. Für derartige Verbindungen sollte die Benutzung von Pufferlösungen anstelle von Wasser erwogen werden; dabei sollte der pH-Wert des Puffers mindestens 1 pH-Einheit vom pKa-Wert der Substanz entfernt sein und die Bedeutung dieses pH-Wertes für die Umwelt berücksichtigt werden.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1. **Abschätzung des Verteilungskoeffizienten**

Der Verteilungskoeffizient wird vorzugsweise durch ein Berechnungsverfahren abgeschätzt (siehe Anlage 1); wo möglich, kann er aus dem Löslichkeitsverhältnis der Prüfsubstanz in den reinen Lösungsmitteln abgeschätzt werden (10).

1.6.2. **Schüttelmethode**

1.6.2.1. *Vorbereitung*

n-Oktanol: Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten soll mit sehr reinem Reagens durchgeführt werden.

Wasser: Es soll in Glas- oder Quarzgefäßen destilliertes bzw. doppelt destilliertes Wasser verwendet werden. Für ionische Verbindungen sollten, wenn begründbar, anstelle von Wasser Pufferlösungen verwendet werden.

*Anmerkung*

Direkt aus einem Ionenaustauscher entnommenes Wasser soll nicht benutzt werden.

1.6.2.1.1. Vorsättigung der Lösungsmittel

Vor der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten werden die Phasen des Lösungsmittelsystems durch Schütteln bei Prüftemperatur gegenseitig gesättigt. Dazu ist es zweckmäßig, zwei große Vorratsflaschen gefüllt mit sehr reinem n-Oktanol bzw. Wasser mit jeweils einer ausreichenden Menge des anderen Lösungsmittels zu versetzen, mit einem mechanischen Schüttelapparat 24 Stunden zu schütteln und dann so lange stehen zu lassen, bis sich die Phasen getrennt haben und der Sättigungszustand erreicht ist.

▼B

1.6.2.1.2. Vorbereitung der Prüfung

Das Gesamtvolumen des Zweiphasensystems soll das Prüfgefäß nahezu ausfüllen. Dadurch können Materialverluste aufgrund von Verdampfung verhindert werden. Das Volumenverhältnis und die einzusetzenden Mengen der Substanz werden durch die folgenden Angaben festgelegt:

— der vorläufige Schätzwert des Verteilungskoeffizienten (siehe 1.6.1),

— die für das Analysenverfahren erforderliche Mindestmenge an Prüfsubstanz und

— die Begrenzung der Konzentration in jeder Phase auf maximal 0,01 Mol/l.

Es sind drei Prüfungen durchzuführen. Bei der ersten wird das berechnete Volumenverhältnis n-Oktanol/Wasser eingesetzt, bei der zweiten wird dieses Verhältnis halbiert, bei der dritten verdoppelt (z. B. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Prüfsubstanz

Es wird eine Vorratslösung in mit Wasser vorgesättigtem n-Oktanol hergestellt. Die Konzentration dieser Vorratslösung soll vor deren Gebrauch zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten exakt bestimmt werden. Diese Lösung soll so gelagert werden, dass ihre Stabilität gewährleistet ist.

1.6.2.2. *Prüfbedingungen*

Die Prüftemperatur sollte zwischen 20 und 25 °C liegen und konstant (± 1 °C) gehalten werden.

1.6.2.3. *Messverfahren*

1.6.2.3.1. Einstellen des Verteilungsgleichgewichts

Für jede der Prüfbedingungen sollen zwei Prüfgefäße vorbereitet werden, die jeweils die erforderlichen, genau abgemessenen Mengen der beiden Lösungsmittel sowie die erforderliche Menge an Vorratslösung enthalten.

Die n-Oktanol-Phasen sollten volumetrisch bestimmt werden. Die Prüfgefäße sollten entweder mit einem geeigneten Schüttelapparat oder von Hand geschüttelt werden. Bei Verwendung eines Zentrifugenglases besteht ein empfohlenes Verfahren darin, das Glas rasch um 180 °C um seine Querachse zu drehen, so dass eventuell eingeschlossene Luft durch beide Phasen aufsteigt. Erfahrungsgemäß reichen im Allgemeinen 50 solcher Umdrehungen zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichts aus. Zur Sicherheit werden 100 Umdrehungen in 5 Minuten empfohlen.

1.6.2.3.2. Phasentrennung

Zur Trennung der Phasen sollte die Mischung, sofern erforderlich, in einer Laborzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Wenn eine Zentrifuge ohne Thermostat benutzt wird, sollten die Zentrifugengläser vor der Analyse mindestens 1 Stunde bei Prüftemperatur aufbewahrt werden, damit sich das Gleichgewicht einstellt.

▼B

1.6.2.4. *Analyse*

Zur Ermittlung des Verteilungskoeffizienten müssen die Konzentrationen der Prüfsubstanz in beiden Phasen analysiert werden. Dies kann dadurch geschehen, dass von jeder der beiden Phasen aus jedem Glas und für jede Prüfbedingung ein aliquoter Teil entnommen und mit dem gewählten Verfahren analysiert wird. Die in den beiden Phasen vorhandene Gesamtmenge der Substanz ist zu berechnen und mit der eingesetzten Menge zu vergleichen.

Die Probenahme aus der wässrigen Phase sollte so erfolgen, dass die Gefahr des Einschlusses von Spuren an n-Oktanol möglichst weitgehend vermindert wird; z. B. kann eine Glasspritze mit auswechselbarer Nadel zur Probenahme verwendet werden. Zuerst sollte die Spritze teilweise mit Luft gefüllt werden. Diese Luft sollte vorsichtig herausgedrückt werden, während die Nadel durch die n-Oktanol-Schicht hindurchgeführt wird. Ein ausreichendes Volumen an wässriger Phase wird in die Spritze gezogen. Die Spritze wird schnell aus der Lösung entfernt und die Nadel abgenommen. Der Inhalt der Spritze kann dann als wässrige Probe weiterverwendet werden. Die Konzentration in den beiden voneinander getrennten Phasen sollte am besten mit einem substanzspezifischen Verfahren ermittelt werden. Beispiele für möglicherweise geeignete Analysenverfahren sind:

— fotometrische Verfahren,

— Gaschromatografie,

— Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie.

1.6.3. **HPLC-Methode**

1.6.3.1. *Vorbereitung*

*Apparatur*

Erforderlich ist ein mit einer pulsfreien Pumpe und einem geeigneten Detektor ausgestatteter Flüssigkeitschromatograf. Dabei wird die Verwendung eines Einspritzventils mit Dosierschleife empfohlen. Die Leistung der HPLC-Säule kann durch das Vorhandensein polarer Gruppen in der stationären Phase ernsthaft beeinträchtigt werden. Deshalb sollten die stationären Phasen ein Minimum an polaren Gruppen haben (11). Es können handelsübliche Mikroteilchenfüllungen für die Umkehrphasenchromatografie oder Fertigsäulen verwendet werden. Zwischen dem Dosiersystem und der Analysensäule kann eine Vorsäule angebracht werden.

*Mobile Phase*

Zur Zubereitung des Elutionsmittels werden für die HPLC-Methode ausreichend reines Methanol und Wasser verwendet; das Elutionsmittel wird vor seiner Verwendung entgast. Es sollte das Verfahren der isokratischen Elution angewendet werden. Dabei werden Methanol-Wasser-Verhältnisse mit einem Mindestgehalt an Wasser von 25 % empfohlen. Im Normalfall ist eine Methanol-Wasser-Mischung im Volumenverhältnis 3:1 für die Eluierung von Verbindungen mit einem log-P-Wert von 6 bei einer Elutionszeit von einer Stunde ausreichend (Durchflussrate: 1 ml/min). Für Verbindungen mit einem hohen log-P-Wert kann eine Verkürzung der Elutionszeit (auch der der Referenzsubstanzen) durch Senkung der Polarität der mobilen Phase oder Kürzung der Säulenlänge erforderlich sein.

Stoffe mit einer sehr geringen Löslichkeit in n-Oktanol ergeben bei der HPLC-Methode häufig anormal niedriger log-$P_{ow}$-Werte; die Peaks dieser Stoffe begleiten mitunter die Lösungsmittelfront. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der Verteilungsprozess zu langsam ist, um innerhalb der normalerweise für eine HPLC-Trennung benötigten Zeit den Gleichgewichtszustand zu erreichen. In solchen Fällen kann die Verminderung der Durchflussrate und/oder des Methanol-Wasser-Verhältnisses ein wirksames Verfahren sein, um zu einem zuverlässigen Wert zu gelangen.

▼B

Prüf- und Referenzsubstanz sollten in der mobilen Phase in ausreichender Konzentration lösbar sein, um nachgewiesen werden zu können. Nur in Ausnahmefällen dürfen in der Methanol-Wasser-Mischung Zusatzstoffe verwendet werden, da diese Zusatzstoffe die Eigenschaften der Säule verändern. Für Chromatogramme, die mit Zusatzstoffen erhalten wurden, ist der Einsatz einer weiteren Säule desselben Typs zwingend vorgeschrieben. Wenn die Methanol-Wasser-Mischung ungeeignet ist, können andere Mischungen aus einem organischen Lösungsmittel und Wasser verwendet werden, so z. B. Ethanol-Wasser oder Acetonitril-Wasser.

Der pH-Wert des Lösungsmittels ist für ionische Verbindungen kritisch. Er sollte innerhalb des pH-Betriebsbereichs der Säule liegen, der sich im Allgemeinen zwischen 2 und 8 bewegt. Die Anwendung eines Puffers ist ratsam. Dabei muss darauf geachtet werden, dass kein Salz ausfällt und es nicht zur Beschädigung der Säule kommt, was bei einer Reihe von Mischungen von organischer Phase und Puffer möglich ist. HPLC-Messungen mit an Siliziumdioxid gebundener stationärer Phase und einem pH-Wert über 8 sind nicht empfehlenswert, da die Verwendung einer alkalischen mobilen Phase zu einem rapiden Nachlassen der Leistung der Säule führen kann.

*Referenz-/Prüfsubstanzen*

Die Referenzsubstanzen sollten den höchstmöglichen Reinheitsgrad haben. Das für Prüf- oder Eichzwecke zu verwendende Substanzgemisch wird, wenn möglich, in der mobilen Phase gelöst.

*Prüfbedingungen*

Die Temperatur sollte im Verlauf der Messungen um nicht mehr als ± 2 K schwanken.

1.6.3.2. ***Messung***

*Berechnung der Totzeit $t_o$*

Die Totzeit lässt sich entweder durch Verwendung einer homologen Reihe (z. B. n-Alkyl-Methyl-Ketone) oder durch nicht chromatografisch verzögerte organische Verbindungen (z. B. Thioharnstoff oder Formamid) bestimmen. Zur Berechnung der Totzeit $t_o$ mit Hilfe einer homologen Reihe werden mindestens 7 Komponenten einer homologen Reihe eingespritzt und die jeweiligen Retentionszeiten gemessen. Die Retentionszeiten $t_{r(nc + 1)}$ werden in Abhängigkeit von $t_{r(nc)}$ aufgetragen und anschließend der Schnittpunkt a und die Steigung b der Regressionsgleichung:

$$t_{r(nc + 1)} = a + b\ t_{r(nc)}$$

bestimmt ($n_c$ = Anzahl der Kohlenstoffatome). Die Totzeit $t_o$ ergibt sich dann aus:

$$t_o = a/(1 - b)$$

▼B

*Eichkurve*

Der nächste Schritt besteht in der Aufstellung einer Korrelationskurve log k/log P für geeignete Referenzsubstanzen. In der Praxis werden dazu zwischen 5 und 10 Standard-Referenzsubstanzen, deren log-P-Wert in der Nähe des erwarteten Bereichs liegt, gleichzeitig eingespritzt und die Retentionszeiten am besten mit Hilfe eines mit dem Nachweissystem gekoppelten registrierenden Integrators bestimmt. Die Logarithmen der entsprechenden Kapazitätsfaktoren (log k) werden berechnet und gegen die mittels der Schüttelmethode bestimmten log-P-Werte aufgezeichnet. Die Eichung wird in regelmäßigen Abständen, mindestens einmal täglich, vorgenommen, so dass eventuelle Veränderungen in der Leistung der Säule berücksichtigt werden können.

*Bestimmung des Kapazitätsfaktors der Prüfsubstanz*

Die Prüfsubstanz wird in möglichst geringer Menge der mobilen Phase eingespritzt. Die Retentionszeit wird (doppelt) bestimmt zur Berechnung des Kapazitätsfaktors k. Aus der Korrelationskurve der Referenzsubstanzen kann der Verteilungskoeffizient der Prüfsubstanz interpoliert werden. Bei sehr niedrigen und sehr hohen Verteilungskoeffizienten ist eine Extrapolation erforderlich. In diesen Fällen ist besonders auf die Vertrauensgrenzen der Regressionsgeraden zu achten.

2. **DATEN**

*Schüttelmethode*

Die Zuverlässigkeit der ermittelten P-Werte kann durch Vergleich der Mittelwerte der Doppelbestimmungen mit dem Gesamtmittelwert geprüft werden.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben

— genaue Spezifizierung der Substanz (Identität und Verunreinigungen);

— wenn die Methoden nicht anwendbar sind (z. B. bei oberflächenaktivem Material), sollte ein errechneter Wert oder ein Schätzwert auf der Grundlage der einzelnen n-Oktanol- und Wasserlöslichkeiten vorgelegt werden;

— alle für die Auswertung der Ergebnisse sachdienlichen Informationen und Bemerkungen, insbesondere in Bezug auf Verunreinigungen und den Aggregatzustand des Stoffes.

*Für die Schüttelmethode:*

— das Ergebnis der Abschätzung (wenn vorhanden);

— die Prüftemperatur;

— Angaben über die zur Konzentrationsbestimmung verwendeten Analysenverfahren;

— die Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit (wenn zutreffend);

▼B

— die in beiden Phasen bei jeder Bestimmung gemessenen Konzentrationen (d. h. insgesamt 12 Konzentrationen sollten angegeben werden);

— die Einwaage an Prüfsubstanz, das Volumen jeder Phase in jedem Prüfgefäß und die berechnete Gesamtmenge an Prüfsubstanz, die in jeder Phase nach Erreichen des Gleichgewichts enthalten ist;

— die berechneten Werte des Verteilungskoeffizienten (P) für jede Prüfung, der Mittelwert für jede Prüfbedingung und der Mittelwert aus allen Prüfungen sind anzugeben. Hinweise auf eine Konzentrationsabhängigkeit des Verteilungskoeffizienten sollten im Bericht vermerkt werden;

— die Standardabweichung der einzelnen P-Werte vom Mittelwert sollte angegeben werden;

— der Mittelwert P aus allen Prüfungen sollte auch als Zehnerlogarithmus angegeben werden;

— der mit einem Berechnungsverfahren ermittelte theoretische $P_{ow}$-Wert sollte angegeben werden, wenn er bestimmt wurde oder wenn der Messwert > $10^4$ ist;

— der pH-Wert des verwendeten Wassers und der wässrigen Phase während des Versuchs;

— bei Verwendung von Pufferlösungen: Begründung der Verwendung von Pufferlösungen anstelle von Wasser, Zusammensetzung, Konzentration und pH-Wert der Pufferlösungen, pH-Wert der wässrigen Phase vor und nach dem Versuch.

*Für die HPLC-Methode:*

— das Ergebnis der Abschätzung (wenn vorhanden);

— Prüf- und Referenzsubstanzen und deren Reinheitsgrad;

— Temperaturbereich der Prüfungen;

— pH-Wert, bei dem die Prüfungen vorgenommen wurden;

— nähere Angaben zur Analysen- und zur Vorsäule, zur mobilen Phase sowie zum Nachweisverfahren;

— Retentionswerte und log-P-Werte aus der Literatur für die bei der Eichung verwendeten Referenzsubstanzen;

— nähere Angaben zur Anpassung der Regressionsgeraden (log k/-log P);

— durchschnittliche Retentionswerte und interpolierter log-P-Wert für die Prüfsubstanz;

— Beschreibung der Ausrüstungen und der Betriebsbedingungen;

— Elutionsprofile;

— Mengen der auf die Säule gegebenen Prüf- und Referenzsubstanzen;

— Totzeit und entsprechendes Messverfahren.

▼B

4. **LITERATUR**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansch und A.J. Leo, Substitution Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir.) — Erhältlich bei Pomona College Medicinal Chemistry Project, 1982, Pomona College, Claremont, California, 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström und K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt und R. Fuerer, Pesric. Sei., 1981, vol. 12, 219.

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatog., 1982, vol. 247, 1.

(8) J.E. Haky und A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa und E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in: Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumspraxis (herausgegeben von E. Müller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/l, 223-339.

(11) R.F. Rekker und H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch und D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(13) R.F. Rekker, The Hydrophobie Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.

(15) C.V. Eadsforth und P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1 459.

(16) A. Leo, C. Hansch und D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani und E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1 207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson und G.E. Blau, Environ. Sei. Technol., 1974, vol. 8, 1 113.

(19) D.S. Brown und E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J.K. Seydel und K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.

▼B

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel, 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, CT. Murphy und P.J. Taylor, J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

*Anlage 1*

**Berechnungs-/Schätzverfahren**

EINLEITUNG

Eine allgemeine Einführung in die Berechnungsverfahren, Daten und Beispiele werden im Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a) gegeben.

Berechnete $P_{ow}$-Werte können verwendet werden:

— zur Entscheidung darüber, welche der Versuchsmethoden die geeignete ist (Bereich der Schüttelmethode: log $P_{ow}$: - 2 bis 4; Bereich der HPLC-Methode: log $P_{ow}$: 0 bis 6);

— zur Wahl der geeigneten Prüfbedingungen (z. B. Referenzsubstanzen für die HPLC-Verfahren, Volumenverhältnis n-Oktanol/Wasser für die Schüttelmethode);

— zur laborinternen Überprüfung eventueller Versuchsfehler;

— zur $P_{ow}$-Bestimmung in solchen Fällen, wo die Prüfmethoden aus technischen Gründen nicht anwendbar sind.

**ABSCHÄTZVERFAHREN**

*Vorläufige Abschätzung des Verteilungskoeffizienten*

Der Wert des Verteilungskoeffizienten kann durch Verwendung der Löslichkeitswerte der Prüfsubstanz in den reinen Lösungsmitteln abgeschätzt werden:

Dafür gilt:

$$P_{\text{Schätzwert}} = \frac{\text{Sättigung } c_{n-\text{Oktand}}}{\text{Sättigung } c_{\text{Wasser}}}$$

**BERECHNUNGSVERFAHREN**

*Prinzip der Berechnungsverfahren*

Sämtliche Berechnungsverfahren beruhen auf der formalen Aufspaltung des Moleküls in geeignete Substrukturen, für die zuverlässige log-$P_{ow}$-Inkremente bekannt sind. Der log-$P_{ow}$-Wert des gesamten Moleküls wird danach als Summe seiner entsprechenden Teilwerte plus Summe der Korrekturglieder für intramolekulare Wechselwirkungen berechnet.

Aufstellungen über die Konstanten von Substrukturen und den Korrekturgliedern liegen vor (b) (c) (d) (e). Einige davon werden regelmäßig aktualisiert (b).

**Qualitätskriterien**

Im Allgemeinen nimmt die Zuverlässigkeit des Berechnungverfahrens in dem Maße ab, in dem die Komplexität der Prüfsubstanz zunimmt. Bei einfachen Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht und einer oder zwei funktioneller Gruppen ist mit einer Abweichung von 0,1 bis 0,3 log-$P_{ow}$-Einheiten von den Ergebnissen der verschiedenen Fragmentmethoden gegenüber dem Messwert zu rechnen. Bei komplexeren Substanzen kann die Fehlerspanne größer sein. Dies hängt von der Zuverlässigkeit und der Verfügbarkeit der Konstanten für die Substrukturen sowie von der Fähigkeit der Erkennung intramolekularer Wechselwirkungen (z. B. Wasserstoffbindungen) und der richtigen Anwendung der Korrekturglieder ab (was mit dem Computer-Programm CLOGP-3 ein geringeres Problem ist) (b). Bei ionischen Substanzen ist die richtige Berücksichtigung der Ladung oder des Ionisierungsgrades wichtig.

▼B

**Berechnungsverfahren**

*Hansch'sche π-Methode*

Die ursprünglich für hydrophobe Substituenten verwendete Konstante π, eingeführt von Fujita et al. (f), wird wie folgt definiert:

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

wobei $P_{ow}$ (PhX) der Verteilungskoeffizient eines aromatischen Abkömmlings und $P_{ow}$ (PhH) derjenige der Ausgangssubstanz ist:

(z.B. $\pi_{Cl} = \log P_{ow}$ ($C_6H_5Cl$) - $\log P_{ow}$ ($C_6H_6$) = 2,84 - 2,13 = 0,71).

Nach seiner Definition ist die π-Methode vorwiegend bei der aromatischen Substitution anwendbar. Die π-Werte liegen für eine große Anzahl von Substituenten tabelliert vor (b) (c) (d). Sie werden für die Berechnung der log-$P_{ow}$-Werte für aromatische Moleküle oder Substrukturen verwendet.

*Rekker-Methode*

Nach Rekker (g) wird der log-$P_{ow}$-Wert wie folgt berechnet:

(Wechselwirkungsglieder)

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

wobei $f_i$ die verschiedenen Konstanten der Substrukturen und $a_i$ die Häufigkeit ihres Vorkommens in der Prüfsubstanz darstellen. Die Korrekturglieder lassen sich als ein ganzes Vielfaches einer einzigen Konstante $C_m$ (der so genannten „magischen Konstante“) angeben. Die Substrukturkonstanten $f_i$ und $C_m$ wurden aus einer Liste von 1 054 experimentell ermittelten $P_{ow}$-Werten (825 Verbindungen) mit Hilfe der mehrfachen Regressionsanalyse bestimmt (c) (h). Die Bestimmung der Glieder für die Wechselwirkungen erfolgt auf der Grundlage der in der Literatur angegebenen Regeln (e) (h) (i).

*Hansch-Leo-Methode*

Nach Hansch und Leo (c) wird der log-$P_{ow}$-Wert aus der Beziehung

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

errechnet, wobei $f_i$ die verschiedenen Konstanten der Substrukturen, $F_j$ die Korrekturglieder und $a_i$, $b_j$ die entsprechenden Vorkommenshäufigkeiten sind. Eine Liste der Substrukturwerte für einzelne Atome und Gruppen, abgeleitet aus experimentell bestimmten $P_{ow}$-Werten, und eine Liste der Korrekturglieder $F_j$ (so genannte „Faktoren“) wurden durch die Trial-and-error-Methode erhalten. Die Korrekturglieder sind in mehrere unterschiedliche Kategorien eingeordnet worden (a) (c). Es ist relativ kompliziert und zeitraubend, alle Regeln und Korrekturglieder zu berücksichtigen. Software-Pakete sind entwickelt worden (b).

*Kombinierte Methode*

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

**Anmerkungen**

i) Die Berechnungsmethoden können auf teilweise oder vollständig ionisierte Substanzen nur dann angewendet werden, wenn die erforderlichen Korrekturfaktoren berücksichtigt werden können.

▼B

ii) Wenn von intramolekularen Wasserstoffbindungen ausgegangen werden kann, müssen die entsprechenden Korrekturglieder (etwa + 0,6 bis + 1,0 log-$P_{ow}$-Einheiten) addiert werden (a). Hinweise auf das Vorliegen solcher Bindungen lassen sich aus Stereo-Modellen oder spektroskopischen Daten der Substanz gewinnen.

iii) Wenn mehrere tautomere Formen möglich sind, sollte als Berechnungsgrundlage die wahrscheinlichste Form verwendet werden.

iv) Die Überarbeitungen der Listen der Substrukturkonstanten sollten sorgfältig verfolgt werden.

**Abschlussbericht**

Bei der Verwendung der Berechnungs-/Abschätzmethoden sollte der Prüfbericht, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— Beschreibung der Substanz (Gemisch, Verunreinigungen usw.),

— Hinweis auf eine eventuell vorliegende intramolekulare Wasserstoffbindung, Dissoziation, Ladung oder irgendwelche anderen ungewöhnlichen Effekte (z. B. Tautomerie),

— Beschreibung des Berechnungsverfahrens,

— Identität oder Bereitstellung der Datenbasis,

— Besonderheiten bei der Wahl der Substrukturen,

— ausführliche Dokumentation zur Berechnung.

**LITERATUR**

(a) WJ. Lyman, W.F. Reehl und D.H. Rosenblatt (Hrsg.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch und A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo und C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev. 1971, vol. 71, 525.

(e) R.F. Rekker und H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther., 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa und C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc, 1964, vol. 86, 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophopic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, vol. 1, Elsevier, New York, 1977.

(h) C.V. Eadsforth und P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, 225.

▼B

*Anlage 2*

**Empfohlene Referenzsubstanzen für die HPLC-Methode**

| Nr. | Referenzsubstanz | log $P_{ow}$ | pKa |
|---|---|---|---|
| 1 | 2-Butanon | 0,3 | |
| 2 | 4-Acetylpyridin | 0,5 | |
| 3 | Anilin | 0,9 | |
| 4 | Acetanilid | 1,0 | |
| 5 | Bcnzylalkohol | 1,1 | |
| 6 | p-Methoxyphenol | 1,3 | pKa = 10,26 |
| 7 | Phenoxyessigsäure | 1,4 | pKa = 3,12 |
| 8 | Phenol | 1,5 | pKa = 9,92 |
| 9 | 2,4-Dinitrophenol | 1,5 | pKa = 3,96 |
| 10 | Benzonitril | 1,6 | |
| 11 | Phenylacetonitril | 1,6 | |
| 12 | 4-MethyIbenzylalkohol | 1,6 | |
| 13 | Acetophenon | 1,7 | |
| 14 | 2-Nitrophenol | 1,8 | pKa = 7,17 |
| 15 | 3-Nitrobenzoesäure | 1,8 | pKa = 3,47 |
| 16 | 4-Chloranilin | 1,8 | pKa = 4,15 |
| 17 | Nitrobenzol | 1,9 | |
| 18 | Zinnamylalkohol | 1,9 | |
| 19 | Benzoesäure | 1,9 | pKa = 4,19 |
| 20 | p-Kresol | 1,9 | pKa = 10,17 |
| 21 | Zinnamylalkohol | 2,1 | pKa = 3,89 cis 4,44 trans |
| 22 | Anisol | 2,1 | |
| 23 | Methylbenzoat | 2,1 | |
| 24 | Benzol | 2,1 | |
| 25 | 3-Methylbenzoesäure | 2,4 | pKa = 4,27 |
| 26 | 4-Chlorphenol | 2,4 | pKa = 9,1 |
| 27 | Trichlorethylen | 2,4 | |
| 28 | Atrazin | 2,6 | |
| 29 | Ethylbenzoat | 2,6 | |
| 30 | 2,6-Dichlorbenzonitril | 2,6 | |
| 31 | 3-Chlorbenzoesäure | 2,7 | pKa = 3,82 |
| 32 | Toluol | 2,7 | |
| 33 | 1-Naphthol | 2,7 | pKa = 9,34 |
| 34 | 2,3-Dichloranilin | 2,8 | |
| 35 | Chlorbenzol | 2,8 | |
| 36 | Allyl-Phenylether | 2,9 | |
| 37 | Bromobenzol | 3,0 | |

▼B

| Nr. | Referenzsubstanz | log $P_{ow}$ | pKa |
|---|---|---|---|
| 38 | Ethylbenzol | 3,2 | |
| 39 | Benzophenon | 3,2 | |
| 40 | 4-Phenylphenol | 3,2 | pKa = 9,54 |
| 41 | Thymol | 3,3 | |
| 42 | 1,4-Dichlorbenzol | 3,4 | |
| 43 | Diphenylamin | 3,4 | pKa = 0,79 |
| 44 | Naphthalen | 3,6 | |
| 45 | Phenylbenzoat | 3,6 | |
| 46 | Isopropylbenzol | 3,7 | |
| 47 | 2,4,6-Trichlorphenol | 3,7 | pKa = 6 |
| 48 | Biphenyl | 4,0 | |
| 49 | Benzylbenzoat | 4,0 | |
| 50 | 2,4-Dinitro-6 sec. butylphenol | 4,1 | |
| 51 | 1,2,4-Trichlorbenzol | 4,2 | |
| 52 | Dodekansäure | 4,2 | |
| 53 | Diphenylether | 4,2 | |
| 54 | n-Butylbenzol | 4,5 | |
| 55 | Phenanthren | 4,5 | |
| 56 | Fluoranthen | 4,7 | |
| 57 | Dibenzyl | 4,8 | |
| 58 | 2,6-Diphenylpyridin | 4,9 | |
| 59 | Triphenylamin | 5,7 | |
| 60 | DDT | 6,2 | |
| | Sonstige Referenzsubstanzen mit niedrigem log-$P_{ow}$-Wert | | |
| 1 | Nikotinsäure | - 0,07 | |

▼B

A.9. **FLAMMPUNKT**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Es ist sinnvoll, vor Durchführung einer Flammpunktbestimmung Vorinformationen über die Entzündlichkeit der Prüfsubstanz zu haben. Das Prüfverfahren ist auf flüssige Substanzen anwendbar, deren Dämpfe durch Zündquellen entflammt werden können. Die in diesem Text beschriebenen Prüfmethoden ergeben nur für diejenigen Flammpunktbereiche, die bei den einzelnen Verfahren angegeben werden, zuverlässige Werte.

Bei der Wahl der anzuwendenden Methode sollten eventuelle chemische Reaktionen zwischen der Substanz und dem Probentiegel berücksichtigt werden.

1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Der Flammpunkt ist die niedrigste Temperatur, bezogen auf einen Druck von 101,325 kPa, bei der sich unter den bei der Prüfmethode angegebenen Bedingungen aus einer Flüssigkeit Dämpfe in einer solchen Menge entwickeln, dass sich im Tiegel ein durch Fremdzündung entflammbares Dampf-Luft-Gemisch bildet.

Einheiten: $^{o}C$

$t = T - 273,15$

(t in $^{o}C$ und T in K)

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Referenzsubstanzen müssen nicht in allen Fällen verwendet werden, in denen eine neue Prüfsubstanz untersucht wird. Die Referenzsubstanzen sollten in erster Linie dazu dienen, die Methode von Zeit zu Zeit zu überprüfen, ob bei der Prüftemperatur eine Entzündung stattfinden kann oder nicht.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird in einen Tiegel gefüllt und nach dem bei der jeweiligen Prüfmethode angegebenen Verfahren auf die Prüftemperatur erwärmt oder abgekühlt. Zündversuche werden ausgeführt, um festzustellen, ob bei der Prüftemperatur eine Zündung stattgefunden hat oder nicht.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

1.5.1. **Wiederholbarkeit**

Die Wiederholbarkeit hängt ab vom Flammpunktbereich und der angewandten Prüfmethode; max. ± 2 $^{o}C$.

1.5.2. **Empfindlichkeit**

Die Empfindlichkeit hängt von der angewandten Prüfmethode ab.

1.5.3. **Anwendbarkeit**

Die Anwendbarkeit einiger Flammpunktprüfmethoden ist auf bestimmte Flammpunktbereiche beschränkt und hängt von substanzspezifischen Eigenschaften ab (z. B. hohe Viskosität).

▼B

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1. **Vorbereitungen**

Die zu prüfende Substanz wird in den jeweiligen Prüftiegel (siehe 1.6.3.1 und/oder 1.6.3.2) eingefüllt.

Aus Sicherheitsgründen wird empfohlen, für energiereiche oder toxische Substanzen ein Verfahren mit einer kleinen Probengröße (etwa 2 $cm^3$) anzuwenden.

1.6.2. **Versuchsbedingungen**

Soweit dies aus Sicherheitsgründen möglich ist, sollte das Prüfgerät vor Zugluft geschützt aufgestellt werden.

1.6.3. **Versuchsausführung**

1.6.3.1. *Gleichgewichtsmethode*

Siehe dazu: ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Nicht-Gleichgewichtsmethode*

*Gerät nach Abel*

Siehe dazu: BS 2000 Teil 170, NF M07-011, NF T66-009.

*Gerät nach Abel-Pensky*

Siehe dazu: EN 57, DIN 51755 Teil 1 (für Temperaturen von 5 °C bis 65 °C), DIN 51755 Teil 2 (für Temperaturen unter 5 °C), NF M07-036.

*Gerät nach Tag*

Siehe dazu: ASTM D 56.

*Gerät nach Pensky-Martens*

Siehe dazu: ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019.

*Anmerkungen*

Wird mit einer Nicht-Gleichgewichtsmethode wie in 1.6.3.2 ein Flammpunkt von (0 ± 2) °C, (21 ± 2) °C oder (55 ± 2) °C ermittelt, sollte das Prüfergebnis mit dem gleichen Gerät, jedoch unter Verwendung einer Gleichgewichtsmethode, bestätigt werden.

Für eine Anmeldung dürfen nur diejenigen Methoden angewandt werden, bei denen der Zahlenwert des Flammpunktes bestimmt wird.

Zur Bestimmung des Flammpunktes viskoser Flüssigkeiten (Farben, Klebstoffe und Ähnliches), die Lösemittel enthalten, dürfen nur solche Prüfgeräte und Prüfmethoden angewandt werden, die zur Bestimmung des Flammpunktes viskoser Flüssigkeiten geeignet sind.

Siehe dazu: ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 Teil 1.

▼B

2. **DATEN**

3. **BERICHT**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen),

— die angewandte Prüfmethode sowie eventuelle Abweichungen davon,

— die Ergebnisse sowie alle zusätzlichen Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung sind.

4. **LITERATUR**

Keine.

▼B

A.10. **ENTZÜNDLICHKEIT (FESTE STOFFE)**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Es ist zweckdienlich, vor Ausführung der Prüfung Informationen über mögliche explosive Eigenschaften der Prüfsubstanz einzuholen.

Diese Methode kann nur bei pulverförmigen, körnigen oder pastenförmigen Substanzen angewendet werden.

Um nicht alle Stoffe zu erfassen, die entzündet werden können, sondern nur solche, die schnell brennen oder deren Brennverhalten besonders gefährlich ist, sollen nur diejenigen Stoffe als leichtentzündlich eingestuft werden, deren Abbrandgeschwindigkeit einen bestimmten Grenzwert überschreitet.

Es kann besonders gefährlich sein, wenn sich das Glühen in einem Metallpulver ausbreitet, weil glühende Metallpulver schwer zu löschen sind. Metallpulver sind als leichtentzündlich zu beurteilen, wenn sie über die gesamte Länge der Schüttung innerhalb einer festgelegten Zeit durchglühen.

1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Die Abbrandzeit wird in Sekunden ausgedrückt.

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Nicht spezifiziert.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Die Substanz wird zu einem durchgehenden Strang oder einer Schüttung von etwa 250 mm Länge geformt; danach wird ein Vorversuch vorgenommen, um zu prüfen, ob es bei Entzündung mit einer Gasflamme zu einer Ausbreitung des Brandes mit Flammen oder durch Glimmen kommt. Wenn es innerhalb einer festgelegten Zeit zu einer Ausbreitung über 200 mm der Schüttung kommt, wird ein vollständiges Testprogramm zur Bestimmung der Brenngeschwindigkeit durchgeführt.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Nicht genannt.

▼B

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1. **Vorversuch**

Die Substanz wird auf einer nicht brennbaren und nichtporösen Platte mit geringer Wärmeleitfähigkeit zu einem durchgehenden Strang oder einer Schüttung von 250 mm Länge, 20 mm Breite und 10 mm Höhe geformt. Danach wird die heiße Flamme eines Gasbrenners (Mindestdurchmesser 5 mm) auf ein Ende der Schüttung gerichtet, bis sich das Pulver entzündet, maximal 2 Minuten (5 Minuten für Pulver von Metallen oder Metalllegierungen). Dabei ist festzustellen, ob sich der Brand innerhalb des Prüfzeitraumes von 4 Minuten (40 Minuten bei Metallpulvern) über eine Länge von 200 mm der Schüttung ausbreitet. Wenn sich die Substanz nicht entzündet und sich keine Verbrennung mit einer Flamme oder mit Glimmen innerhalb von 4 Minuten (bzw. 40 Minuten) über eine Länge von 200 mm der Schüttung ausbreitet, ist die Substanz nicht als leichtentzündlich zu beurteilen, und es ist keine weitere Prüfung erforderlich. Wenn sich der Brand in der Substanz in weniger als 4 Minuten (bzw. in weniger als 40 Minuten für Metallpulver) über eine Länge von 200 mm der Schüttung ausbreitet, ist das nachstehend beschriebene Verfahren (Punkt 1.6.2 und folgende) auszuführen.

1.6.2. **Prüfung der Brenngeschwindigkeit**

1.6.2.1. *Vorbereitung*

Pulverförmige oder körnige Substanzen werden locker in eine Form von 250 mm Länge und einem dreieckigen Querschnitt mit einer inneren Höhe von 10 mm und einer Breite von 20 mm gefüllt. Die Form wird an beiden Längsseiten von zwei Metallblechen begrenzt, die die dreieckige Form um 2 mm überragen (siehe Abbildung). Die gefüllte Form wird dreimal aus einer Höhe von 2 cm auf eine feste Unterlage fallen gelassen. Falls nötig, wird die Form danach aufgefüllt. Dann werden die seitlichen Begrenzungen entfernt, und die überschüssige Substanzmenge wird abgetrennt. Schließlich wird eine nicht brennbare und nichtporöse Platte mit geringer Wärmeleitfähigkeit auf die Form gelegt, das Ganze um 180° gedreht und die Form entfernt.

Pastenförmige Substanzen werden in Form eines Stranges von 250 mm Länge und mit einem Querschnitt von etwa 1 $cm^2$ auf eine nicht brennbare und nichtporöse Platte mit geringer Wärmeleitfähigkeit aufgebracht.

1.6.2.2. *Versuchsbedingungen*

Hygroskopische Prüfsubstanzen sollen so schnell wie möglich nach der Entnahme aus dem Behälter geprüft werden.

1.6.2.3. *Versuchsausführung*

Die Schüttung wird quer zur Zugrichtung in einem Abzug angeordnet.

Die Absauggeschwindigkeit muss so hoch sein, dass Rauch nicht in das Labor dringen kann; sie soll auch während des Versuchs nicht verändert werden. Um die Versuchsanordnung herum ist ein Windschutz aufzustellen.

Zum Anzünden der Schüttung an einem Ende wird die heiße Flamme eines Gasbrenners (Mindestdurchmesser 5 mm) verwendet. Nach einem Abbrand über eine Länge von 80 mm der Schüttung ist die Abbrandzeit über die folgenden 100 mm zu messen.

▼B

Der Versuch ist sechsmal auszuführen, wenn nicht vorher ein positives Ergebnis beobachtet wird. Für jeden Versuch ist eine saubere, kalte Platte zu verwenden.

2. **DATEN**

Die Abbrandzeit aus dem Vorversuch (1.6.1) und die kürzeste Abbrandzeit aus sechs Versuchen (1.6.2.3) sind maßgebend für die Beurteilung.

3. **BERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— eine genaue Spezifizierung der Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen),

— eine Beschreibung der Prüfsubstanz, deren Aggregatzustand, einschließlich Feuchtegehalt,

— die Ergebnisse des Vorversuchs und der Prüfung der Brenngeschwindigkeit (wenn durchgeführt),

— alle zusätzlichen Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung sind.

3.2. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Pulverförmige, körnige oder pastenförmige Prüfsubstanzen werden als leichtentzündlich beurteilt, wenn die Abbrandzeit bei einem der unter 1.6.2 beschriebenen Versuche kürzer ist als 45 Sekunden. Pulver von Metallen oder Metalllegierungen werden als leichtentzündlich beurteilt, wenn sie entzündet werden können und sich die Flamme oder die Reaktionszone innerhalb von 10 Minuten oder darunter über die gesamte Probe ausbreitet.

4. **LITERATUR**

(1) NF T 20-042 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

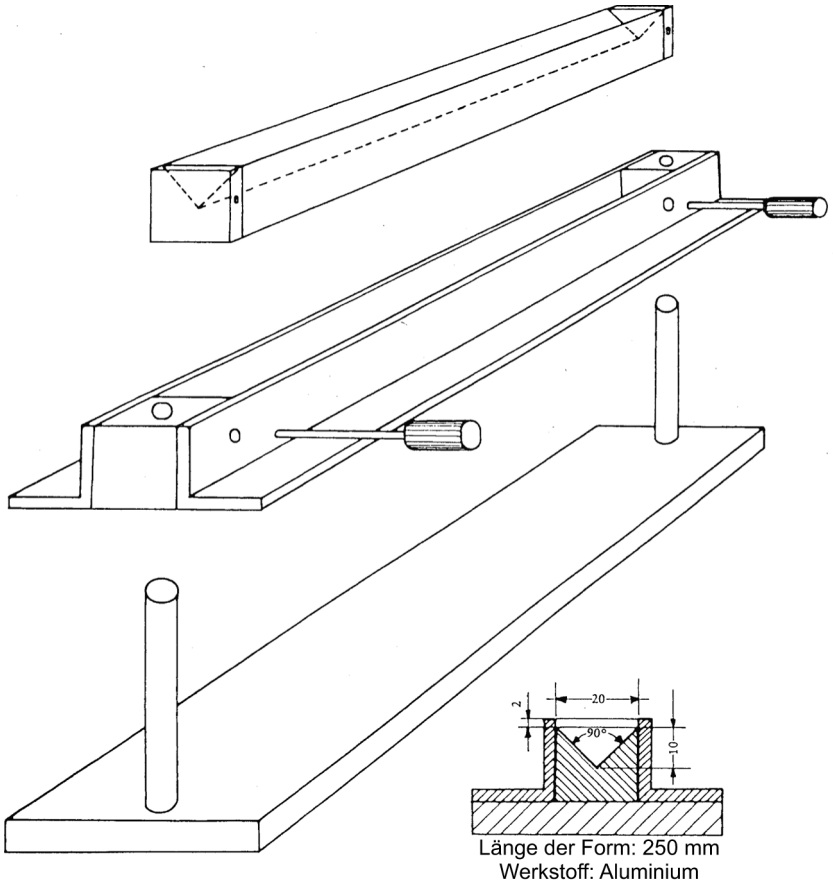
▼B

*Anlage*

*Abbildung*

**Form und Zubehör zur Herstellung der Schüttung**

(alle Maßangaben in mm)




Länge der Form: 250 mm
Werkstoff: Aluminium

▼B

A.11. **ENTZÜNDLICHKEIT (GASE)**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Mit dieser Methode lässt sich bestimmen, ob Gase im Gemisch mit Luft bei atmosphärischem Druck und Raumtemperatur (etwa 20 °C) einen Explosionsbereich haben. Gemische mit steigender Konzentration des zu prüfenden Gases mit Luft werden einem elektrischen Funken ausgesetzt, und man beobachtet, ob eine Entzündung erfolgt.

1.2. DEFINITION UND EINHEITEN

Der Explosionsbereich ist der Konzentrationsbereich zwischen der unteren und der oberen Explosionsgrenze. Die untere und die obere Explosionsgrenze bezeichnen die beiden Grenzwerte des Brenngasgehaltes im Brenngas/Luft-Gemisch, bei denen eine selbständige Flammenausbreitung von der Zündquelle her gerade nicht mehr auftritt.

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Nicht spezifiziert.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Der Gasanteil im Gas/Luft-Gemisch wird stufenweise erhöht und das Gemisch jeweils einem elektrischen Funken ausgesetzt.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Nicht spezifiziert.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1. **Gerät**

Das Versuchsgefäß ist ein aufrecht stehender Glaszylinder mit einem inneren Durchmesser von mindestens 50 mm und einer Mindesthöhe von 300 mm. Die Zündelektroden befinden sich 60 mm über dem Boden des Zylinders und haben einen Abstand von 3 mm bis 5 mm voneinander. Der Zylinder ist mit einer Druckentlastungsöffnung versehen. Das Gerät ist mit einem Schutzschirm versehen, um Explosionsschäden zu vermeiden.

Ein Induktionsfunken von 0,5 s Dauer, der mittels eines Hochspannungstransformators von 10 bis 15 kV Sekundärspannung (maximale Leistungsaufnahme: 300 W) erzeugt wird, dient als Zündquelle. Ein Beispiel eines geeigneten Gerätes ist in (2) beschrieben.

1.6.2. **Versuchsbedingungen**

Der Versuch muss bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) ausgeführt werden.

▼B

1.6.3. **Versuchsausführung**

Mit Hilfe von Dosierpumpen wird ein Gas/Luft-Gemisch bekannter Konzentration in den Glaszylinder geleitet. Danach wird mit dem Induktionsfunken gezündet und beobachtet, ob sich eine Flamme von der Zündquelle ablöst und selbständig ausbreitet oder nicht. Der Gasanteil wird beginnend bei 1 % Volumenanteil) stufenweise um 1 % erhöht, bis eine wie oben beschriebene Entzündung erfolgt.

Wenn die chemische Struktur auf ein nicht entzündbares Gas schließen lässt und die Zusammensetzung des stöchiometrischen Gemisches mit Luft errechnet werden kann, dann brauchen nur Gemische in einem Bereich zwischen 10 % unterhalb und 10 % oberhalb der stöchiometrischen Zusammensetzung in 1 %-Stufen geprüft zu werden.

2. **DATEN**

Das Auftreten der Flammenablösung ist die einzige relevante Information zur Bestimmung dieser Eigenschaft.

3. **BERICHT**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen),

— eine Beschreibung des benutzten Gerätes (mit Abmessungen),

— die Temperatur, bei der der Versuch durchgeführt wurde,

— die geprüften Konzentrationen und die erhaltenen Ergebnisse,

— das Versuchsergebnis: nicht entzündbares oder leichtentzündliches Gas,

— wenn das Ergebnis „nicht entzündbar“ lautet, ist der Konzentrationsbereich, über den es in 1 %-Schritten geprüft wurde, anzugeben,

— alle Informationen und Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung sind.

4. **LITERATUR**

(1) NF T 20-041 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. „Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen“. Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 2, 126/127.

▼B

## A.12. ENTZÜNDLICHKEIT (BERÜHRUNG MIT WASSER)

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Diese Prüfmethode kann angewendet werden, um festzustellen, ob die Reaktion eines Stoffes mit Wasser oder feuchter Luft zur Entwicklung gefährlicher Mengen von leichtentzündlichen Gasen führt.

Das Verfahren kann sowohl für feste als auch für flüssige Stoffe angewendet werden. Dieses Verfahren gilt jedoch nicht für Stoffe, die sich bei Berührung mit Luft selbst entzünden.

#### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Leichtentzündlich: Stoffe, die bei Berührung mit Wasser oder feuchter Luft leichtentzündliche Gase in gefährlichen Mengen (mindestens 1 l/kg.h) entwickeln.

#### 1.3. PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird in der nachfolgend beschriebenen Reihenfolge geprüft; erfolgt auf irgendeiner Stufe eine Entzündung, so ist keine weitere Prüfung mehr notwendig. Wenn bekannt ist, dass die Substanz bei Berührung mit Wasser keine heftige Reaktion zeigt, kann man zu Stufe 4 übergehen (1.3.4).

##### 1.3.1. **Stufe 1**

Die Prüfsubstanz wird in eine Schale gegeben, die destilliertes Wasser mit einer Temperatur von 20 °C enthält; dabei wird festgestellt, ob sich das hierbei entwickelte Gas entzündet oder nicht.

##### 1.3.2. **Stufe 2**

Die Prüfsubstanz wird auf ein Filterpapier gegeben, das auf der Oberfläche des Wassers einer mit destilliertem Wasser von 20 °C gefüllten Schale schwimmt; dabei wird festgestellt, ob sich das entwickelte Gas entzündet oder nicht. Das Filterpapier dient nur dazu, die Substanz an der betreffenden Stelle zu halten, wodurch die Möglichkeit einer Entzündung erhöht wird.

##### 1.3.3. **Stufe 3**

Mit der Prüfsubstanz wird eine kleine Schüttung von etwa 2 cm Höhe und 3 cm Durchmesser hergestellt. Es werden einige Tropfen Wasser auf diese Schüttung gegeben, und es wird festgestellt, ob sich das entwickelte Gas entzündet oder nicht.

##### 1.3.4. **Stufe 4**

Die Prüfsubstanz wird mit destilliertem Wasser (20 °C) versetzt, und die entwickelte Gasmenge wird über einen Zeitraum von 7 Stunden in Abständen von je einer Stunde gemessen. Ist die Gasentwicklung ungleichmäßig oder nimmt sie nach 7 Stunden noch zu, so ist der Versuchszeitraum bis zu einer Dauer von 5 Tagen zu verlängern. Die Prüfung kann abgebrochen werden, wenn die Gasentwicklungsrate zu irgendeinem Zeitpunkt 1 l/kg.h übersteigt.

▼B

1.4. REFERENZSUBSTANZEN

Nicht spezifiziert.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine Angabe.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1. **Stufe 1**

1.6.1.1. *Versuchsbedingungen*

Der Versuch wird bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) ausgeführt.

1.6.1.2. *Versuchsausführung*

Eine geringe Menge (etwa 2 mm Durchmesser) der Prüfsubstanz wird in eine Schale mit destilliertem Wasser gegeben. Es wird notiert, i) ob sich Gas entwickelt und ii) ob sich das Gas entzündet. Entzündet sich das Gas, so braucht die Substanz nicht weiter geprüft zu werden, da sie als gefährlich zu betrachten ist.

1.6.2. **Stufe 2**

1.6.2.1. *Gerät*

Ein Filterpapier wird flach auf die Oberfläche des in ein geeignetes Gefäß gefüllten destillierten Wassers gelegt; als Gefäß kann z. B. eine Abdampfschale mit ca. 100 mm Durchmesser dienen.

1.6.2.2. *Versuchsbedingungen*

Der Versuch wird bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) durchgeführt.

1.6.2.3. *Versuchsausführung*

Eine geringe Menge (etwa 2 mm Durchmesser) der Prüfsubstanz wird mitten auf das Filterpapier gelegt. Es wird notiert, i) ob sich Gas entwickelt und ii) ob sich das Gas entzündet. Entzündet sich das Gas, so braucht die Substanz nicht weiter geprüft zu werden, da sie als gefährlich zu betrachten ist.

1.6.3. **Stufe 3**

1.6.3.1. *Versuchsbedingungen*

Der Versuch wird bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) durchgeführt.

1.6.3.2. *Versuchsausführung*

Mit der Prüfsubstanz wird eine kleine Schüttung von etwa 2 cm Höhe und 3 cm Durchmesser mit einer Vertiefung an der Spitze hergestellt. Man gießt einige Tropfen Wasser in die Vertiefung und notiert, i) ob sich Gas entwickelt und ii) ob sich das Gas entzündet. Entzündet sich das Gas, so braucht die Substanz nicht weiter geprüft zu werden, da sie als gefährlich zu betrachten ist.

▼B

1.6.4. **Stufe 4**

1.6.4.1. *Gerät*

Die Apparatur wird gemäß der Abbildung aufgebaut.

1.6.4.2. *Versuchsbedingungen*

Man stellt fest, ob sich in dem Behälter mit der Prüfsubstanz Pulver mit einer Korngröße von < 500 μm befindet. Macht dieses Pulver mehr als insgesamt 1 % (Massenanteil) aus oder ist die Probe zerreibbar, so ist die gesamte Probe vor dem Versuch zu einem Pulver zu mahlen, um eine Zerkleinerung der Teilchen (durch Abrieb) bei Lagerung und Handhabung zu berücksichtigen; andernfalls ist die Substanz im Anlieferungszustand zu verwenden. Der Versuch ist bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) und Atmosphärendruck auszuführen.

1.6.4.3. *Versuchsausführung*

Es werden 10 bis 20 ml Wasser in den Tropftrichter der Apparatur gegeben und 10 g Prüfsubstanz in den Erlenmeyer-Kolben. Die entwickelte Gasmenge kann mit einer beliebigen geeigneten Apparatur gemessen werden. Der Hahn des Tropftrichters wird geöffnet, um das Wasser in den Kolben zu geben; gleichzeitig wird eine Stoppuhr in Gang gesetzt. Die entwickelte Gasmenge wird über einen Zeitraum von 7 Stunden in Abständen von je einer Stunde gemessen. Ist die Gasentwicklung in dieser Zeit ungleichmäßig oder nimmt sie nach 7 Stunden noch zu, so ist der Versuchszeitraum bis zu einer Dauer von 5 Tagen zu verlängern. Die Prüfung kann abgebrochen werden, wenn die Entwicklungsrate zu irgendeinem Zeitpunkt 1 l/kg.h übersteigt. Der Versuch ist dreimal auszuführen.

Ist die chemische Zusammensetzung des Gases nicht bekannt, so muss es analysiert werden. Enthält es leichtentzündliche Komponenten und ist nicht bekannt, ob das ganze Gemisch leichtentzündlich ist, so ist ein Gemisch mit gleicher Zusammensetzung herzustellen und nach dem Verfahren A.11 zu prüfen.

2. **DATEN**

Der Stoff wird als gefährlich betrachtet, wenn es

— auf einer beliebigen Stufe des Prüfverfahrens zu einer Entzündung oder

— zu einer Entwicklung von leichtentzündlichem Gas mit einer Entwicklungsrate von mehr als 1 l/kg.h kommt.

3. **BERICHT**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen),

— Einzelheiten zu einer eventuellen Vorbehandlung der Prüfsubstanz,

▼B

— die Versuchsergebnisse (Stufen 1, 2, 3 und 4),

— die chemische Zusammensetzung des entwickelten Gases,

— die Gasentwicklungsrate, wenn Stufe 4 (1.6.4) ausgeführt wird,

— alle zusätzlichen Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung sind.

4. **LITERATUR**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

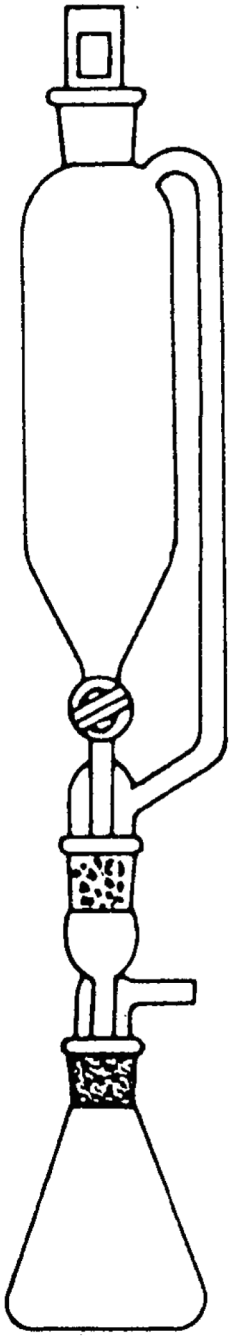
(2) NF T 20-040 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

*Anlage*

*Abbildung*

**Apparatur**



▼B

## A.13. PYROPHORE EIGENSCHAFTEN VON FESTEN UND FLÜSSIGEN STOFFEN

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Das Prüfverfahren ist anwendbar auf feste und flüssige Stoffe, die sich in kleinen Mengen nach kurzer Zeit an der Luft bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) selbst entzünden.

Dieses Verfahren gilt nicht für Stoffe, die sich bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen erst nach Stunden oder Tagen selbst entzünden.

#### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Substanzen werden als pyrophor betrachtet, wenn sie sich unter den in 1.6 beschriebenen Bedingungen selbst entzünden oder eine Verkohlung hervorrufen.

Nichtpyrophore Flüssigkeiten sind im Hinblick auf ihre Selbstentzündlichkeit nach dem Verfahren A.15 (Zündtemperatur von Flüssigkeiten und Gasen) zu prüfen.

#### 1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Nicht spezifiziert.

#### 1.4. PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz — fest oder flüssig — wird auf eine inerte Trägersubstanz gegeben und bei Raumtemperatur 5 Minuten lang mit der Luft in Berührung gebracht. Wenn sich flüssige Stoffe nicht entzünden, werden sie auf ein Filterpapier gegossen und bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) 5 Minuten lang der Luft ausgesetzt. Wenn ein fester oder flüssiger Stoff sich entzündet oder ein flüssiger Stoff ein Filterpapier entzündet oder verkohlt, dann wird die Substanz als pyrophor beurteilt.

#### 1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Wiederholbarkeit: Aus sicherheitstechnischen Gründen genügt ein einziges positives Ergebnis, um die Substanz als pyrophor zu beurteilen.

#### 1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

##### 1.6.1. **Gerät**

Eine Porzellanschale mit einem Durchmesser von etwa 10 cm wird bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) etwa 5 mm hoch mit Diatomeenerde gefüllt.

Bemerkung

Diatomeenerde oder irgendein anderer, allgemein verfügbarer ähnlicher inerter Stoff soll repräsentativ für Erde sein, mit der bei einem Unfall ausgelaufene Stoffe in Berührung kommen können.

Ein trockenes Filterpapier wird für die Prüfung von solchen Flüssigkeiten benötigt, die sich auf der inerten Trägersubstanz an der Luft nicht entzünden.

▼B

1.6.2. **Versuchsausführung**

a) *Pulverförmige feste Stoffe*

1 bis 2 $cm^3$ der zu prüfenden pulverförmigen Substanz werden aus etwa 1 m Höhe auf eine nicht brennbare Unterlage geschüttet, und es wird beobachtet, ob sich die Substanz beim Fallen oder innerhalb von 5 Minuten nach Ablagerung entzündet.

Wenn es nicht zu einer Entzündung kommt, wird der Versuch sechsmal ausgeführt.

b) *Flüssigkeiten*

Etwa 5 $cm^3$ der zu prüfenden Flüssigkeit werden in die vorbereitete Porzellanschale gegossen, und es wird beobachtet, ob sich die Prüfsubstanz innerhalb von 5 Minuten entzündet.

Wenn es bei den sechs Versuchen nicht zu einer Entzündung kommt, sind folgende Prüfungen durchzuführen:

Eine Probenmenge von 0,5 ml wird aus einer Spritze auf ein eingerissenes Filterpapier gegeben, und es wird beobachtet, ob es innerhalb von 5 Minuten nach Zugeben der Flüssigkeit zu einer Entzündung oder zur Verkohlung des Filterpapiers kommt. Wenn es nicht zu einer Entzündung oder zur Verkohlung des Filterpapiers kommt, wird der Versuch dreimal ausgeführt.

2. **DATEN**

2.1. FOLGERUNG AUS DEN ERGEBNISSEN

Die Prüfungen können abgebrochen werden, sobald einer der Versuche ein positives Ergebnis zeigt.

2.2. AUSWERTUNG

Wenn sich die Substanz innerhalb von 5 Minuten nach dem Aufbringen auf eine inerte Trägersubstanz bei Berührung mit Luft entzündet oder wenn eine Flüssigkeit innerhalb von 5 Minuten nach dem Aufbringen an der Luft das Filterpapier entzündet oder verkohlt, dann wird sie als pyrophor beurteilt.

3. **BERICHT**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen),

— die Versuchsergebnisse,

— alle zusätzlichen Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung sind.

4. **LITERATUR**

(1) NF T 20-039 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

## A.14. EXPLOSIONSGEFAHR

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Die Methode stellt ein Prüfschema dar zur Feststellung, ob feste oder pastenförmige Stoffe bei Flammenzündung (thermische Empfindlichkeit) oder bei Einwirkung von Schlag oder Reibung (mechanische Empfindlichkeit) und ob Flüssigkeiten bei Flammenzündung oder bei Einwirkung von Schlag eine Explosionsgefahr darstellen.

Die Methode besteht aus drei Teilen:

a) Prüfung der thermischen Empfindlichkeit (1),

b) Prüfung der mechanischen Empfindlichkeit bei Schlagbeanspruchung (1),

c) Prüfung der mechanischen Empfindlichkeit bei Reibbeanspruchung (1).

Die Methode liefert Ergebnisse, mit denen die Möglichkeit der Auslösung einer Explosion bei Einwirkung bestimmter, nicht außergewöhnlicher Beanspruchungen festgestellt werden kann. Sie dient nicht zur Feststellung, ob ein Stoff unter beliebigen Bedingungen explosionsfähig ist.

Die Methode eignet sich zur Feststellung, ob ein Stoff unter den besonderen, in der Richtlinie festgelegten Bedingungen eine Explosionsgefahr darstellt (thermische und mechanische Empfindlichkeit). Sie beruht auf der Verwendung mehrerer Arten von Apparaturen, die international weit verbreitet sind (1) und die im Allgemeinen aussagekräftige Ergebnisse ergeben. Dabei wird eingeräumt, dass die Methode keine endgültige Lösung darstellt. Es können andere als die genannten Apparaturen verwendet werden, wenn diese international anerkannt sind und die Ergebnisse in angemessener Form mit denen aus den genannten Apparaturen korreliert werden können.

Die Prüfungen brauchen nicht vorgenommen zu werden, wenn verfügbare thermodynamische Daten (z. B. Bildungs-, Zersetzungsenthalpie) und/oder das Fehlen bestimmter reaktiver Gruppen (2) in der Strukturformel zweifelsfrei erkennen lassen, dass sich der Stoff nicht unter Bildung von Gasen oder Freisetzung von Wärme schnell zersetzen kann (d. h. die Substanz keine Explosionsgefahr darstellt). Eine Prüfung der mechanischen Empfindlichkeit bei Reibbeanspruchung ist für Flüssigkeiten nicht erforderlich.

#### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Explosionsgefährlich:

Stoffe, die durch Flammenzündung zur Explosion gebracht werden können oder die gegen Schlag oder Reibung in den genannten Apparaturen empfindlich sind (oder die in alternativen Apparaturen eine höhere mechanische Empfindlichkeit zeigen als 1,3-Dinitrobenzol).

#### 1.3. REFERENZSUBSTANZEN

1,3-Dinitrobenzol, kristallin, gesiebt auf Korngröße 0,5 mm, technisches Produkt für die Prüfung der Schlag- und Reibempfindlichkeit.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, Hexogen, Cyclonit — CAS 121-82-4), umkristallisiert aus wässrigem Cyclohexanon, nass gesiebt durch ein Sieb 250 µm und als Rückstand auf einem Sieb 150 µm gewonnen, anschließend bei 103 ± 2 °C (über 4 Stunden) getrocknet für die zweite Reihe der Prüfung auf Schlag- und Reibempfindlichkeit.

▼B

1.4. PRINZIP DER METHODE

Um sichere Bedingungen für die Ausführung der drei Empfindlichkeitsprüfungen zu finden, ist die Durchführung von Vorversuchen erforderlich.

1.4.1. **Prüfung auf die Sicherheit des Umgangs mit der Substanz (3)**

Aus sicherheitstechnischen Gründen werden vor Durchführung der Hauptprüfungen sehr kleine Proben (etwa 10 mg) der Prüfsubstanz ohne Einschluss mit einer Gasbrennerflamme erhitzt, in einem geeigneten Gerät einem Schlag ausgesetzt und unter Verwendung eines Reibstiftes und eines Widerlagers oder in einer beliebigen Reibmaschine gerieben. Das Ziel dieser Vorversuche ist, festzustellen, ob der Stoff so empfindlich und so explosiv ist, dass zur Vermeidung von Verletzungen des Prüfenden bei der Durchführung der vorgeschriebenen Empfindlichkeitsprüfungen, insbesondere der Prüfung der thermischen Empfindlichkeit, besondere Schutzmaßnahmen vorzusehen sind.

1.4.2. **Thermische Empfindlichkeit**

Für die Prüfung wird die Prüfsubstanz in einer Stahlhülse erhitzt, die durch Düsenplatten mit Öffnungen verschiedenen Durchmessers verschlossen ist. Auf diese Weise wird bestimmt, ob der Stoff unter intensiver thermischer Beanspruchung bei definiertem Einschluss explodieren kann.

1.4.3. **Mechanische Empfindlichkeit (Schlag)**

Die Prüfung besteht darin, die Prüfsubstanz dem Schlag eines festgelegten Fallgewichtes aus einer festgelegten Höhe auszusetzen.

1.4.4. **Mechanische Empfindlichkeit (Reibung)**

Bei dieser Prüfung werden feste oder pastenförmige Substanzen der Reibung zwischen standardisierten Oberflächen unter festgelegten Bedingungen der Belastung und der relativen Bewegung ausgesetzt.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Nicht festgelegt.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1. **Thermische Empfindlichkeit (Flammenzündung)**

1.6.1.1. *Apparatur*

Die Apparatur besteht aus einer nicht wieder verwendbaren Stahlhülse mit deren wieder verwendbarer Verschraubung (Abbildung 1), die in eine Heiz- und Schutzvorrichtung eingesetzt wird. Jede Hülse wird aus Blech im Tiefziehverfahren hergestellt (siehe Anlage) und hat einen inneren Durchmesser von 24 mm, eine Länge von 75 mm und eine Wanddicke von 0,5 mm. Am offenen Ende sind die Hülsen mit einem Bund versehen, an dem sie mit der Düsenplatte verschlossen werden können. Der Verschluss besteht aus einer druckfesten Düsenplatte mit einer zentrischen Bohrung, die mit der aus Gewindering und Mutter bestehenden Verschraubung fest mit einer Hülse verbunden wird. Gewindering und Mutter bestehen aus Chrom-Mangan-Stahl (siehe Anlage), der bis 800 °C zunderfest ist. Die Düsenplatten sind 6 mm dick, bestehen aus warmfestem Stahl (siehe Anlage) und stehen mit verschiedenen Öffnungsdurchmessern zur Verfügung.

▼B

1.6.1.2. *Versuchsbedingungen*

Normalerweise wird die Substanz im Auslieferungszustand geprüft, obwohl in einigen Fällen, z. B. bei gepressten, gegossenen oder anderweitig verdichteten Stoffen, vor der Prüfung ein Zerkleinern erforderlich werden kann.

Bei Feststoffen wird die Menge des pro Prüfung zu verwendenden Materials durch ein zweistufiges Probeverfahren für die Befüllung bestimmt. Dabei wird eine gewogene Hülse mit 9 $cm^3$ Prüfsubstanz gefüllt und die Prüfsubstanz unter Anwendung einer Kraft von 80 N, bezogen auf den Gesamtquerschnitt der Hülse, angedrückt. Aus sicherheitstechnischen Gründen oder in solchen Fällen, wo der Aggregatzustand der Probe durch Druck verändert werden kann, können andere Füllverfahren angewendet werden; wenn z. B. die Substanz sehr reibempfindlich ist, empfiehlt sich das Andrücken nicht. Wenn der Stoff sich als kompressibel erweist, wird weitere Substanz hinzugefügt und angedrückt, bis die Hülse bis zu einer Höhe von 55 mm vom Rand gefüllt ist. Danach wird die Gesamtmenge bestimmt, die für die Füllung bis zum Niveau von 55 mm unter dem Rand benötigt wurde, und es werden zwei weitere gleich große Portionen zugegeben, wobei auch diese unter Anwendung einer Kraft von je 80 N angedrückt werden. Schließlich wird Substanz entweder zugefügt (unter Andrücken) oder ggf. entnommen, bis die Hülse bis zu einer Höhe von 15 mm unter dem Rand gefüllt ist. Dann wird eine zweite Probebefüllung durchgeführt, die mit einer angedrückten Menge von einem Drittel der Gesamtmenge der ersten Probebefüllung beginnt. Danach werden zwei weitere solche Portionen unter Anwendung von 80 N hinzugefügt und die Höhe der Substanz in der Hülse durch Hinzufügen oder Entnehmen bis auf 15 mm unter dem Rand gebracht. Die bei der zweiten Probebefüllung ermittelte Feststoffmenge wird für jeden der eigentlichen Versuche verwendet, wobei das Füllen mit drei gleich großen Mengen vorgenommen wird, deren jede durch Anwendung der erforderlichen Kraft auf 9 $cm^3$ komprimiert wird. (Dies kann durch Verwendung von Abstandsringen erleichtert werden.)

Flüssigkeiten und gelatinöse Substanzen werden in die Hülse bis zu einer Höhe von 60 mm eingefüllt, wobei im letzteren Fall besondere Sorge dafür zu tragen ist, dass keine Lunker gebildet werden. Der Gewindering wird von unten auf die Hülse aufgeschoben, die geeignete Düsenplatte eingesetzt und die Mutter nach Aufbringen eines Schmiermittels auf Molybdändisulfid-Basis angezogen. Es muss darauf geachtet werden, dass keine Substanz zwischen dem Bund und der Platte oder im Gewinde eingeschlossen ist.

Zum Aufheizen wird Propangas verwendet, das aus einer handelsüblichen Stahlflasche mit Druckminderer (60 bis 70 mbar) entnommen und über einen Durchflussmesser und einen Verteiler gleichmäßig vier Brennern zugeführt wird (was durch Beobachtung der Flammen der einzelnen Brenner festgestellt werden kann). Die Brenner sind entsprechend Abbildung 1 an dem Schutzkasten angeordnet. Die vier Brenner haben zusammen einen Verbrauch von etwa 3,2 l Propan pro Minute. Die Verwendung alternativer Heizgase und Brenner ist möglich, doch muss die Heizgeschwindigkeit der in Abbildung 3 genannten entsprechen. Für alle Apparaturen ist die Heizgeschwindigkeit regelmäßig unter Verwendung von Hülsen mit Dibutylphthalat-Füllung zu kontrollieren (vgl. Abbildung 3).

1.6.1.3. *Versuchsausführung*

Jeder Versuch wird fortgeführt, bis die Stahlhülse entweder zerlegt oder 5 Minuten erhitzt worden ist. Ein Versuch, der zu einer Zerlegung der Hülse in drei oder mehr Teile führt (diese können in einigen Fällen noch durch schmale Metallstreifen miteinander verbunden sein — vgl. Abbildung 2), wird als Explosion eingestuft. Ein Versuch mit weniger Teilen oder überhaupt keiner Zerlegung wird nicht als Explosion eingestuft.

▼B

Zunächst wird eine erste Reihe mit drei Versuchen unter Verwendung einer Düsenplatte mit einem Öffnungsdurchmesser von 6,0 mm durchgeführt; wenn es hier zu keiner Explosion kommt, folgt eine zweite Reihe, ebenfalls mit drei Versuchen, mit einer Düsenplatte von 2,0 mm Öffnungsdurchmesser. Tritt während einer dieser Versuchsreihen eine Explosion ein, kann auf die Durchführung weiterer Versuche verzichtet werden.

1.6.1.4. *Auswertung*

Das Versuchsergebnis wird als positiv eingestuft, wenn es in einer der genannten Versuchsreihen zu einer Explosion kommt.

1.6.2. **Mechanische Empfindlichkeit (Schlag)**

1.6.2.1. *Apparatur (Abbildung 4)*

Die wesentlichen Teile eines typischen Fallhammers sind der Block aus Gussstahl mit Fuß, der Amboss, die Säule, die Führungsschienen, die Fallgewichte, die Auslösevorrichtung und ein Probenhalter. Der Stahlamboss — 100 mm (Durchmesser) × 70 mm (Höhe) — ist oben auf einen Stahlblock — 230 mm (Länge) × 250 mm (Breite) × 200 mm (Höhe) — mit Fuß — 450 mm (Länge) × 450 mm (Breite) × 60 mm (Höhe) — aufgeschraubt. Eine Säule aus nahtlos gezogenem Stahlrohr ist in einer Halterung befestigt, die auf der Rückseite des Stahlblocks angeschraubt ist. Der Fallhammer ist mit 4 Steinschrauben auf einem massiven Betonsockel — 60 cm × 60 cm × 60 cm — so verankert, dass die Führungsschienen absolut senkrecht stehen und das Fallgewicht leicht geführt wird. Fallgewichte zu 5 kg und 10 kg aus massivem Stahl stehen zur Verfügung. Der Schlageinsatz jedes Gewichts besteht aus gehärtetem Stahl, HRC 60 bis 63, und hat einen Mindestdurchmesser von 25 mm.

Die zu untersuchende Probe ist in eine Stempelvorrichtung einzuschließen, die aus zwei koaxial übereinander stehenden Stahlstempeln und einem Hohlzylinder aus Stahl als Führungsring besteht. Die Stahlstempel, Abmessung 10 (– 0,003, - 0,005) mm Durchmesser und 10 mm Höhe, müssen polierte Flächen, abgerundete Kanten (Krümmungsradius 0,5 mm) und eine Härte HRC 58 bis 65 haben. Der Hohlzylinder muss einen äußeren Durchmesser von 16 mm, eine geschliffene Bohrung von 10 (+ 0,005, + 0,010) mm und eine Höhe von 13 mm haben. Die Stempelvorrichtung ist auf einen Zwischenamboss (26 mm Durchmesser, 26 mm Höhe) aus Stahl zu stellen und durch einen Zentrierring mit einem Lochkranz zum Abströmen der Explosionsschwaden zu zentrieren.

1.6.2.2. *Versuchsbedingungen*

Die Probe muss ein Volumen von 40 $mm^3$ oder ein der verwendeten Alternativapparatur angepasstes Volumen haben. Feststoffe sind im trockenen Zustand zu prüfen und wie folgt vorzubereiten:

a) Pulverförmige Substanzen sind zu sieben (Maschenweite 0,5 mm); der gesamte Siebdurchgang ist zur Prüfung zu verwenden.

b) Gepresste, gegossene oder anderweitig verdichtete Substanzen sind zu zerkleinern und zu sieben; zur Prüfung ist die Siebfraktion 0,5 bis 1 mm Durchmesser zu verwenden; sie muss für die Originalsubstanz repräsentativ sein.

Substanzen, die in der Regel pastenförmig geliefert werden, sollten, wenn möglich, im trockenen Zustand geprüft werden, auf jeden Fall aber nach Entfernen der größtmöglichen Menge an Verdünnungsmittel. Bei der Prüfung flüssiger Substanzen ist zwischen dem oberen und dem unteren Stahlstempel ein Abstand von 1 mm zu halten.

▼B

1.6.2.3. *Versuchsausführung*

Es werden sechs Einzelversuche unter Verwendung des Fallgewichts von 10 kg und Anwendung einer Fallhöhe von 0,40 m (40 J) ausgeführt. Wenn es während der sechs Versuche bei 40 J zu einer Explosion kommt, sind weitere sechs Einzelversuche mit einem Fallgewicht von 5 kg und einer Fallhöhe von 0,15 m (7,5 J) auszuführen. Bei Verwendung einer anderen Apparatur wird die Probe mit der gewählten Referenzsubstanz unter Benutzung einer anerkannten Auswertungsmethode (z. B. Up-and-down-Technik usw.) verglichen.

1.6.2.4. *Auswertung*

Das Prüfergebnis wird als positiv eingestuft, wenn es mit der beschriebenen Apparatur zumindest in einem der genannten Versuche zu einer Explosion (eine Entflammung und/oder ein Knall steht einer Explosion gleich) kommt oder wenn bei Verwendung einer alternativen Apparatur die Probe empfindlicher ist als 1,3-Dinitrobenzol oder Hexogen (RDX).

1.6.3. **Mechanische Empfindlichkeit (Reibung)**

1.6.3.1. *Apparatur (Abbildung 5)*

Der Reibapparat besteht aus einer Grundplatte (Gussstahl), auf der die Reibvorrichtung, bestehend aus einem feststehenden Porzellanstift und einem beweglichen Porzellanplättchen, montiert ist. Das Porzellanplättchen ist in einem Schlitten befestigt, der in zwei Gleitschienen geführt wird. Der Schlitten wird mit einem Elektromotor über eine Schubstange, eine Exzenterscheibe und ein geeignetes Getriebe so angetrieben, dass das Porzellanplättchen unter dem Porzellanstift eine einmalige Hin- und Rückbewegung von 10 mm Länge ausführt. Der Porzellanstift kann z. B. mit 120 oder 360 N belastet werden.

Die flachen Porzellanplättchen sind aus rein weißem technischem Porzellan gefertigt (Rautiefe 9 μm bis 32 μm) und haben die Abmessungen 25 mm (Länge) × 25 mm (Breite) × 5 mm (Höhe). Der zylindrische Porzellanstift ist ebenfalls aus rein weißem technischem Porzellan gefertigt. Er ist 15 mm lang, hat einen Durchmesser von 10 mm und eine raue sphärische Endfläche mit einem Krümmungsradius von 10 mm.

1.6.3.2. *Versuchsbedingungen*

Die Probe muss ein Volumen von 10 $mm^3$ oder ein der verwendeten Alternativapparatur angepasstes Volumen haben.

Feststoffe sind im trockenen Zustand zu prüfen und wie folgt vorzubereiten:

a) Pulverförmige Substanzen sind zu sieben (Maschenweite 0,5 mm); der gesamte Siebdurchgang ist zur Prüfung zu verwenden.

b) Gepresste, gegossene oder anderweitig verdichtete Substanzen sind zu zerkleinern und zu sieben; zur Prüfung ist die Siebfraktion < 0,5 mm Durchmesser zu verwenden.

Pastenförmige Substanzen sollten, wenn möglich, im trockenen Zustand geprüft werden. Falls das nicht möglich ist, muss die Paste, nach Entfernen der größtmöglichen Menge an Verdünnungsmittel, als 0,5 mm dicker, 2 mm breiter und 10 mm langer Film, der mit einem speziellen Formteil hergestellt wird, geprüft werden.

▼B

1.6.3.3. *Versuchsausführung*

Der Porzellanstift wird auf die zu untersuchende Probe gesetzt und belastet. Bei Durchführung des Versuchs muss der Schwammstrich des Porzellanplättchens quer zu dessen Bewegungsrichtung liegen. Es ist darauf zu achten, dass der Stift auf der Probe steht und dass so viel Prüfsubstanz vor dem Stift liegt, dass bei der Plättchenbewegung genügend Prüfsubstanz unter den Stift gelangt. Pastenförmige Substanzen werden mittels einer Lehre (Dicke: 0,5 mm) mit einer Öffnung von 2 mm × 10 mm auf das Plättchen aufgetragen. Das Porzellanplättchen wird unter dem Porzellanstift in einer Zeit von 0,44 s je 10 mm hin- und herbewegt. Jeder Oberflächenbezirk des Plättchens und des Stiftes darf nur einmal verwendet werden; die beiden Enden eines jeden Stiftes können für zwei Versuche und die beiden Oberflächen eines jeden Plättchens können für je drei Versuche benutzt werden.

Es werden sechs Einzelversuche unter Verwendung einer Belastung von 360 N ausgeführt. Wenn es während der sechs Versuche zu einer positiven Reaktion kommt, sind weitere sechs Einzelversuche mit einer Belastung von 120 N auszuführen. Bei Verwendung einer anderen Apparatur wird die Probe mit der gewählten Referenzsubstanz unter Benutzung einer anerkannten Auswertungsmethode (z. B. Up-and-down-Technik usw.) verglichen.

1.6.3.4. *Auswertung*

Das Prüfergebnis wird als positiv eingestuft, wenn es mit dem beschriebenen Reibapparat zumindest in einem der genannten Versuche zu einer Explosion (ein Knistern und/oder ein Knall oder eine Entflammung stehen einer Explosion gleich) kommt oder wenn bei Verwendung einer alternativen Reibprüfung die äquivalenten Kriterien erfüllt werden.

2. **DATEN**

Grundsätzlich gilt ein Stoff als im Sinne dieser Richtlinie explosionsgefährlich, wenn bei der Prüfung auf thermische, Schlag- oder Reibempfindlichkeit ein positives Ergebnis erzielt wird.

3. **BERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— die Bezeichnung, die Zusammensetzung, die Reinheit, der Feuchtigkeitsgehalt usw. der Prüfsubstanz,

— der Aggregatzustand der Probe und die Angabe, ob die Probe zerkleinert und/oder gesiebt worden ist,

— die Beobachtungen während der Prüfungen auf thermische Empfindlichkeit (z. B. Probenmasse, Anzahl der Splitter usw.),

— die Beobachtungen während der Prüfungen auf mechanische Empfindlichkeit (z. B. größere Rauchentwicklung oder vollständige Zersetzung ohne einen Knall, Flammen, Funken, Knistern usw.),

— die Ergebnisse jedes Einzelversuchs,

— bei Anwendung einer Alternativapparatur: die wissenschaftliche Begründung sowie die Beweisführung für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen der beschriebenen und der Alternativapparatur,

▼B

— alle nützlichen Hinweise auf Versuche mit ähnlichen Substanzen, die für die richtige Interpretation der erhaltenen Versuchsergebnisse von Bedeutung sein können,

— alle zusätzlichen Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse von Bedeutung sind.

3.2. INTERPRETATION UND BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

Im Prüfbericht sind alle Ergebnisse anzugeben, die als falsch, anormal oder nicht repräsentativ angesehen werden. Wird ein Versuchsergebnis nicht in die Bewertung einbezogen, so ist dies zu begründen, und es sind die Ergebnisse anderer oder zusätzlicher Versuche aufzuführen. Kann die Abnormität eines Ergebnisses nicht erklärt werden, muss das Ergebnis als solches akzeptiert und der Stoff entsprechend eingestuft werden.

4. **LITERATUR**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reaaive Chemical Hazards, 4. Auflage, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. und Swatt, K.H., Explosivstoffe, 1961, Bd. 3, 6-13 und 30-42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

▼B

*Anlage*

**Beispiel für Werkstoffspezifikation zur Prüfung auf thermische Empfindlichkeit (vgl. DIN 1623)**

(1) Hülse: Werkstoffspezifikation Nr. 1.0336.505 g

(2) Düsenplatte: Werkstoffspezifikation Nr. 1.4873

(3) Gewindering und Mutter: Werkstoffspezifikation Nr. 1.3817

*Abbildung 1*

**Apparatur für die Prüfung auf thermische Empfindlichkeit**

(alle Abmessungen in mm)

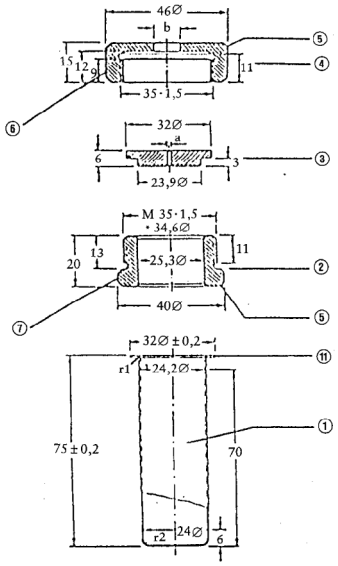



Abbildung 1a Stahlhülse und Verschraubung

(1) Hülse
(1a) äußerer Flansch
(2) Gewindering; reibungsarmes Gewinde
(3) Düsenplatte a = 2,0 oder 6,0 mm Durchm.
(4) Mutter b = 10 mm Durchmesser
(5) abgefaste Fläche
(6) 2 Flächen für Schlüsselweite 41

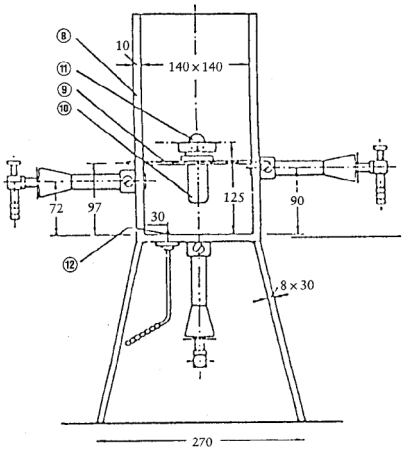



Abbildung 1b Heiz- und Schutzvorrichtung

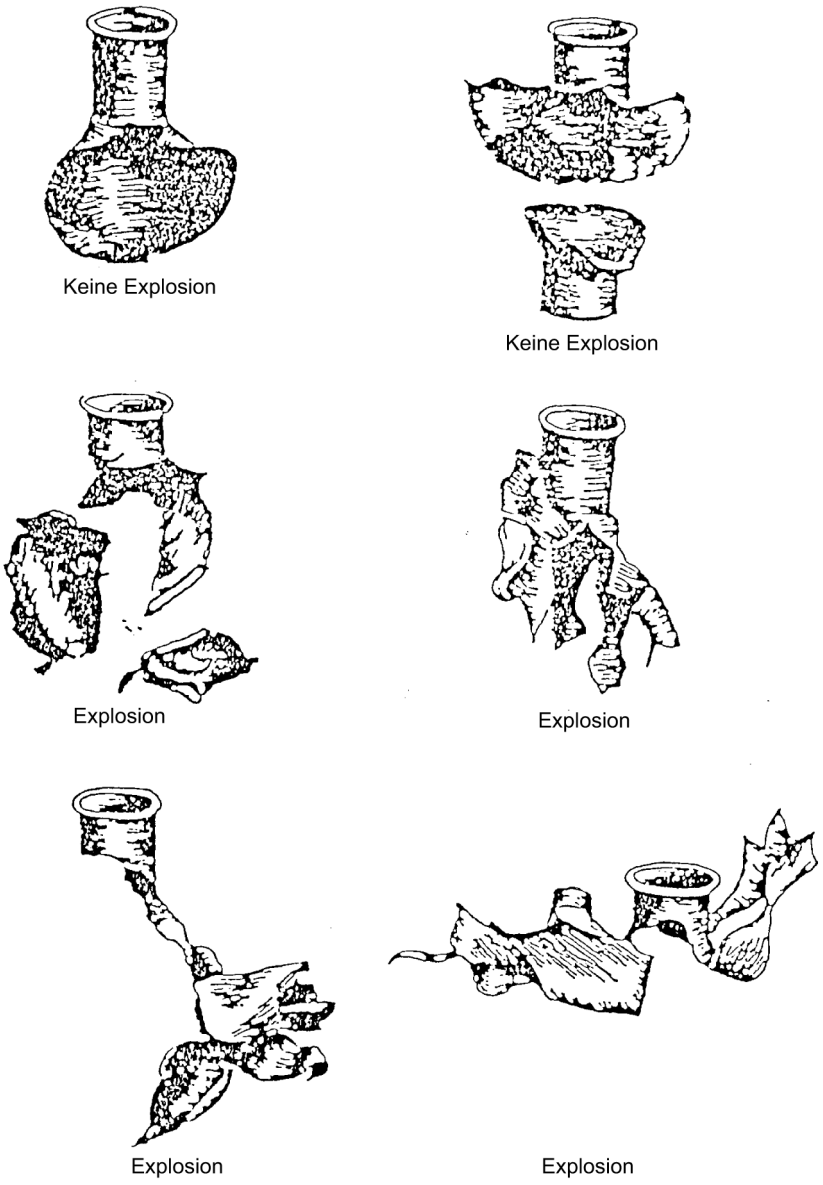
(7) 2 Flächen für Schlüsselweite 36
(8) splitterfester Kasten
(9) 2 Haltestangen für Hülse
(10) Hülse, montiert
(11) Lage des hinteren Brenners; andere Brenner sichtbar
(12) Lockflamme

▼B

*Abbildung 2*

**Prüfung auf thermische Empfindlichkeit**

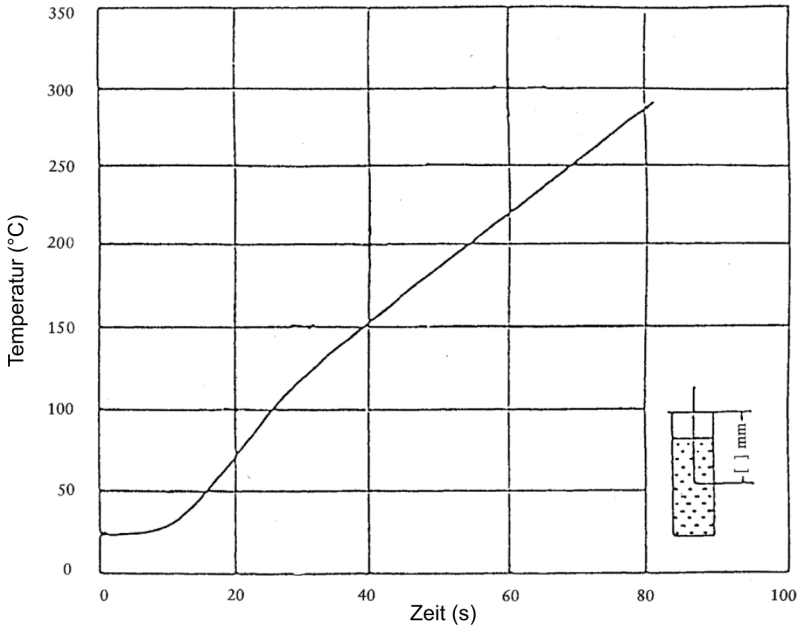
Beispiele für Splitterbilder



▼B

*Abbildung 3*

**Kalibrierung der Heizgeschwindigkeit für die Prüfung auf thermische Empfindlichkeit**




Temperatur-/Zeitkurve bei Erwärmung von Dibutylphthalat (27 $cm^3$) in einer (mit einer Düsenplatte mit Öffnungsdurchmesser 1,5 mm) verschlossenen Hülse bei einem Propanverbrauch von 3,2 l/min. Die Temperatur wird mit einem Chromel-/Alumel-Thermoelement (Durchmesser: 1 mm) in einer Hülse aus rostfreiem Stahl gemessen, das zentral 43 mm unter dem Hülsenrand angebracht ist. Die Heizgeschwindigkeit muss im Bereich von 135 °C bis 285 °C zwischen 185 K/min und 215 K/min liegen.

▼B

*Abbildung 4*

**Apparatur zur Prüfung auf Schlagempfindlichkeit**

**(alle Abmessungen in mm)**

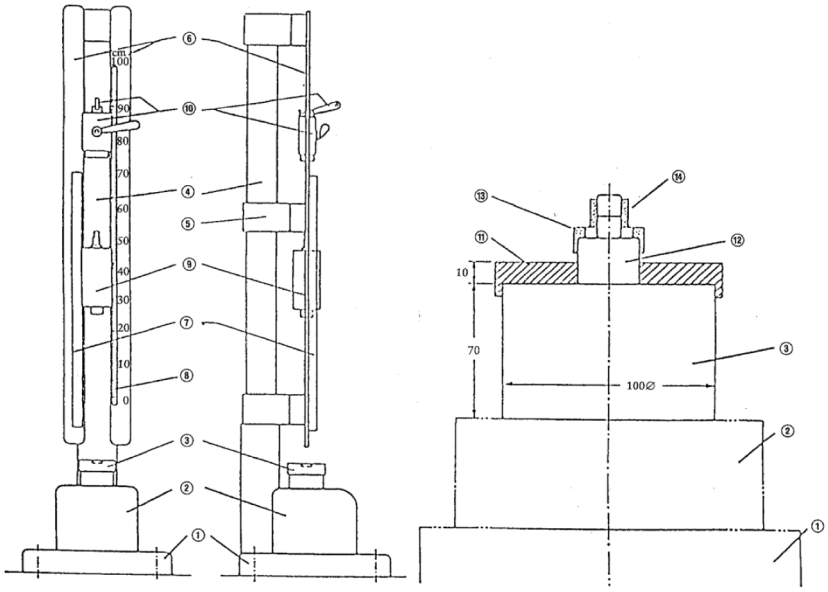



Abbildung 4a Fallhammer, Vorder- und Seitenansicht; Gesamtansicht

(1) Fuß, 450 × 450 × 60
(2) Stahlblock, 230 × 250 × 200
(3) Amboss, 100 Durchmesser × 70 Höhe
(4) Säule
(5) mittlerer Querträger
(6) 2 Führungsschienen
(7) Zahnstange

Abbildung 4b Fallhammer, unterer Teil

(8) Messskala
(9) Fallhammer (Fallgewicht)
(10) Halte- und Auslösevorrichtung
(11) Befestigungsplatte
(12) Zwischenamboss (austauschbar), 26 Durchmesser × 26 Höhe
(13) Zentrierring mit Öffnungen
(14) Stempelvorrichtung

▼B

*Abbildung 4*

**Fortsetzung**

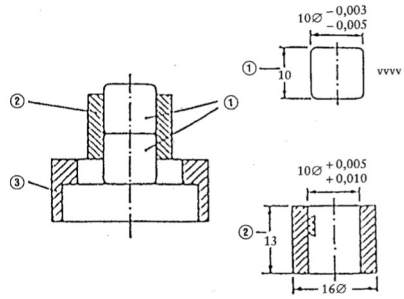
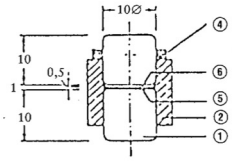



Abbildung 4c Stempelvorrichtung für pulver-oder pastenförmige Substanzen

Abbildung 4d Stempelvorrichtung für Flüssigkeiten

(1) Stahlstempel
(2) Führungsring für Stahlstempel
(3) Zentrierring mit Öffnungen
(a) Aufriss
(b) Grundriss
(4) Gummiring
(5) Flüssigkeit (40 $mm^3$)
(6) Flüssigkeitsfreier Raum



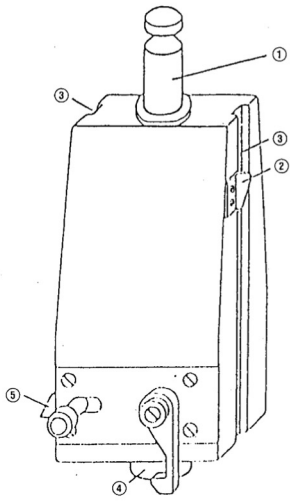



Abbildung 4e Hammer (Fallgewicht 5 kg)

(1) Zapfen
(2) Höhenmarkierung
(3) Führungsnut
(4) Zylindrischer Schlageinsatz
(5) Rückprallsperre

▼B

*Abbildung 5*

**Apparatur zur Prüfung auf Reibempfindlichkeit**

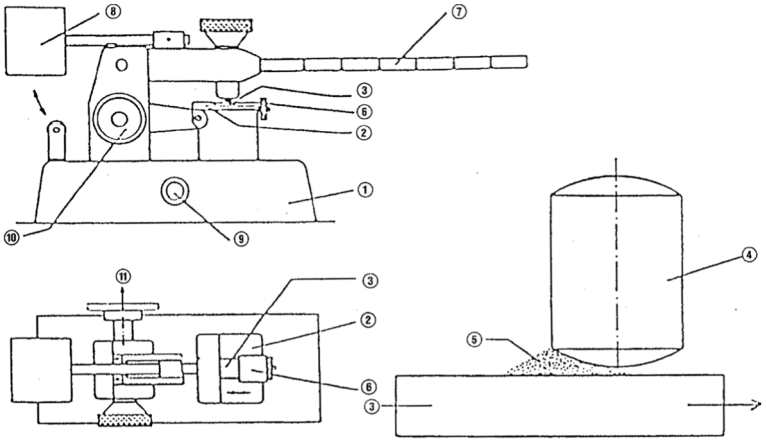



Abb. 5a Reibapparat; Aufriss und Grundriss

Abb. 5b Ausgangsstellung des Stiftes auf der Probe

(1) Stahlfuß
(2) Schlitten
(3) Porzellanplättchen, 25 mm x 25 mm x 5 mm, auf dem Schlitten befestigt
(4) fester Porzellanstift, 10 Durchm. x 15 mm
(5) Prüfsubstanz, etwa 10 $mm^3$
(6) Stifthalter
(7) Belastungsarm
(8) Gegengewicht
(9) Schalter
(10) Rad zum Fahren des Schlittens in Ausgangsstellung
(11) zum Elektromotor

▼B

## A.15. ZÜNDTEMPERATUR (FLÜSSIGKEITEN UND GASE)

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Diese Prüfmethode gilt nicht für explosive Stoffe und solche, die sich bei Raumtemperatur spontan entzünden. Das Prüfverfahren ist auf Gase, Flüssigkeiten und Dämpfe anwendbar, die sich in Gegenwart von Luft an einer heißen Oberfläche entzünden können.

Die Zündtemperatur kann durch katalytisch wirkende Verunreinigungen, durch das Oberflächenmaterial oder durch ein größeres Volumen des Prüfgefäßes erheblich herabgesetzt werden.

#### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Die Zündtemperatur stellt ein Maß für die Selbstentzündlichkeit dar. Die Zündtemperatur ist die niedrigste Temperatur, bei der sich die Prüfsubstanz im Gemisch mit Luft unter den im Prüfverfahren definierten Bedingungen entzündet.

#### 1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Referenzsubstanzen sind in den Normen angegeben (siehe 1.6.3). Sie sollten in erster Linie dazu dienen, die Methode von Zeit zu Zeit zu überprüfen und einen Vergleich mit den Ergebnissen aus anderen Methoden zu ermöglichen.

#### 1.4. PRINZIP DER METHODE

Die Methode dient der Bestimmung der Mindesttemperatur von Behälterinnenflächen, durch die in diesem Behältnis befindliche Gase, Dämpfe oder Flüssigkeiten entzündet werden können.

#### 1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Die Wiederholbarkeit hängt ab vom Zündtemperaturbereich und der angewandten Prüfmethode.

Die Empfindlichkeit und Spezifität hängen von der angewandten Prüfmethode ab.

#### 1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

##### 1.6.1. **Geräte**

Die Prüfgeräte sind in den unter 1.6.3 genannten Methoden beschrieben.

##### 1.6.2. **Versuchsbedingungen**

Die zu prüfende Substanz wird entsprechend den unter 1.6.3 genannten Methoden geprüft.

##### 1.6.3. **Versuchsausführung**

Siehe IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF F 20-037.

▼B

2. **DATEN**

Registrieren von Versuchstemperatur, Luftdruck, Menge der eingesetzten Probe und Zündverzögerungszeit.

3. **BERICHT**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— genaue Angaben über die Prüfsubstanz (Identität und Verunreinigungen),

— die Probenmenge, der Luftdruck,

— die verwendete Apparatur,

— die Messergebnisse (Prüftemperaturen, Ergebnisse hinsichtlich Zündung, entsprechender Zeitverzug),

— alle zusätzlichen Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse wichtig sind.

4. **LITERATUR**

Keine.

▼B

## A.16. RELATIVE SELBSTENTZÜNDUNGSTEMPERATUR FÜR FESTSTOFFE

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Diese Prüfmethode gilt nicht für explosive Stoffe und solche, die sich bei Raumtemperatur an der Luft selbst entzünden.

Zweck dieser Prüfung ist der Erhalt von vorläufigen Informationen über die Selbstentzündlichkeit von festen Stoffen bei erhöhter Temperatur.

Wird die bei der Reaktion des Stoffes mit Sauerstoff oder bei der exothermen Zersetzung des Stoffes entstehende Wärme nicht schnell genug an die Umgebung abgegeben, so kommt es zur Selbsterhitzung mit nachfolgender Selbstentzündung. Selbstentzündung tritt somit ein, wenn die Wärmeentwicklung größer ist als die Wärmeableitung.

Die Prüfmethode wird als Vorversuch für feste Substanzen angewendet. Wegen der komplexen Natur der Entzündung und Verbrennung von festen Stoffen ist die mit dieser Methode bestimmte Selbstentzündungstemperatur nur für Vergleichszwecke zu benutzen.

#### 1.2. DEFINITION UND EINHEITEN

Die mit dieser Methode bestimmte Selbstentzündungstemperatur ist die minimale Umgebungstemperatur in °C, bei der sich unter definierten Bedingungen eine bestimmte Menge einer Substanz entzündet.

#### 1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Keine.

#### 1.4. PRINZIP DER METHODE

Eine bestimmte Menge der Prüfsubstanz wird bei Raumtemperatur in einen Ofen eingebracht. Während die Temperatur des Ofens mit einer Rate von 0,5 K/min auf 400 °C oder bis zum Schmelzpunkt (wenn dieser niedriger liegt) erhöht wird, wird die Temperatur im Inneren der Probe gemessen und als Temperatur/Zeit-Kurve registriert. Bei diesem Verfahren wird diejenige Ofentemperatur, bei der die Probentemperatur durch Selbsterhitzung 400 °C erreicht, als Selbstentzündungstemperatur bezeichnet.

#### 1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

#### 1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

##### 1.6.1. **Gerät**

###### 1.6.1.1. *Ofen*

Ein Laboratoriumsofen (Volumen etwa 2 l) mit Temperaturprogrammierung, natürlicher Luftzirkulation und Explosionsdruckentlastung. Um Explosionsgefahr zu vermeiden, dürfen Schwelgase auf keinen Fall mit den elektrischen Heizdrähten in Berührung kommen.

▼B

1.6.1.2. *Drahtnetz-Kubus*

Ein Stück Drahtnetz aus rostfreiem Stahl mit einer Maschenweite von 0,045 mm wird entsprechend der Darstellung in Abbildung 1 zugeschnitten. Dieses Drahtnetz wird zu einem oben offenen Kubus gefaltet; die Kanten des Kubus werden fest mit Draht verbunden.

1.6.1.3. *Thermoelemente*

Geeignete Thermoelemente.

1.6.1.4. *Registriergerät*

Jedes Registriergerät mit zwei Messkanälen, das für Temperaturen von 0 bis 600 °C oder den entsprechenden Thermospannungs-Bereich kalibriert ist.

1.6.2. **Versuchsbedingungen**

Die Stoffe werden in ihrem Anlieferungszustand geprüft.

1.6.3. **Versuchsausführung**

Der Kubus wird mit der Prüfsubstanz gefüllt und der Inhalt durch leichtes Aufstoßen verdichtet; es wird weitere Prüfsubstanz dazugegeben, bis der Kubus vollständig gefüllt ist. Der Kubus wird dann bei Raumtemperatur in die Mitte des Ofens eingesetzt. Ein Thermoelement wird in die Mitte des Kubus und das andere zur Registrierung der Ofentemperatur zwischen dem Kubus und der Ofenwand angebracht.

Während die Temperatur des Ofens mit einer Rate von 0,5 K/mm auf 400 °C oder bis zum Schmelzpunkt (wenn dieser niedriger liegt) gesteigert wird, wird die Temperatur des Ofens und der Probe kontinuierlich aufgezeichnet.

Wenn sich die Prüfsubstanz entzündet, zeigt das Thermoelement der Probe einen starken Temperaturanstieg über die Ofentemperatur hinaus.

2. **DATEN**

Diejenige Temperatur des Ofens, bei der die Probentemperatur durch Selbsterhitzung 400 °C erreicht, ist für die Beurteilung maßgebend (siehe Abbildung 2).

3. **BERICHT**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— eine Beschreibung der Prüfsubstanz,

— die Messergebnisse einschließlich der Temperatur/Zeit-Kurve,

— alle zusätzlichen Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse wichtig sind.

4. **LITERATUR**

(1) NF T 20-036 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

*Abbildung 1*

**Muster des Testkubus (Kantenlänge 20 mm)**

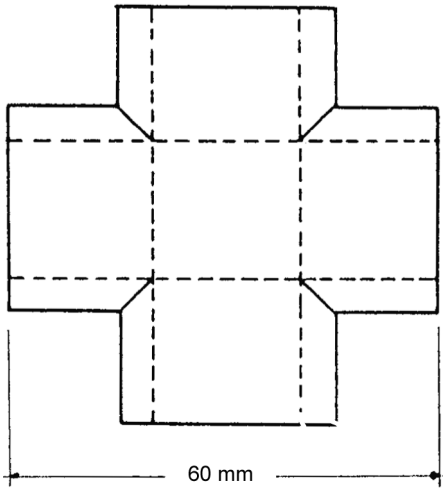
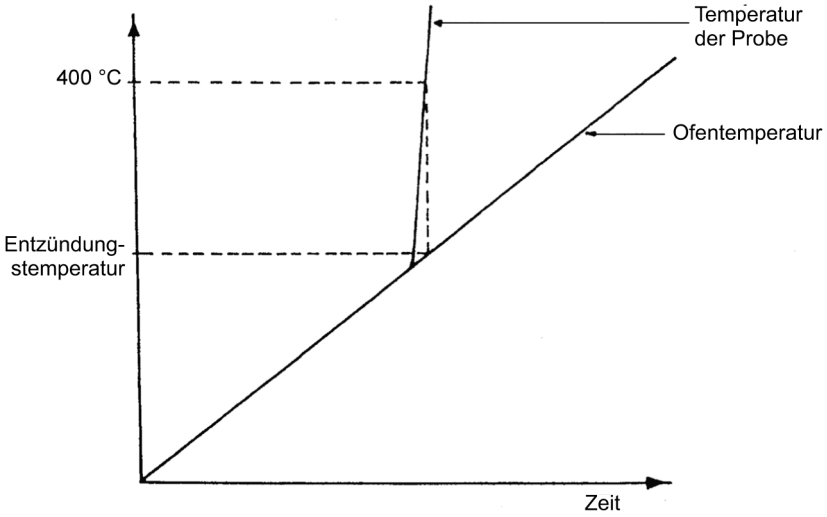



*Abbildung 2*

**Typische Temperatur/Zeit-Kurve**



▼B

A.17. **BRANDFÖRDERNDE EIGENSCHAFTEN (FESTSTOFFE)**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Es ist zweckdienlich, vor Ausführung dieses Versuchs Informationen über mögliche explosive Eigenschaften der Substanz zu haben.

Dieses Verfahren kann nicht auf Flüssigkeiten, Gase, explosive oder leichtentzündliche Substanzen oder organische Peroxide angewendet werden.

Die Prüfung braucht nicht ausgeführt zu werden, wenn die Prüfung der Strukturformel zweifelsfrei ergibt, dass die Substanz mit brennbarem Material nicht exotherm reagieren kann.

Zur Ermittlung der Sicherheitsvorkehrungen für die Versuchsausführung ist es notwendig, einen Vorversuch durchzuführen.

1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Abbrandzeit: diejenige Zeit in Sekunden, in der sich die Reaktionszone über die Schüttung ausbreitet, gemäß dem unter 1.6 beschriebenen Verfahren.

Abbrandgeschwindigkeit: anzugeben in mm/s.

Höchste Abbrandgeschwindigkeit: die höchsten Werte der Abbrandgeschwindigkeiten von Gemischen mit Massenanteilen an Oxidationsmitteln von 10 bis 90 %.

1.3. REFERENZSUBSTANZ

Als Referenzsubstanz für die Prüfung und den Vorversuch wird Bariumnitrat (analysenrein) verwendet.

Referenzgemisch ist dasjenige Gemisch aus Bariumnitrat und Cellulosepulver, das gemäß 1.6 hergestellt wurde und die höchste Abbrandgeschwindigkeit hat (üblicherweise ein Gemisch mit einem Massenanteil an Bariumnitrat von 60 %).

1.4. PRINZIP DER METHODE

Der Vorversuch wird aus Gründen der Sicherheit ausgeführt. Wenn der Vorversuch eindeutig ergibt, dass die Substanz brandfördernde Eigenschaften hat, sind keine weiteren Prüfungen erforderlich. Liegt ein solches eindeutiges Ergebnis nicht vor, so ist mit der Substanz der Hauptversuch auszuführen.

Für den Hauptversuch werden die Prüfsubstanz und eine definierte brennbare Substanz in verschiedenen Gewichtsverhältnissen gemischt. Jedes Gemisch wird dann zu Schüttungen geformt und diese Schüttungen werden an einem Ende gezündet. Die höchste ermittelte Abbrandgeschwindigkeit wird mit der höchsten Abbrandgeschwindigkeit des Referenzgemisches verglichen.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Es ist jede Methode der Zerkleinerung und Mischung geeignet, die dazu führt, dass bei den sechs getrennten Versuchen die maximale Abbrandgeschwindigkeit vom arithmetischen Mittelwert um nicht mehr als 10 % abweicht.

▼B

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1. **Vorbereitung**

1.6.1.1. *Prüfsubstanz*

Die Prüfsubstanz wird nach dem folgenden Verfahren auf eine Korngröße von < 0,125 mm gebracht: Substanz sieben, verbleibende Kornfraktion zerkleinern, das Verfahren so lange wiederholen, bis die gesamte Probe das Sieb passiert hat.

Es kann jedes Zerkleinerungs- und Siebverfahren eingesetzt werden, das den Qualitätskriterien genügt.

Vor der Herstellung des Gemisches wird die Substanz bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Wenn die Zersetzungstemperatur der Substanz unterhalb 105 °C liegt, ist die Substanz bei entsprechend niedrigerer Temperatur zu trocknen.

1.6.1.2. *Brennbare Substanz*

Cellulosepulver wird als brennbare Substanz verwendet. Es sollte dies ein Cellulosepulver sein, das für die Dünnschicht- oder Säulenchromatografie verwendet wird. Als geeignet hat sich eine Sorte mit einer Faserlänge von mehr als 85 % zwischen 0,020 und 0,075 mm erwiesen. Das Cellulosepulver wird unter Verwendung eines Siebes mit einer Maschenweite von 0,125 mm gesiebt. Für die gesamte Prüfung ist dieselbe Cellulosepartie zu verwenden.

Vor der Herstellung der Mischung wird das Cellulosepulver bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Wenn im Vorversuch Sägemehl verwendet wird, ist derjenige Anteil von Weichholzsägemehl zu verwenden, der ein Sieb mit einer Maschenweite von 1,6 mm passiert. Dieses Sägemehl wird sorgfältig gemischt und in einer Schichtdicke von maximal 25 mm bei 105 °C 4 Stunden lang getrocknet. Abkühlen lassen und bis zur Verwendung (möglichst innerhalb von 24 Stunden nach dem Trocknen) in einem luftdichten Behälter aufbewahren, der so voll wie möglich gefüllt sein soll.

1.6.1.3. *Zündquelle*

Als Zündquelle wird die Flamme eines Gasbrenners (Mindestdurchmesser 5 mm) benutzt. Bei Verwendung einer anderen Zündquelle (z. B. bei Prüfungen in einer inerten Atmosphäre) ist eine entsprechende Beschreibung mit Begründung dem Bericht beizufügen.

1.6.2. **Versuchsausführung**

*Bemerkung*

Gemische aus Oxidationsmitteln und Cellulose oder Sägemehl müssen als potenziell explosionsgefährlich angesehen und mit großer Sorgfalt behandelt werden.

1.6.2.1. *Vorversuch*

Die getrocknete Substanz wird mit der getrockneten Cellulose oder mit getrocknetem Sägemehl (Gewichtsverhältnis: 2 Teile Prüfsubstanz, 1 Teil Cellulose oder Sägemehl) gründlich gemischt. Das Gemisch wird zu einer kegelförmigen Schüttung mit 3,5 cm Durchmesser (Durchmesser der Grundfläche) und 2,5 cm Höhe geformt, indem es ohne besonderes Andrücken in eine kegelförmige Form eingefüllt wird (z. B. in einen Laboratoriums-Glastrichter mit verstopftem Abflussrohr).

▼B

Die Schüttung wird auf einer kalten, nicht brennbaren, nichtporösen Grundplatte mit geringer Wärmeleitfähigkeit angeordnet. Der Versuch ist gemäß 1.6.2.2 in einem Abzug auszuführen.

Der Kegel wird mit einer Zündquelle entzündet. Heftigkeit und Dauer der eintretenden Reaktion werden beobachtet und notiert.

Die Substanz wird als brandfördernd beurteilt, wenn die Reaktion heftig ist.

In allen Fällen, in denen Zweifel am Ergebnis möglich sind, ist das nachstehend beschriebene vollständige Prüfverfahren anzuwenden.

1.6.2.2. *Hauptversuch*

Es werden Gemische aus Oxidationsmittel und Cellulose hergestellt, mit Massenanteilen an Oxidationsmitteln von 10 % bis 90 %, in 10 %-Intervallen. Für Grenzfälle sollten Gemische von Oxidationsmitteln und Cellulose mit dazwischen liegender Zusammensetzung hergestellt werden, um bei der Bestimmung der höchsten Abbrandgeschwindigkeit genauere Werte zu erhalten.

Die Schüttung wird mittels einer Form hergestellt. Die Form besteht aus Metall, hat eine Länge von 250 mm und einen dreieckigen Querschnitt mit einer inneren Höhe von 10 mm und einer inneren Breite von 20 mm. Die Form wird an beiden Längsseiten von zwei Metallblechen begrenzt, die den dreieckigen Querschnitt um 2 mm überragen (siehe Abbildung). Diese Anordnung wird mit einem geringen Überschuss lose gefüllt. Nach dem Fallenlassen der Form aus 2 cm Höhe auf eine feste Unterlage wird die überstehende Substanz mit einem flachen Blech abgestrichen. Dann werden die seitlichen Begrenzungen entfernt und die verbleibende Schicht wird mit einer Rolle geglättet. Nun wird eine nichtbrennbare und nichtporöse Platte mit geringer Wärmeleitfähigkeit auf die Form gelegt, das Ganze um 180° gedreht und die Form entfernt.

Die Schüttung wird quer zur Zugrichtung in einem Abzug angeordnet.

Die Absauggeschwindigkeit muss so hoch sein, dass Rauch nicht in das Labor dringen kann; sie soll auch während des Versuchs nicht verändert werden. Um die Versuchsanordnung herum ist ein Windschutz aufzustellen.

Wegen der Hygroskopizität der Cellulose und mancher Prüfsubstanzen soll die Prüfung so schnell wie möglich ausgeführt werden.

Die Schüttung wird an einem Ende mit der Gasflamme gezündet.

Es wird die Abbrandzeit über eine Strecke von 200 mm gemessen, nachdem die Reaktionszone eine Strecke von 30 mm vom Start zurückgelegt hat.

Die Prüfung wird mit der Referenzsubstanz und mindestens einmal mit jedem der abgestuften Gemische Prüfsubstanz/Cellulose ausgeführt.

Wenn festgestellt wird, dass die Abbrandgeschwindigkeit signifikant größer ist als die des Referenzgemisches, kann die Prüfung beendet werden. Andernfalls muss mit den drei Gemischen, die die höchsten Abbrandgeschwindigkeiten ergeben haben, der Abbrandversuch jeweils fünfmal wiederholt werden.

▼B

Wenn der Verdacht auf ein falsches positives Ergebnis besteht, muss die Prüfung wiederholt werden und zwar anstelle von Cellulose mit einer inerten Substanz ähnlicher Korngröße, z. B. Kieselgur. Alternativ ist das Gemisch Prüfsubstanz/Cellulose mit der höchsten Abbrandgeschwindigkeit in einer inerten Atmosphäre zu prüfen (< 2 % Volumenanteile Sauerstoff).

2. **DATEN**

Aus sicherheitstechnischen Gründen ist die höchste Abbrandgeschwindigkeit — nicht der Mittelwert — als charakteristisches Merkmal für das brandfördernde Verhalten der Prüfsubstanz anzusehen.

Der höchste Wert der Abbrandgeschwindigkeit in einer Serie von sechs Versuchen mit einer bestimmten Mischung ist maßgebend für die Ausweitung.

Die höchsten Werte der Abbrandgeschwindigkeit für jede Mischung werden gegen den Gehalt an Prüfsubstanz aufgetragen. Aus dieser Kurve wird dann die höchste Abbrandgeschwindigkeit ermittelt.

Die sechs in einer Serie gemessenen Werte für die Abbrandgeschwindigkeit desjenigen Gemisches, das die höchste Abbrandgeschwindigkeit aufweist, dürfen nicht mehr als 10 % vom arithmetischen Mittelwert abweichen. Andernfalls müssen die Methoden der Zerkleinerung und Mischung überprüft werden.

Die höchste gemessene Abbrandgeschwindigkeit wird mit der höchsten Abbrandgeschwindigkeit des Referenzgemisches verglichen (siehe 1.3).

Bei Prüfungen in inerter Atmosphäre wird die höchste Reaktionsgeschwindigkeit mit derjenigen des Referenzgemisches in einer inerten Atmosphäre verglichen.

3. **BERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— Identität, Zusammensetzung, Reinheit, Feuchtegehalt usw. der Prüfsubstanz,

— sämtliche Vorbehandlungen der Prüfsubstanz (z. B. Mahlung, Trocknung usw.),

— die bei den Prüfungen verwendete Zündquelle,

— die Ergebnisse der Messungen,

— die Art der Reaktion (z. B. schnelle Brandausbreitung an der Oberfläche, Brennen durch das gesamte Volumen, sämtliche Angaben über Verbrennungsprodukte usw.),

— die Ergebnisse der Prüfungen mit einem inerten Stoff (wenn ausgeführt),

— alle zusätzlichen Bemerkungen, die für die Interpretation der Ergebnisse wichtig sind, einschließlich einer Beschreibung der Heftigkeit (Aufflammen, Funkenwurf, Rauchentwicklung, langsames Schwelen usw.) und der ungefähren Dauer der Reaktion beim Vorversuch mit Prüf- und Bezugssubstanz,

— die Ergebnisse der Prüfungen mit einem inerten Stoff (wenn ausgeführt),

— die Ergebnisse der Prüfungen in inerter Atmosphäre (wenn ausgeführt).

▼B

3.2. INTERPRETATION DES ERGEBNISSES

Eine Substanz wird als brandfördernd beurteilt, wenn

a) sie im Vorversuch eine heftige Reaktion zeigt;

b) beim vollständigen Prüfverfahren die höchste Abbrandgeschwindigkeit der Prüfgemische größer oder gleich der höchsten Abbrandgeschwindigkeit des Referenzgemisches aus Cellulose und Bariumnitrat ist.

Um ein falsches positives Ergebnis zu vermeiden, sind bei der Interpretation der Ergebnisse auch die Prüfergebnisse für das Gemisch aus Prüfsubstanz und einem inerten Stoff und/oder von Prüfungen in einer inerten Atmosphäre zu berücksichtigen.

4. **LITERATUR**

(1) NF T 20-035 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

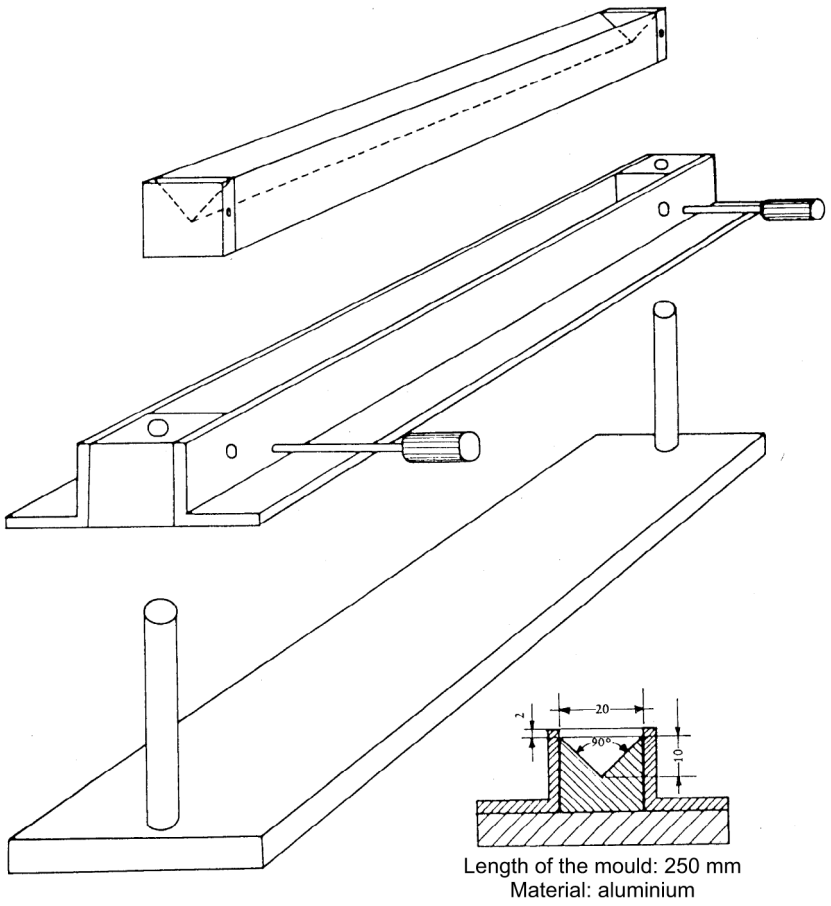
▼B

*Anlage*

*Abbildung*

**Form und Zubehör zur Herstellung der Schüttung**

(alle Maßangaben in mm)



▼B

## A.18. ZAHLENGEMITTELTE MOLMASSE UND MOLMASSENVERTEILUNG VON POLYMEREN

### 1. METHODE

Diese gelpermeationschromatografische Methode entspricht der OECD TG 118 (1996). Die wichtigsten Grundsätze und weitere technische Informationen werden in den Literaturhinweisen (1) genannt.

### 1.1. EINLEITUNG

Da die Eigenschaften von Polymeren so unterschiedlich sind, ist es unmöglich, nur eine einzige Methode zu nennen, die alle Bedingungen für die Trennung und Auswertung erfüllt und somit sämtliche Eventualitäten und Besonderheiten bei der Trennung von Polymeren berücksichtigt. Insbesondere für komplexe polymere Systeme ist die Gelpermeationschromatografie (GPC) häufig nicht geeignet. Wenn die GPC nicht anwendbar ist, kann die Molmasse mit Hilfe anderer Methoden bestimmt werden (siehe Anlage). In solchen Fällen muss die verwendete Methode in allen Einzelheiten beschrieben und die Gründe für deren Verwendung genannt werden.

Die beschriebene Methode beruht auf DIN-Norm 55672 (1). Diese Norm enthält ausführliche Informationen darüber, wie die Versuche durchgeführt und wie die Daten ausgewertet werden müssen. Wenn Änderungen der Versuchsbedingungen notwendig sein sollten, müssen diese Änderungen begründet werden. Es können andere Normen herangezogen werden, diese müssen jedoch belegt werden. Im beschriebenen Verfahren werden Polystyrolproben bekannter Polydispersität zur Kalibrierung verwendet; es kann jedoch vorkommen, dass das Verfahren für bestimmte Polymere, z. B. wasserlösliche und langkettige, verzweigte Polymere, angepasst werden muss.

### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Die zahlengemittelte Molmasse $M_n$ und die gewichtsgemittelte Molmasse werden anhand folgender Gleichungen bestimmt:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

Dabei ist:

$H_i$ = die Höhe des Detektorsignals von der Grundlinie für das Retentionsvolumen $V_i$

$M_i$ = die Molmasse der Polymerfraktion bei dem Retentionsvolumen $V_i$

n = die Zahl der Datenpunkte

Die Breite der Molmassenverteilung, die ein Maß für die Dispersität des Systems ist, wird durch das Verhältnis $M_w/M_n$ ausgedrückt.

▼B

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Da es sich bei der GPC um eine relative Methode handelt, muss eine Kalibrierung vorgenommen werden. Hierzu werden in der Regel eng verteilte, linear aufgebaute Polystyrolstandards mit bekannten mittleren Molmassen $M_n$ und $M_w$ und einer bekannten Molmassenverteilung verwendet. Die Eichkurve kann für die Bestimmung der Molmassen unbekannter Proben nur herangezogen werden, wenn die Bedingungen für die Trennung der Probe und der Standards identisch sind.

Ein fester Bezug zwischen der Molmasse und dem Elutionsvolumen ist nur unter den spezifischen Bedingungen des betreffenden Versuchs zulässig. Diese Bedingungen umfassen vor allem die Temperatur, das Lösungsmittel (oder die Lösungsmittelmischung), die chromatografischen Bedingungen und die Trennsäule bzw. das Trennsäulensystem.

Bei den auf diese Weise ermittelten Molmassen der Probe handelt es sich um relative Werte, die als „polystyrol-äquivalente“ Molmasse bezeichnet werden. Das bedeutet, dass — in Abhängigkeit von den strukturellen und chemischen Unterschieden zwischen der Probe und den Standards — die Molmassen mehr oder weniger von den absoluten Werten abweichen können. Werden andere Standards verwendet, z. B. Polyethylenglykol, Polyethylenoxid, Polymethylmethacrylat, Polyacrylsäure, so muss dies begründet werden.

1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Sowohl die Molmassenverteilung der Probe als auch die mittleren Molmassen ($M_n$, $M_w$) können mit Hilfe der GPC bestimmt werden. Bei der GPC handelt es sich um eine besondere Form der Flüssigchromatografie, bei der die Probe nach den hydrodynamischen Volumina der einzelnen Bestandteile (2) aufgetrennt wird.

Die Trennung erfolgt, indem die Probe durch eine Säule läuft, die mit einem porösen Material, in der Regel einem organischen Gel, gefüllt ist. Kleine Moleküle durchdringen die Poren, während große Moleküle ausgeschlossen werden. Der Weg der großen Moleküle ist daher kürzer, und folglich werden diese zuerst eluiert. Die Moleküle mittlerer Größe durchdringen einige der Poren und werden zu einem späteren Zeitpunkt eluiert. Die kleinsten Moleküle, mit einem durchschnittlichen hydrodynamischen Radius, der kleiner ist als die Poren des Gels, können alle Poren durchdringen. Diese werden zuletzt eluiert.

Im Idealfall erfolgt die Trennung ausschließlich über die Größe der Moleküle, doch ist es in der Praxis schwierig, gewisse störende Absorptionseffekte zu vermeiden. Ungleichmäßige Säulenfüllungen und Totvolumen können zur weiteren Verschlechterung der Trennung führen (2).

Die Detektion erfolgt beispielsweise über den Brechungsindex oder die UV-Absorption und ergibt eine einfache Verteilungskurve. Um tatsächliche Molmassenwerte für die Kurve zu erhalten, ist es notwendig, die Säule zu kalibrieren, indem Polymere mit bekannter Molmasse und idealerweise auch mit im großen und ganzen vergleichbarer Struktur, z. B. verschiedene Polystyrolstandards, auf diese Säule aufgegeben werden. In der Regel ergibt sich eine Gaußsche Kurve, die manchmal durch einen kleinen Schwanz in Richtung der niedrigen Molmassen verzerrt ist; die vertikale Achse zeigt die Häufigkeit der verschiedenen eluierten Molmassenfraktionen, die horizontale Achse log Molmasse.

▼B

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Die Wiederholbarkeit (Relative Standardabweichung: RSA) für den Wert des Elutionsvolumens sollte besser als 0,3 % sein. Die geforderte Wiederholbarkeit der Analyse muss durch Korrektur mittels eines internen Standards gewährleistet sein, wenn ein Chromatogramm zeitabhängig ausgewertet wird und nicht dem oben genannten Kriterium (1) entspricht. Die Polydispersitäten sind von den Molmassen der Standards abhängig. Für die Polystyrolstandards sind folgende Werte charakteristisch:

| | |
|---|---|
| $M_p < 2\,000$ | $M_w/M_n < 1{,}20$ |
| $2\,000 \leq M_p \leq 10^6$ | $M_w/M_n < 1{,}05$ |
| $M_p > 10^6$ | $M_{w//}/M_n < 1{,}20$ |

($M_p$ bezeichnet die Molmasse des Standards am Peakmaximum.)

1.6. BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.6.1. **Vorbereitung der Standardpolystyrollösungen**

Die Polystyrolstandards werden vorsichtig im gewählten Elutionsmittel gelöst. Die Empfehlungen des Herstellers müssen bei der Vorbereitung der Lösungen berücksichtigt werden.

Die Konzentrationen der gewählten Standards sind von verschiedenen Faktoren abhängig, z. B. Injektionsvolumen, Viskosität der Lösung und Empfindlichkeit des analytischen Detektors. Das maximale Injektionsvolumen muss der Länge der Säule angepasst werden, um eine Überladung zu vermeiden. Normalerweise liegen die Injektionsvolumina für analytische Trennungen mittels GPC durch eine Säule von 30 cm × 7,8 mm zwischen 40 und 100 µl. Größere Volumen sind möglich, doch sollten 250 µl nicht überschritten werden. Das optimale Verhältnis zwischen Injektionsvolumen und Konzentration muss vor der eigentlichen Kalibrierung der Säule bestimmt werden.

1.6.2. **Vorbereitung der Probelösung**

Im Prinzip gelten die zuvor genannten Anforderungen auch für die Vorbereitung der Probelösungen. Die Probe wird in einem geeigneten Lösungsmittel, z. B. Tetrahydrofuran (THF), durch vorsichtiges Schütteln gelöst. Das Polymer sollte unter keinen Umständen mittels Ultraschallbad gelöst werden. Wenn nötig, wird die Probelösung mit Hilfe eines Membranfilters mit einer Porengröße von 0,2 bis 2 µm gereinigt.

Die Anwesenheit ungelöster Partikel muss im Abschlußbericht dokumentiert werden, da diese auf hohe Molmassenfraktionen zurückzuführen sein könnte. Es sollte ein geeignetes Verfahren verwendet werden, um die Gewichtsanteile der ungelösten Partikel zu bestimmen. Die Lösung sollte innerhalb von 24 Stunden verbraucht werden.

1.6.3. **Apparatur**

— Lösungsmittelvorratsgefäß

— Vorrichtung zum Entgasen (gegebenenfalls)

— Pumpe

▼B

— Pulsationsdämpfer (gegebenenfalls)

— Injektionssystem

— Chromatografiesäulen

— Detektor

— Durchflussmesser (gegebenenfalls)

— Datenaufzeichnungs-/-verarbeitungsgerät

— Abfallbehältnis

Es muss sichergestellt sein, dass das GPC-System gegenüber dem verwendeten Lösungsmittel inert ist (z. B. durch die Verwendung von Stahlkapillaren für das Lösungsmittel THF).

1.6.4. **Injektion und Lösungsmittelzugabesystem**

Auf die Säule wird eine bestimmte Menge der Probelösung, entweder automatisch oder manuell in einer scharf begrenzten Zone aufgegeben. Ein zu schnelles Zurückziehen oder Drücken des Spritzenkolbens (bei manueller Ausführung) kann Veränderungen in der beobachteten Molmassenverteilung zur Folge haben. Die Lösungsmittelzugabe sollte möglichst pulsationsfrei erfolgen, wobei idealerweise ein Pulsationsdämpfer eingesetzt wird. Die Durchflussgeschwindigkeit liegt in der Größenordnung von 1 ml/min.

1.6.5. **Säule**

Je nach Art der Probe wird das Polymer durch Verwendung einer einfachen oder mehrerer in Reihe geschalteter Säulen charakterisiert. Im Handel ist eine Reihe poröser Säulenmaterialien mit definierten Eigenschaften (z. B. Porengröße, Ausschlussgrenzen) erhältlich. Die Wahl des Trenngels oder der Länge der Säule ist sowohl von den Eigenschaften der Probe (hydrodynamisches Volumen, Molmassenverteilung) als auch von den spezifischen Bedingungen für die Trennung wie z. B. Lösungsmittel, Temperatur und Durchflussgeschwindigkeit (1) (2) (3) abhängig.

1.6.6. **Theoretische Böden**

Die für die Trennung verwendete Säule bzw. Säulenkombination muss durch die Anzahl der theoretischen Böden charakterisiert sein. Dies umfasst (wenn THF als Elutionsmittel verwendet wird) die Aufgabe einer Lösung von Ethylenbenzol oder einer anderen geeigneten nichtpolaren Substanz auf die Säule. Die Zahl der theoretischen Böden ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$N = 5,54 \left( \frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{oder} \qquad N = 16 \left( \frac{V_e}{W} \right)^2$$

Dabei ist:

$N$ = die Zahl der theoretischen Böden

$V_e$ = das Elutionsvolumen am Peakmaximum

▼B

W = die Peakbreite an der Grundlinie

$W_{1/2}$ = die Peakbreite in halber Höhe

1.6.7. **Trennleistung**

Außer der Zahl der theoretischen Böden, die für die Bestimmung der Bandbreite notwendig ist, spielt auch die Trennleistung eine Rolle, die sich aus der Steilheit der Eichkurve ergibt. Die Trennleistung einer Säule wird aus folgender Beziehung abgeleitet:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{Querschnittsfläche der Säule}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

Dabei ist:

$V_{e,\,Mx}$ = das Elutionsvolumen für Polystyrol mit der Molmasse $M_x$

$V_{e,(10.Mx)}$ = das Elutionsvolumen für Polystyrol mit einer zehnmal größeren Molmasse

Die Auflösung (R) des Systems wird allgemein wie folgt definiert:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

Dabei ist:

$V_{e1}$, $V_{e2}$ = die Elutionsvolumen der beiden Polystyrolstandards am Peakmaximum

$W_1$, $W_2$ = die Peakbreite an der Grundlinie

$M_1$, $M_2$ = die Molmassen am Peakmaximum (sollten um den Faktor 10 differieren)

Der R-Wert für das Säulensystem sollte größer als 1,7 (4) sein.

1.6.8. **Lösungsmittel**

Alle Lösungsmittel müssen von höchster Reinheit sein (T'HF wird in einer Reinheit von 99,5 % verwendet). Die Größe des Lösungsmittelreservoirs (gegebenenfalls in einer Inertgasatmosphäre) muss für die Kalibrierung der Säule und mehrere Probenanalysen ausreichend sein. Das Lösungsmittel muss entgast werden, bevor es mit Hilfe der Pumpe auf die Säule aufgegeben wird.

1.6.9. **Temperaturkontrolle**

Die Temperatur von Injektionsschleife, Säulen, Detektor und Säulenmaterial sollte konstant und auf das gewählte Lösungsmittel abgestimmt sein.

▼B

1.6.10. **Detektor**

Der Detektor dient zur mengenmäßigen Erfassung der Konzentration der aus der Säule eluierten Probe. Um eine unnötige Verbreiterung der Peaks zu vermeiden, muss das Kuvettenvolumen der Detektorzelle so klein wie möglich gehalten werden. Außer bei Lichtstreuungs- und Viskositätsdetektoren sollte es nicht mehr als 10 µl betragen. Für die Detektion wird in der Regel die Differentialrefraktometrie eingesetzt. Wenn es die spezifischen Eigenschaften der Probe oder des Elutionsmittels erfordern, können auch andere Detektortypen verwendet werden, z. B. UV/VIS-, IR-, Viskositätsdetektoren etc.

2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

2.1. DATEN

Im Hinblick auf die detaillierten Auswertungskriterien wie auch für die Anforderungen bezüglich Datenerfassung und -Verarbeitung sollte die DIN-Norm (1) angewendet werden.

Für jede Probe müssen zwei unabhängige Versuche durchgeführt werden, die getrennt analysiert werden.

$M_n$, $M_w$, $M_w/M_n$ und $M_p$ müssen für jede der Messungen bekannt sein. Es ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass es sich bei den gemessenen Werten um Relativwerte handelt, die der Molmasse des verwendeten Standards äquivalent sind.

Nach der Bestimmung der Retentionsvolumina oder der Retentionszeiten (u. U. mit Hilfe eines internen Standards korrigiert) werden die log $M_p$ Werte (wobei $M_p$ das Peakmaximum des Eichstandards ist) gegen eine dieser Größen aufgetragen. Mindestens zwei Eichpunkte sind pro Molmassendekade notwendig, und mindestens fünf Messpunkte sind für die Gesamtkurve erforderlich, durch die die geschätzte Molmasse der Probe erfasst werden soll. Der niedermolekulare Endpunkt der Eichkurve wird durch n-Hexylbenzol oder eine andere geeignete nichtpolare Substanz definiert. Zahlenmittel und Gewichtsmittel der Molmasse werden im Allgemeinen mittels elektronischer Datenverarbeitung auf der Grundlage der in Abschnitt 1.2 genannten Formeln ermittelt. Bei manueller Auswertung kann die ASTM D 3536-91 herangezogen werden (3).

Die Verteilungskurve muss in Form einer Tabelle oder als Abbildung (differentielle Häufigkeit oder Summenprozent gegen log M) dargestellt werden. Bei einer grafischen Darstellung sollte eine Molmassendekade in der Regel 4 cm breit sein, und das Peakmaximum sollte etwa 8 cm sein. Bei integralen Verteilungskurven sollte der Abstand auf der Ordinate zwischen 0 und 100 % bei ca. 10 cm liegen.

2.2. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

2.2.1. **Prüfsubstanz**

— verfügbare Informationen über die Prüfsubstanz (Identität, Zusatzstoffe, Verunreinigungen)

▼B

— Beschreibung der Probenbehandlung, Beobachtungen, Probleme

2.2.2. **Instrumentierung**

— Reservoir des Elutionsmittels, Inertgas, Entgasung des Elutionsmittels, Zusammensetzung des Elutionsmittels, Verunreinigungen

— Pumpe, Pulsationsdämpfer, Injektionssystem

— Trennsäulen (Hersteller, alle Angaben zu den Säuleneigenschaften, z. B. Porengröße, Art des Trennmaterials etc., Zahl, Länge und Anordnung der verwendeten Säulen)

— Zahl der theoretischen Böden der Säule (oder Säulenkombination), Trennleistung (Auflösungsvermögen des Systems)

— Angaben über die Peaksymmetrie

— Säulentemperatur, Art der Temperaturkontrolle

— Detektor (Messprinzip, Typ, Kuvettenvolumen)

— gegebenenfalls Durchflussmesser (Hersteller, Messprinzip)

— Datenaufzeichnungs- und -Verarbeitungssystem (Hardware und Software)

2.2.3. **Systemkalibrierung**

— detaillierte Beschreibung des für die Erstellung der Eichkurve verwendeten Verfahrens

— Angaben zu Qualitätskriterien dieses Verfahrens (z. B. Korrelationskoeffizient, Quadratsummenfehler usw.)

— Angaben über alle Extrapolationen und Näherungen während des Versuchsablaufs sowie in der Auswertung und Verarbeitung der Daten

— alle Messungen zur Erstellung der Eichkurve müssen in einer Tabelle dokumentiert sein, die für jeden Eichpunkt folgende Angaben enthält:

  — Name der Probe,

  — Hersteller der Probe,

  — charakteristische Werte der Standards $M_p$, $M_n$, $M_w$, $M_w/M_n$, wie sie vom Hersteller genannt oder aus Messungen abgeleitet wurden, sowie alle Einzelheiten zur Bestimmungsmethode,

  — Injektionsvolumen und Injektionskonzentration,

▼B

— für die Kalibrierung verwendeter $M_p$-Wert,

— am Peakmaximum gemessenes Elutionsvolumen oder korrigierte Retentionszeit,

— $M_p$, berechnet am Peakmaximum,

— prozentualer Fehler von berechneten $M_p$ und Kalibrierwert $M_p$.

2.2.4. **Auswertung**

— Auswertung über die Zeit: verwendete Verfahren zur Gewährleistung der geforderten Reproduzierbarkeit (Korrekturverfahren, interner Standard etc.)

— Angaben darüber, ob die Bewertung auf der Grundlage des Elutionsvolumens oder der Retentionszeit vorgenommen wurde

— Angaben zu den Grenzen der Auswertung, wenn ein Peak nicht vollständig analysiert wurde

— Beschreibung der Glättungsmethoden, falls verwendet

— Vorbereitung und Vorbehandlung der Probe

— Angaben zur Anwesenheit ungelöster Partikel, falls vorhanden

— Injektionsvolumen (µl) und Injektionskonzentration (mg/ml)

— Beobachtungen von Effekten, die zu Abweichungen vom idealen GPC-Profil führen

— ausführliche Beschreibung aller Änderungen im Prüfverfahren

— Einzelheiten zu den Fehlerbereichen

— alle weiteren Angaben und Beobachtungen, die für die Auswertung der Ergebnisse relevant sind.

3. **LITERATURHINWEISE**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatografie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

*Anlage*

**Beispiele anderer Methoden zur Bestimmung der zahlengemittelten Molmasse ($M_n$) von Polymeren**

Die Gelpermeationschromatografie (GPC) ist die bevorzugte Methode zur Bestimmung von $M_n$, insbesondere wenn eine Reihe von Standards zur Verfügung steht, deren Struktur mit der des Polymers vergleichbar ist. Wo jedoch praktische Schwierigkeiten beim Einsatz der GPC auftreten oder wo zu erwarten ist, dass kein korrekter Wert für $M_n$ erhalten wird (und was bestätigt werden soll), stehen Alternativen zur Verfügung, wie z. B.:

1. **Nutzung kolligativer Eigenschaften**

1.1. Ebullioskopie/Kryoskopie

besteht in der Messung der Siedepunkterhöhung (Ebullioskopie) oder Gefrierpunkterniedrigung (Kryoskopie) eines Lösungsmittels, wenn das Polymer zugefügt wird. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass der Siede-/Gefrierpunkt des Lösungsmittels von der Molmasse des gelösten Polymers abhängig ist (1) (2).

Anwendungsbereich: $M_n < 20\,000$.

1.2. Dampfdruckerniedrigung

besteht in der Messung des Dampfdrucks einer gewählten Bezugsflüssigkeit vor und nach der Zugabe einer bekannten Menge des Polymers (1) (2).

Anwendungsbereich: $M_n < 20\,000$ (theoretisch; in der Praxis jedoch nur von eingeschränktem Bedeutungswert).

1.3. Membranosmometrie

beruht auf dem Prinzip der Osmose, d. h. der natürlichen Tendenz von Lösungsmittelmolekülen, eine semipermeable Membran von einer verdünnten in Richtung einer konzentrierten Lösung zu durchdringen, um ein Gleichgewicht zu erreichen. In dem Test hat die verdünnte Lösung die Konzentration Null, während die konzentrierte Lösung das Polymer enthält. Die Wanderung des Lösungsmittels durch die Membran verursacht eine Druckdifferenz, die von der Konzentration und der Molmasse des Polymers (1) (3) (4) abhängig ist.

Anwendungsbereich: $M_n < 20\,000$-$200\,000$.

1.4. Dampfphasen-Osmometrie

besteht im Vergleich der Verdunstungsgeschwindigkeit eines reinen Lösungsmittelaerosols mit mindestens drei Aerosolen, die das Polymer in unterschiedlichen Konzentrationen (1) (5) (6) enthalten.

Anwendungsbereich: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Endgruppen-Analyse**

Um diese Methode verwenden zu können, muss sowohl die Gesamtstruktur des Polymermoleküls als auch die Art der Endgruppe der Kette bekannt sein (die beispielsweise mittels NMR oder Titration/-Derivatisierung vom Hauptgerüst unterschieden werden muss). Über die Endgruppenzahl kann die Molmasse des Polymers errechnet werden (7) (8) (9).

Anwendungsbereich: $M_n$ bis zu 50 000 (mit abnehmender Zuverlässigkeit).

**Literaturhinweise**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd ed., John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Kapitel 4. In: Polymer Molecular Weights, Teil I, P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989). Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, 25-52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E., Müller, G, und Arndt, K.-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, München.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Kapitel 3. In: Polymer Molecular Weights, Teil I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. **NIEDERMOLEKULARER ANTEIL VON POLYMEREN**

1. **METHODE**

Diese gelpermeationschromatografische Methode entspricht der OECD TG 119 (1996). Die wichtigsten Grundsätze und weitere technische Informationen werden in den Literaturhinweisen (1) genannt.

1.1. EINLEITUNG

Da die Eigenschaften von Polymeren so unterschiedlich sind, ist es unmöglich, nur eine einzige Methode zu nennen, die alle Bedingungen für die Trennung und Auswertung erfüllt und somit sämtliche Eventualitäten und Besonderheiten bei der Trennung von Polymeren berücksichtigt. Insbesondere für komplexe polymere Systeme ist die Gelpermeationschromatografie (GPC) häufig nicht geeignet. Wenn die GPC nicht anwendbar ist, kann die Molmasse mit Hilfe anderer Methoden bestimmt werden (siehe Anlage). In solchen Fällen muss die verwendete Methode in allen Einzelheiten beschrieben und die Gründe für deren Verwendung genannt werden.

Die beschriebene Methode beruht auf DIN-Norm 55672 (1). Diese Norm enthält ausführliche Informationen darüber, wie die Versuche durchgeführt und wie die Daten ausgewertet werden müssen. Wenn Änderungen der Versuchsbedingungen notwendig sein sollten, müssen diese Änderungen begründet werden. Es können andere Normen herangezogen werden, diese müssen jedoch belegt werden. Im beschriebenen Verfahren werden Polystyrolproben bekannter Polydispersität zur Kalibrierung verwendet; es kann jedoch vorkommen, dass das Verfahren für bestimmte Polymere, z. B. wasserlösliche und langkettige, verzweigte Polymere, angepasst werden muss.

1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Der niedermolekulare Anteil wird willkürlich auf unter 1 000 Dalton festgelegt.

Die zahlengemittelte Molmasse $M_n$ und die gewichtsgemittelte Molmasse $M_w$ werden anhand folgender Gleichungen bestimmt:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

Dabei ist:

$H_i$ = die Höhe des Detektorsignals von der Grundlinie für das Retentionsvolumen $V_i$

$M_i$, = die Molmasse der Polymerfraktion bei dem Retentionsvolumen $V_i$

n = die Zahl der Datenpunkte

Die Breite der Molmassenverteilung, die ein Maß für die Dispersität des Systems ist, wird durch das Verhältnis $M_w/M_n$ ausgedrückt.

▼B

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Da es sich bei der GPC um eine relative Methode handelt, muss eine Kalibrierung vorgenommen werden. Hierzu werden in der Regel eng verteilte, linear aufgebaute Polystyrolstandards mit bekannten mittleren Molmassen $M_n$ und $M_w$ und einer bekannten Molmassenverteilung verwendet. Die Eichkurve kann für die Bestimmung der Molmassen unbekannter Proben nur herangezogen werden, wenn die Bedingungen für die Trennung der Probe und der Standards identisch sind.

Ein fester Bezug zwischen der Molmasse und dem Elutionsvolumen ist nur unter den spezifischen Bedingungen des betreffenden Versuchs zulässig. Diese Bedingungen umfassen vor allem die Temperatur, das Lösungsmittel (oder die Lösungsmittelmischung), die chromatografischen Bedingungen und die Trennsäule bzw. das Trennsäulensystem.

Bei den auf diese Weise ermittelten Molmassen der Probe handelt es sich um relative Werte, die als „polystyrol-äquivalente Molmasse“ bezeichnet werden. Das bedeutet, dass — in Abhängigkeit von den strukturellen und chemischen Unterschieden zwischen der Probe und den Standards — die Molmassen mehr oder weniger von den absoluten Werten abweichen können. Werden andere Standards verwendet, z. B. Polyethylenglykol, Polyethylenoxid, Polymethylmethacrylat, Polyacrylsäure, so muss dies begründet werden.

1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Sowohl die Molmassenverteilung der Probe als auch die mittleren Molmassen ($M_n$, $M_w$) können mit Hilfe der GPC bestimmt werden. Bei der GPC handelt es sich um eine besondere Form der Flüssigchromatografie, bei der die Probe nach den hydrodynamischen Volumina der einzelnen Bestandteile (2) aufgetrennt wird.

Die Trennung erfolgt, indem die Probe durch eine Säule läuft, die mit einem porösen Material, in der Regel einem organischen Gel, gefüllt ist. Kleine Moleküle durchdringen die Poren, während große Moleküle ausgeschlossen werden. Der Weg der großen Moleküle ist daher kürzer, und folglich werden diese zuerst eluiert. Die Moleküle mittlerer Größe durchdringen einige der Poren und werden zu einem späteren Zeitpunkt eluiert. Die kleinsten Moleküle, mit einem durchschnittlichen hydrodynamischen Radius, der kleiner ist als die Poren des Gels, können alle Poren durchdringen. Diese werden zuletzt eluiert.

Im Idealfall erfolgt die Trennung ausschließlich über die Größe der Moleküle, doch ist es in der Praxis schwierig, gewisse störende Absorptionseffekte zu vermeiden. Ungleichmäßige Säulenfüllungen und Totvolumen können zur weiteren Verschlechterung der Trennung führen (2).

Die Detektion erfolgt beispielsweise über den Brechungsindex oder die UV-Absorption und ergibt eine einfache Verteilungskurve. Um tatsächliche Molmassenwerte für die Kurve zu erhalten, ist es notwendig, die Säule zu kalibrieren, indem Polymere mit bekannter Molmasse sowie idealerweise auch mit im Großen und Ganzen vergleichbarer Struktur, z. B. verschiedene Polystyrolstandards, auf diese Säule aufgegeben werden. In der Regel ergibt sich eine Gaußsche Kurve, die gelegentlich durch einen kleinen Schwanz in Richtung der niedrigen Molmassen verzerrt ist; die vertikale Achse zeigt die Häufigkeit der verschiedenen eluierten Molmassenfraktionen, die horizontale Achse log Molmasse.

▼B

Der niedermolekulare Anteil wird aus dieser Kurve abgeleitet. Die Berechnung kann nur dann genau sein, wenn die niedermolekularen Fraktionen in Bezug auf die Masse äquivalent zum Polymer als Ganzes sind.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Die Wiederholbarkeit (Relative Standardabweichung: RSA) für den Wert des Elutionsvolumens sollte besser als 0,3 % sein. Die geforderte Wiederholbarkeit der Analyse muss durch Korrektur mittels eines internen Standards gewährleistet sein, wenn ein Chromatogramm zeitabhängig ausgewertet wird und nicht dem oben genannten Kriterium (1) entspricht. Die Polydispersitäten sind von den Molmassen der Standards abhängig. Für die Polystyrolstandards sind folgende Werte charakteristisch:

| | |
|---|---|
| $M_p < 2\,000$ | $M_w/M_n < 1{,}20$ |
| $2\,000 \leq M_p \leq 10^6$ | $M_w/M_n < 1{,}05$ |
| $M_p > 10^6$ | $M_w/M_n < 1{,}20$ |

($M_p$ bezeichnet die Molmasse des Standards am Peakmaximum)

1.6. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.6.1. **Vorbereitung der Standardpolystyrollösungen**

Die Polystyrolstandards werden vorsichtig im gewählten Elutionsmittel gelöst. Die Empfehlungen des Herstellers müssen bei der Vorbereitung der Lösungen berücksichtigt werden.

Die Konzentrationen der gewählten Standards sind von verschiedenen Faktoren abhängig, z. B. Injektionsvolumen, Viskosität der Lösung und Empfindlichkeit des analytischen Detektors. Das maximale Injektionsvolumen muss der Länge der Säule angepasst werden, um eine Überbeladung zu vermeiden. Normalerweise liegen die Injektionsvolumina für analytische Trennungen mittels GPC durch eine Säule von 30 cm × 7,8 mm zwischen 40 und 100 µl. Größere Volumen sind möglich, doch sollten 250 µl nicht überschritten werden. Das optimale Verhältnis zwischen Injektionsvolumen und Konzentration muss vor der eigentlichen Kalibrierung der Säule bestimmt werden.

1.6.2. **Vorbereitung der Probelösung**

Im Prinzip gelten die zuvor genannten Anforderungen auch für die Vorbereitung der Probelösungen. Die Probe wird in einem geeigneten Lösungsmittel, z. B. Tetrahydrofuran (THF), durch vorsichtiges Schütteln gelöst. Die Lösung sollte unter keinen Umständen mittels Ultraschallbad gelöst werden. Wenn nötig, wird die Probelösung mit Hilfe eines Membranfilters mit einer Porengröße von 0,2 bis 2 µm gereinigt.

Die Anwesenheit ungelöster Partikel muss im Abschlussbericht dokumentiert werden, da diese auf hohe Molmassenfraktionen zurückzuführen sein könnte. Es sollte ein geeignetes Verfahren verwendet werden, um die Gewichtsanteile der ungelösten Partikel zu bestimmen. Die Lösung sollte innerhalb von 24 Stunden verbraucht werden.

▼B

1.6.3. **Berichtigungen aufgrund von Verunreinigungen und Zusatzstoffen**

Die Korrektur des Gehalts an Fraktionen mit M < 1 000 aufgrund bestimmter vorhandener nichtpolymerer Komponenten (z. B. Verunreinigungen und/oder Zusatzstoffe) ist in der Regel notwendig, sofern der gemessene Gehalt nicht bereits < 1 % ist. Dies wird durch die direkte Analyse der Polymerlösung oder des GPC-Eluats erreicht.

Wenn das Eluat nach Durchlaufen der Säule für eine weitere Analyse zu verdünnt ist, muss es konzentriert werden. Es kann u. U. erforderlich sein, das Eluat bis zur Trocknung einzudampfen und den Rückstand neu aufzulösen. Die Konzentrierung des Eluats muss unter Bedingungen erfolgen, die sicherstellen, dass im Eluat keine Veränderungen auftreten. Die Behandlung des Eluats nach der GPC ist abhängig davon, welches analytische Verfahren für die quantitative Bestimmung eingesetzt wird.

1.6.4. **Apparatur**

Die GPC-Apparatur besteht aus folgenden Komponenten:

— Lösungsmittelvorratsgefäß,

— Vorrichtung zum Entgasen (gegebenenfalls),

— Pumpe,

— Pulsationsdämpfer (gegebenenfalls),

— Injektionssystem,

— Chromatografiesäulen,

— Detektor,

— Durchflussmesser (gegebenenfalls),

— Datenaufzeichnungs-/-verarbeitungsgerät,

— Abfallbehältnis.

Es muss sichergestellt sein, dass das GPC-System gegenüber dem verwendeten Lösungsmittel inert ist (z. B. durch die Verwendung von Stahlkapillaren für das Lösungsmittel THF).

1.6.5. **Injektion und Lösungsmittelzugabesystem**

Auf die Säule wird eine bestimmte Menge der Probelösung, entweder automatisch oder manuell in einer scharf begrenzten Zone aufgegeben. Ein zu schnelles Zurückziehen oder Drücken des Spritzenkolbens (bei manueller Ausführung) kann Veränderungen in der beobachteten Molmassenverteilung zur Folge haben. Die Lösungsmittelzugabe sollte möglichst pulsationsfrei sein, wobei idealerweise ein Pulsationsdämpfer eingesetzt wird. Die Durchflussgeschwindigkeit liegt in der Größenordnung von 1 ml/min.

1.6.6. **Säule**

Je nach Art der Probe wird das Polymer durch Verwendung einer einfachen oder mehrerer in Reihe geschalteter Säulen charakterisiert. Im Handel ist eine Reihe poröser Säulenmaterialien mit definierten Eigenschaften (z. B. Porengröße, Ausschlussgrenzen) erhältlich. Die Wahl des Trenngels oder der Länge der Säule ist sowohl von den Eigenschaften der Probe (hydrodynamisches Volumen, Molmassenverteilung) als auch von den spezifischen Bedingungen für die Trennung wie z. B. Lösungsmittel, Temperatur und Durchflussgeschwindigkeit (1) (2) (3) abhängig.

▼B

1.6.7. **Theoretische Böden**

Die für die Trennung verwendete Säule bzw. Säulenkombination muss durch die Anzahl der theoretischen Böden charakterisiert sein. Dies umfasst (wenn THF als Elutionsmittel verwendet wird) die Aufgabe einer Lösung von Ethylenbenzol oder einer anderen geeigneten nichtpolaren Substanz auf die Säule. Die Zahl der theoretischen Böden ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$N = 5,54 \left( \frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{oder} \qquad N = 16 \left( \frac{V_e}{W} \right)^2$$

Dabei ist:

$N$ = die Zahl der theoretischen Böden

$V_e$ = das Elutionsvolumen am Peakmaximum

$W$ = die Peakbreite an der Grundlinie

$W_{1/2}$ = die Peakbreite in halber Höhe

1.6.8. **Trennleistung**

Außer der Zahl der theoretischen Böden, die für die Bestimmung der Bandbreite notwendig ist, spielt auch die Trennleistung eine Rolle, die sich aus der Steilheit der Eichkurve ergibt. Die Trennleistung einer Säule wird aus folgender Beziehung abgeleitet:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{Querschnittsfläche der Säule}} \geq 6,0 \left[ \frac{cm^3}{cm^2} \right]$$

Dabei ist:

$V_{e,\,Mx}$ = das Elutionsvolumen für Polystyrol mit der Molmasse $M_x$

$V_{e,(10.Mx)}$ = das Elutionsvolumen für Polystyrol mit einer zehnmal größeren Molmasse

Die Auflösung (R) des Systems wird allgemein wie folgt definiert:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

Dabei ist:

$V_{e1}$, $V_{e2}$ = die Elutionsvolumen der beiden Polystyrolstandards am Peakmaximum

$W_1$, $W_2$ = die Peakbreite an der Grundlinie

$M_1$, $M_2$ = die Molmassen am Peakmaximum (sollten um den Faktor 10 differieren)

Der R-Wert für das Säulensystem sollte größer als 1,7 (4) sein.

▼B

1.6.9. **Lösungsmittel**

Alle Lösungsmittel müssen von höchster Reinheit sein (THF wird in einer Reinheit von 99,5 % verwendet). Die Größe des Lösungsmittelreservoirs (gegebenenfalls in einer Inertgasatmosphäre) muss für die Kalibrierung der Säule und mehrere Probenanalysen ausreichend sein. Das Lösungsmittel muss entgast werden, bevor es mit Hilfe der Pumpe auf die Säule aufgegeben wird.

1.6.10. **Temperaturkontrolle**

Die Temperatur von Injektionsschleife, Säulen, Detektor und Säulenmaterial sollte konstant und auf das gewählte Lösungsmittel abgestimmt sein.

1.6.11. **Detektor**

Der Detektor dient zur mengenmäßigen Erfassung der Konzentration der aus der Säule eluierten Probe. Um eine unnötige Verbreiterung der Peaks zu vermeiden, muss das Kuvettenvolumen der Detektorzelle so klein wie möglich gehalten werden. Außer bei Lichtstreuungs- und Viskositätsdetektoren sollte es nicht mehr als 10 µl betragen. Für die Detektion wird in der Regel die Differentialrefraktometrie eingesetzt. Wenn es die spezifischen Eigenschaften der Probe oder des Elutionsmittels erfordern, können auch andere Detektortypen verwendet werden, z. B. UV/VIS-, IR-, Viskositätsdetektoren usw.

2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

2.1. DATEN

Im Hinblick auf die detaillierten Auswertungskriterien wie auch für die Anforderungen bezüglich Datenerfassung und -Verarbeitung sollte die DIN-Norm (1) angewendet werden.

Für jede Probe müssen zwei unabhängige Versuche durchgeführt werden, die getrennt analysiert werden. Ferner ist es absolut unerlässlich, auch Daten aus Blindproben zu ermitteln, die unter den gleichen Bedingungen getestet werden wie die Probe.

Es ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass es sich bei den gemessenen Werten um Relativwerte handelt, die der Molmasse des verwendeten Standards äquivalent sind.

Nach der Bestimmung der Retentionsvolumina oder der Retentionszeiten (u. U. mit Hilfe eines internen Standards korrigiert) werden die log $M_p$ Werte (wobei $M_p$ das Peakmaximum des Eichstandards ist) gegen eine dieser Größen aufgetragen. Mindestens zwei Eichpunkte sind pro Molmassendekade notwendig, und mindestens fünf Messpunkte sind für die Gesamtkurve erforderlich, durch die die geschätzte Molmasse der Probe erfasst werden soll. Der niedermolekulare Endpunkt der Eichkurve wird durch n-Hexylbenzol oder eine andere geeignete nichtpolare Substanz definiert. Zahlenmittel und Gewichtsmittel der Molmasse werden im Allgemeinen mittels elektronischer Datenverarbeitung auf der Grundlage der in Abschnitt 1.2 genannten Formeln ermittelt. Bei manueller Auswertung kann die ASTM D 3536-91 herangezogen werden (3).

▼B

Wenn unlösliche Polymeranteile in der Säule zurückgehalten werden, ist ihre Molmasse wahrscheinlich höher als die der löslichen Fraktion. Wird dies nicht berücksichtigt, kann der niedermolekulare Anteil zu hoch eingeschätzt werden; in der Anlage ist beschrieben, wie der unlösliche Polymeranteil berücksichtigt werden kann.

Die Verteilungskurve muss in Form einer Tabelle oder als Zahl (differentielle Häufigkeit oder Summenprozent gegen log M) dargestellt werden. Bei der grafischen Darstellung sollte eine Molmassendekade in der Regel 4 cm breit sein, und das Peakmaximum sollte etwa 8 cm sein. Bei integralen Verteilungskurven sollte der Abstand auf der Ordinate zwischen 0 und 100 % ca. 10 cm betragen.

2.2. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

2.2.1. **Prüfsubstanz**

— Verfügbare Informationen über die Prüfsubstanz (Identität, Zusatzstoffe, Verunreinigungen)

— Beschreibung der Probenbehandlung, Beobachtungen, Probleme

2.2.2. **Instrumentierung**

— Reservoir des Elutionsmittels, Inertgas, Entgasung des Elutionsmittels, Zusammensetzung des Elutionsmittels, Verunreinigungen

— Pumpe, Pulsationsdämpfer, Injektionssystem

— Trennsäulen (Hersteller, alle Angaben zu den Säuleneigenschaften, z. B. Porengröße, Art des Trennmaterials etc., Zahl, Länge und Anordnung der verwendeten Säulen)

— Zahl der theoretischen Böden der Säule (oder Säulenkombination), Trennleistung (Auflösungsvermögen des Systems)

— Angaben über die Peaksymmetrie

— Säulentemperatur, Art der Temperaturkontrolle

— Detektor (Messprinzip, Typ, Kuvettenvolumen)

— gegebenenfalls Durchflussmesser (Hersteller, Messprinzip)

— Datenaufzeichnungs- und -Verarbeitungssystem (Hardware und Software)

2.2.3. **Systemkalibrierung**

— Detaillierte Beschreibung des für die Erstellung der Eichkurve verwendeten Verfahrens

▼B

— Angaben zu Qualitätskriterien dieses Verfahrens (z. B. Korrelationskoeffizient, Quadratsummenfehler usw.)

— Angaben über alle Extrapolationen und Näherungen während des Versuchsablaufs sowie in der Auswertung und Verarbeitung der Daten

— Alle Messungen zur Erstellung der Eichkurve müssen in einer Tabelle dokumentiert sein, die für jeden Eichpunkt folgende Angaben enthält:

  — Name der Probe,

  — Hersteller der Probe,

  — charakteristische Werte der Standards $M_p$, $M_n$, $M_w$, $M_w/M_n$, wie sie vom Hersteller genannt oder aus Messungen abgeleitet wurden, sowie alle Einzelheiten zur Bestimmungsmethode,

  — Injektionsvolumen und Injektionskonzentration,

  — für die Kalibrierung verwendeter $M_p$-Wert,

  — am Peakmaximum gemessenes Elutionsvolumen oder korrigierte Retentionszeit,

  — $M_p$, berechnet am Peakmaximum,

  — prozentualer Fehler vom berechneten $M_p$ und Kalibrierwert $M_p$.

2.2.4. **Angaben zum niedermolekularen Anteil**

— Beschreibung der für die Analyse verwendeten Methoden sowie der Art und Weise, wie die Versuche durchgeführt wurden

— Angaben zu dem prozentuellen Anteil der niedermolekularen Fraktionen (w/w) im Verhältnis zur Gesamtprobe

— Angaben zu Verunreinigungen, Zusatzstoffen und anderen nichtpolymeren Fraktionen ( % w/w) im Verhältnis zur Gesamtprobe

2.2.5. **Auswertung**

— Auswertung über die Zeit: verwendete Verfahren zur Gewährleistung der geforderten Reproduzierbarkeit (Berichtigungsverfahren, interner Standard usw.)

— Angaben darüber, ob die Bewertung auf der Grundlage des Elutionsvolumens oder der Retentionszeit vorgenommen wurde

— Angaben zu den Grenzen der Auswertung, wenn ein Peak nicht vollständig analysiert wurde

— Beschreibung der Glättungsmethoden, falls verwendet

— Vorbereitung und Vorbehandlung der Probe

— Angaben zur Anwesenheit ungelöster Partikel, falls vorhanden

▼B

— Injektionsvolumen (µl) und Injektionskonzentration (mg/ml)

— Beobachtungen von Effekten, die zu Abweichungen vom idealen GPC-Profil führen

— Ausführliche Beschreibung aller Änderungen im Prüfverfahren

— Einzelheiten zu den Fehlerbereichen

— Alle weiteren Angaben und Beobachtungen, die für die Auswertung der Ergebnisse relevant sind

3. **LITERATURHINWEISE**

(1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatografie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography — GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

*Anlage*

**Korrektur des niedermolekularen Anteils um unlösliche Polymerfraktionen**

Sind unlösliche Polymeranteile in einer Probe vorhanden, so führt dies zu Masseverlusten während der GPC-Analyse. Das unlösliche Polymer kann an der Säule bzw. im Probenfilter zurückgehalten werden, während der lösliche Teil der Probe die Säule durchläuft. Wenn das Brechungsindexinkrement (dn/dc) des Polymers geschätzt oder gemessen werden kann, kann auch der Masseverlust der Probe in der Säule abgeschätzt werden. In diesem Fall wird eine Korrektur anhand einer externen Kalibrierung mit Standardmaterialien bekannter Konzentration und bekanntem dn/dc zur Eichung des Refraktometers vorgenommen. In dem folgenden Beispiel wird ein Polymethylmethacrylat (pMMA)-Standard verwendet.

Bei der externen Kalibrierung zur Analyse von Acrylpolymeren wird ein pMMA-Standard bekannter Konzentration in Tetrahydrofuran mittels GPC untersucht; die sich daraus ergebenden Daten dienen der Ermittlung der Refraktometerkonstanten mit folgender Gleichung:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

Dabei ist:

K = die Refraktometerkonstante (in Mikrovoltsekunde/ml)

R = die Messgröße für den pMMA-Standard (in Mikrovoltsekunde)

C = die Konzentration des pMMA-Standards (in mg/ml)

V = das Injektionsvolumen (in ml)

dn/dc = das Brechungsindexinkrement für pMMA in Tetrahydrofuran (in ml/mg)

Die folgenden Daten sind für einen pMMA-Standard charakteristisch:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/ac = $9 \times 10^{-5}$ ml/mg.

Der sich daraus ergebende Wert $K = 3{,}05 \times 10^{11}$ wird dann zur Berechnung des theoretischen Detektorsignals herangezogen, wenn 100 % des injizierten Polymers den Detektor passiert haben.

▼B

## A.20. LÖSUNGS-/EXTRAKTIONSVERHALTEN VON POLYMEREN IN WASSER

### 1. METHODE

Die beschriebene Methode entspricht der geänderten Fassung der OECD TG 120 (1997). Weitere technische Informationen werden in den Literaturhinweisen (1) gegeben.

### 1.1. EINLEITUNG

Bestimmte Polymere, wie z. B. Emulsionspolymere, müssen eventuell vorbehandelt werden, bevor die nachstehend beschriebene Methode verwendet werden kann. Die Methode ist nicht anwendbar für flüssige Polymere und Polymere, die unter den Testbedingungen mit Wasser reagieren.

Wenn die Methode nicht praktikabel oder nicht möglich ist, sollte das Lösungs-/Extraktionsverhalten mittels anderer Methoden untersucht werden. In diesem Fall muss die verwendete Methode in allen Einzelheiten beschrieben und ihre Verwendung begründet werden.

### 1.2. REFERENZSUBSTANZEN

Keine.

### 1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Das Lösungs-/Extraktionsverhalten von Polymeren in einem wässrigen Medium wird mit Hilfe der Kolbenmethode ermittelt (siehe A.6 Wasserlöslichkeit, Kolbenmethode), wobei die unten beschriebenen Änderungen vorgenommen wurden.

### 1.4. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

### 1.5. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

#### 1.5.1. **Ausstattung**

Für die Durchführung der Methode ist folgende Ausstattung erforderlich:

— Zerkleinerungsgerät, z. B. Mühle zur Herstellung von Partikeln bekannter Größe,

— Schüttelgerät mit der Möglichkeit zur Temperaturkontrolle,

— Membranfiltersystem,

— geeignete Analysegeräte,

— genormte Siebe.

#### 1.5.2. **Probenvorbereitung**

Eine repräsentative Probe muss zunächst mit Hilfe geeigneter Siebe auf eine Partikelgröße zwischen 0,125 und 0,25 mm reduziert werden. Für die Stabilität der Probe oder für den Zerkleinerungsprozess kann dazu u. U. eine Kühlung erforderlich sein. Gummiartige Materialien können bei der Temperatur von Flüssigstickstoff (1) zerkleinert werden.

Wenn die erforderliche Partikelgrößenfraktion nicht erreicht werden kann, sollten Maßnahmen ergriffen werden, um die Partikelgröße so weit wie möglich zu reduzieren; die Ergebnisse sollten dokumentiert werden. Im Bericht muss festgehalten werden, wie die zerkleinerte Probe vor dem Test aufbewahrt wurde.

▼B

1.5.3. **Verfahren**

Je 10 g Prüfsubstanz werden in drei mit einem Glasstopfen versehene Gefäße gegeben; jedes Gefäß wird mit 1 000 ml Wasser aufgefüllt. Wenn sich eine Polymermenge von 10 g als unpraktikabel erweist, sollte die nächstgrößere Menge, die verarbeitet werden kann, eingesetzt und mit Wasser entsprechend aufgefüllt werden.

Die Gefäße werden fest verschlossen und dann bei 20 °C geschüttelt. Es sollte ein Schüttel- oder Rührgerät verwendet werden, das bei einer konstanten Temperatur arbeitet. Nach 24 Stunden wird der Inhalt eines jeden Gefäßes zentrifugiert oder filtriert und die Polymerkonzentration in der klaren wässrigen Phase mit Hilfe eines geeigneten analytischen Verfahrens bestimmt. Sollten keine geeigneten analytischen Verfahren für die wässrige Phase zur Verfügung stehen, kann die Gesamtlöslichkeit/-extrahierbarkeit anhand der Trockenmasse des Filterrückstands oder des zentrifugierten Niederschlags abgeschätzt werden.

Es ist in der Regel notwendig, quantitativ zwischen Verunreinigungen und Zusatzstoffen einerseits und den niedermolekularen Fraktionen andererseits zu differenzieren. Im Fall einer gravimetrischen Bestimmung ist es ferner wichtig, eine Blindprobe durchzuführen, in der keine Prüfsubstanz eingesetzt wird, um Rückstände aus dem Versuchsverfahren zu berücksichtigen.

Das Lösungs-/Extraktionsverhalten von Polymeren in Wasser bei 37 °C bei pH-Werten von 2 und 9 kann auf gleiche Weise bestimmt werden wie für die Untersuchung bei 20 °C beschrieben. Die pH-Werte können entweder durch Zugabe einer geeigneten Pufferlösung oder entsprechender Säuren bzw. Basen wie z. B. Salzsäure, Essigsäure, Natrium- oder Kaliumhydroxid oder $NH_3$ p. a. erreicht werden.

In Abhängigkeit von der eingesetzten Analysemethode sollten ein oder zwei Tests durchgeführt werden. Wenn hinreichend genaue Methoden zur direkten Analyse der wässrigen Phase der Polymerkomponente zur Verfügung stehen, sollte ein Test (wie oben beschrieben) ausreichen. Wenn solche Methoden jedoch nicht verfügbar sind und die Bestimmung des Lösungs-/Extraktionsverhaltens des Polymers auf indirekte Analysen beschränkt ist, bei denen lediglich der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) des wässrigen Extrakts bestimmt wird, sollte ein zusätzlicher Test durchgeführt werden. Dieser zusätzliche Test sollte ebenfalls dreimal durchgeführt werden, wobei zehnmal kleinere Polymerproben und die gleichen Mengen Wasser wie im ersten Test verwendet werden.

1.5.4. **Analyse**

1.5.4.1. *Test mit einer Probengröße*

Es ist möglich, dass Methoden für die direkte Analyse von Polymerkomponenten in der wässrigen Phase zur Verfügung stehen. Alternativ können auch indirekte Analysen der gelösten/extrahierten Polymerkomponenten durchgeführt werden, in denen der Gesamtgehalt der löslichen Anteile bestimmt und eine Berichtigung um nichtpolymerspezifische Bestandteile vorgenommen wird.

Eine Analyse der wässrigen Phase für das gesamte Polymer ist möglich entweder durch ein hinreichend empfindliches Verfahren, wie z. B.

— TOC unter Verwendung eines Peroxosulfat- oder Dichromataufschlusses zur Darstellung von $CO_2$ und einer IR-Analyse oder chemischen Analyse,

▼B

— Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) oder das ICP-Emissionsäquivalent (Inductively Coupled Plasma) für silizium- oder metallhaltige Polymere,

— UV-Absorption der Spektrofluorimetrie für Arylpolymere,

— LC-MS für Proben mit geringer niedriger Molmasse,

oder durch Eindampfen des wässrigen Extrakts im Vakuum und Analyse des Rückstands mit Hilfe der Spektroskopie (IR, UV usw.) oder AAS/ICP.

Wenn eine Analyse der wässrigen Phase als solche nicht praktikabel ist, sollte der wässrige Extrakt mittels eines nicht mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels, z. B. einem chlorierten Kohlenwasserstoff, extrahiert werden. Das Lösungsmittel wird anschließend abgezogen, der Rückstand wird (wie oben für den Polymergehalt beschrieben) analysiert. Alle Bestandteile dieses Rückstands, die als Verunreinigungen oder Zusatzstoffe identifiziert werden, müssen für die Bestimmung des Lösungs-/Extraktionsgrades des Polymers subtrahiert werden.

Wenn relativ große Mengen solcher Stoffe vorhanden sind, kann es u. U. notwendig sein, den Rückstand beispielsweise einer HPLC- oder GC-Analyse zu unterwerfen, um die Verunreinigungen von den vorhandenen Monomeren bzw. Monomerderivaten zu unterscheiden, um deren tatsächlichen Gehalt zu bestimmen.

In einigen Fällen ist es u. U. ausreichend, das organische Lösungsmittel abzuziehen und den trockenen Rückstand auszuwiegen.

1.5.4.2. *Test mit zwei unterschiedlichen Probengrößen*

Alle wässrigen Extrakte werden auf ihren TOC analysiert.

An dem nichtgelösten/nichtextrahierten Teil einer Probe wird eine gravimetrische Analyse durchgeführt. Wenn nach der Zentrifugation oder Filtration noch Polymerablagerungen an den Wänden des Gefäßes zu finden sind, sollte das Gefäß so lange mit dem Filtrat gespült werden, bis es frei von allen sichtbaren Rückständen ist. Im Anschluss wird das Filtrat erneut zentrifugiert oder filtriert. Die auf dem Filter oder im Zentrifugenglas verbliebenen Rückstände werden bei 40 ºC im Vakuum getrocknet und gewogen. Die Trocknung wird fortgesetzt, bis ein konstantes Gewicht erzielt wurde.

2. **DATEN**

2.1. TEST MIT EINER PROBENGRÖSSE

Die einzelnen Ergebnisse für die drei Kolben und die Durchschnittswerte sollten in Masseeinheiten pro Lösungsvolumen (mg/l) bzw. Masseeinheiten pro Masse der Polymerprobe (mg/g) angegeben werden. Außerdem sollte der Gewichtsverlust der Probe (berechnet als Quotient aus der Masse des eluierten Anteils und der Masse der ursprünglichen Probe) angegeben werden. Die relativen Standardabweichungen (RSA) sollten berechnet werden. Die Zahlen sollten sowohl für die gesamte Substanz (Polymer + Additive usw.) als auch für das Polymer allein (d. h. nach Abzug der Zusatzstoffe) genannt werden.

▼B

2.2. TEST MIT ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN PROBENGRÖSSEN

Die einzelnen TOC-Werte der wässrigen Extrakte der beiden Dreifachversuche sowie der Durchschnittswert für jeden Versuch sollten sowohl in Masseeinheiten pro Lösungsvolumen (normalerweise mg C/l) als auch in Maßeinheiten pro Gewicht der ursprünglichen Probe (normalerweise mg C/g) ausgedrückt werden.

Wenn es keinen Unterschied zwischen den Ergebnissen mit hohem bzw. niedrigem Probe-Wasser-Verhältnis gibt, deutet dies darauf hin, dass alle extrahierbaren Komponenten auch tatsächlich extrahiert worden sind. In diesem Fall ist eine direkte Analyse in der Regel nicht erforderlich.

Die Massen der einzelnen Rückstände sollten als prozentualer Anteil der Ausgangsmasse der Proben angegeben werden. Die Durchschnittswerte sollten ermittelt werden. Die Differenz zwischen 100 und den gefundenen Prozentsätzen stellt den Prozentgehalt des löslichen und extrahierbaren Materials der ursprünglichen Probe dar.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. TESTBERICHT

Der Testbericht muss folgende Angaben enthalten:

3.1.1. **Prüfsubstanz**

— Verfügbare Angaben zur Prüfsubstanz (Identität, Zusatzstoffe, Verunreinigungen, Gehalt der niedermolekularen Spezies)

3.1.2. **Versuchsbedingungen**

— Beschreibung der verwendeten Verfahren und Versuchsbedingungen

— Beschreibung der Analyse- und Nachweismethoden

3.1.3. **Ergebnisse**

— Ergebnisse der Löslichkeit/Extrahierbarkeit in mg/1; Einzel- und Durchschnittswerte für die Extraktionstests in den verschiedenen Lösungen, aufgeschlüsselt nach Polymergehalt und Verunreinigungen, Zusatzstoffen usw.

— Ergebnisse der Löslichkeit/Extrahierbarkeit in mg/g Polymer

— TOC-Werte der wässrigen Extrakte, Masse des eluierten Teils und errechnete Prozentsätze (gegebenenfalls)

— pH-Wert der einzelnen Proben

— Angaben zu den Werten der Blindproben

— Gegebenenfalls Hinweise auf die chemische Instabilität der Prüfsubstanz sowohl während der Prüfung als auch während des Analyseverfahrens

— Alle Informationen, die für die Auswertung der Ergebnisse von Bedeutung sind

4. **HINWEISE**

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. **BRANDFÖRDERNDE EIGENSCHAFTEN (FLÜSSIGE STOFFE)**

1. **VERFAHREN**

1.1. EINLEITUNG

Mit diesem Prüfverfahren soll festgestellt werden, inwieweit ein flüssiger Stoff die Verbrennungsgeschwindigkeit oder die Verbrennungsintensität eines brennbaren Stoffes erhöhen kann oder ein Gemisch mit einem brennbaren Stoff bilden kann, welches sich spontan entzündet, wenn beide sorgfältig gemischt werden. Es beruht auf dem UN-Test auf brandfördernde (oxidierende) Eigenschaften für flüssige Stoffe (1) und ist ihm gleichwertig. Da dieses Verfahren A.21 jedoch in erster Linie für die Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 eingeführt wurde, ist lediglich der Vergleich mit einem Referenzstoff vorgeschrieben. Weitere Tests und der Vergleich mit zusätzlichen Referenzstoffen können erforderlich sein, wenn die Testergebnisse für andere Zwecke verwendet werden sollen ([1]).

Dieser Test muss nicht durchgeführt werden, wenn anhand der Strukturformel hinreichend nachgewiesen wurde, dass der Stoff mit anderen brennbaren Stoffen nicht exotherm reagieren kann.

Es ist nützlich, Vorausinformationen über die potenziellen explosiven Eigenschaften der Stoffe zu haben, bevor dieser Test durchgeführt wird.

Dieser Test ist nicht auf feste Stoffe, Gase, explosive oder leichtentzündliche Stoffe oder auf organische Peroxide anwendbar.

Dieser Test muss nicht durchgeführt werden, wenn bereits Ergebnisse für den getesteten Stoff aus dem UN-Test auf brandfördernde (oxidierende) Eigenschaften für flüssige Stoffe (1) vorliegen.

1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Die durchschnittliche Druckanstiegszeit ist der Durchschnitt der gemessenen Zeiten, die vergehen, bis ein Gemisch bei einem Test einen Druckanstieg von 690 kPa auf 2 070 kPa über atmosphärischem Druck erzeugt.

1.3. REFERENZSTOFF

Als Referenzstoff ist 65 % (w/w) Salpetersäure in wässriger Lösung (analysenrein) erforderlich ([2]).

([1]) Beispielsweise im Rahmen der UN-Beförderungsbestimmungen.
([2]) Die Säure ist vor dem Test zu titrieren, um die genaue Konzentration zu überprüfen.

▼B

Wenn der Experimentator davon ausgeht, dass die Ergebnisse dieses Tests auch für andere Zwecke verwendet werden sollen ([1]), kann die Prüfung zusätzlicher Referenzstoffe sinnvoll sein ([2]).

1.4. PRINZIP DES PRÜFVERFAHRENS

Die Testflüssigkeit wird in einem Massenverhältnis von 1:1 mit Fasercellulose gemischt und in ein Druckgefäß gefüllt. Kommt es beim Mischen oder beim Einfüllen spontan zur Entzündung, sind keine weiteren Tests mehr nötig.

Kommt es nicht spontan zur Entzündung, so wird der gesamte Test durchgeführt. Das Gemisch wird in einem Druckgefäß erhitzt, und die Zeit, die im Durchschnitt vergeht, bis der Druck von 690 kPa auf 2 070 kPa über atmosphärischen Druck angestiegen ist, wird ermittelt. Diese Zeit wird mit der durchschnittlichen Druckanstiegszeit für das 1:1-Gemisch des/der Referenzstoffe(s) und der Cellulose verglichen.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

In fünf hintereinander erfolgten Prüfungen mit ein und demselben Stoff sollten die Ergebnisse um nicht mehr als 30 % vom arithmetischen Mittel abweichen. Ergebnisse, die um mehr als 30 % abweichen, sind nicht zu berücksichtigen. Misch- und Einfüllverfahren sollten verbessert und die Testreihe sollte wiederholt werden.

1.6. BESCHREIBUNG DES VERFAHRENS

1.6.1. **Vorbereitung**

1.6.1.1. *Brennbarer Stoff*

Getrocknete Fasercellulose mit einer Faserlänge von 50 bis 250 μm und einem durchschnittlichen Durchmesser von 25 μm ([3]) wird als brennbares Material verwendet. Sie wird in einer Schicht von nicht mehr als 25 mm Dicke bei 105 °C 4 Stunden lang bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und in einem Exsikkator mit Trocknungsmittel aufbewahrt, bis sie vollkommen abgekühlt ist und benötigt wird. Der Wassergehalt der getrockneten Cellulose sollte weniger als 0,5 % der Trockenmasse ([4]) betragen. Gegebenenfalls sollte die Trocknungszeit verlängert werden ([5]). Während des gesamten Tests ist Cellulose aus derselben Vorbereitungsprozedur zu verwenden,

([1]) Beispielsweise im Rahmen der UN-Beförderungsbestimmungen.
([2]) Beispiel: 50 % (w/w) Perchlorsäure und 40 % (w/w) Natriumchlorat werden in Bezugsdokument 1 verwendet.
([3]) Zum Beispiel Cellulosestaub aus der Whatman-Säulen-Chromatografie CF 11, Katalognr. 4021 050.
([4]) Was beispielsweise durch Karl-Fischer-Titration zu bestätigen ist.
([5]) Als Alternative kann der Wassergehalt beispielsweise auch durch Vakuumerhitzen auf 105 °C während 24 Stunden erreicht werden.

▼B

1.6.1.2. *Apparatur*

1.6.1.2.1. D r u c k g e f ä ß

Ein Druckgefäß ist erforderlich. Das Gefäß besteht aus einem zylindrischen Druckgefäß aus Stahl von einer Länge von 89 mm und einem Außendurchmesser von 60 mm (siehe Abbildung 1). Seitlich ist der Kolben an zwei gegenüberliegenden Seilen abgeflacht (wo sich der Durchmesser des Gefäßes auf 50 mm verringert), um die Handhabung bei der Einführung von Zündstopfen und Entlüftungsstopfen zu erleichtern. Das Gefäß, das eine Bohrung von 20 mm im Durchmesser hat, ist an einem Ende in einer Tiefe von 19 mm vergrößert und mit einem Gewinde versehen, so dass ein 1" British Standard Pipe (BSP) oder eine metrische Entsprechung eingeführt werden kann. Ein Druckablassarm wird in die nicht abgeflachte Seite des Druckgefäßes 35 mm von einem Ende und im Winkel von 90° zu den abgeflachten Seiten eingeschraubt. Dazu ist eine Bohrung von 12 mm Tiefe vorgesehen, die mit einem Gewinde versehen ist, in das das 1/2"-BSP-Gewinde (oder metrische Entsprechung) am unteren Ende des Seitenarms eingeschraubt werden kann. Gegebenenfalls wird eine Dichtung aus inertem Material angebracht, um den Arm gasundurchlässig zu machen. Der Seitenarm ragt 55 mm aus dem Druckgefäß heraus und hat eine Bohrung von 6 mm. Das Ende des Seitenarms ist vergrößert und mit einem Gewinde versehen, so dass ein Membrandruckaufnehmer eingeschraubt werden kann. Jedes beliebige Druckmessgerät kann verwendet werden, sofern es gegen die heißen Gase oder Spaltprodukte beständig ist und auf eine Druckanstiegsgeschwindigkeit von 690 bis 2 070 kPa in höchstens 5 ms anspricht.

Das weiter vom Seitenarm entfernte Ende wird mit einem Zündstopfen verschlossen, an den zwei Elektroden angebracht sind. Die eine ist vom Stopfen isoliert, die andere ist über diesen geerdet. Das andere Ende des Druckgefäßes wird mit einer Berstscheibe (Berstdruck rund 2 200 kPa) verschlossen, die von einem Stopfen mit einer Bohrung von 20 mm gehalten wird. Gegebenenfalls wird am Zündstopfen eine Dichtung aus inertem Material verwendet, um Gasundurchlässigkeit zu gewährleisten. Ein Ständer (Schaubild 2) hält die Vorrichtung beim Gebrauch in der richtigen Position. Er besteht in der Regel aus einer Weichstahl-Grundplatte mit der Abmessung 235 mm × 184 mm × 6 mm und einem 185 mm langen quadratischen Hohlkörper mir der Abmessung 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Von zwei gegenüberliegenden Seiten des Hohlkörpers wird an einem Längsende jeweils ein Seitenteil abgeschnitten, so dass ein Gestell mit zwei flachwandigen Beinen und einem 86 mm langen ganzen Kasten darauf entsteht. Die Enden dieser flachwandigen Beine werden in einem Winkel von 60° zur Horizontalen abgeschnitten und an die Grundplatte angeschweißt. Ein 22 mm weiter und 46 mm tiefer Spalt wird in eine Seite am oberen Ende des Kastens geschnitten, so dass bei der Einführung der Druckgefäßvorrichtung mit dem Zündstopfen voran in den Kastenteil der Vorrichtung der Seitenarm in den Spalt passt. Ein Stahlstück von 30 mm Länge und 6 mm Dicke wird als Zwischenstück unten an der Innenseite des Kastens angeschweißt. Zwei Flügelschrauben von 7 mm sind an der gegenüberliegenden Seite eingeschraubt und halten das Druckgefäß. Zwei 12 mm breite Streifen von 6 mm dickem Stahl, die an die Seitenteile am Boden des Kastens angeschweißt sind, halten das Druckgefäß von unten.

▼B

1.6.1.2.2. Zündvorrichtung

Die Zündvorrichtung besteht aus einem 25 cm langem Ni/Cr-Draht mit einem Durchmesser von 0,6 mm und einem Widerstand von 3,85 Ohm/m. Der Draht wird mit Hilfe eines Stabes von 5 mm Durchmesser zu einer Wendel gedreht und wird an den am Zündstopfen befindlichen Elektroden befestigt. Die Wendel sollte einer der Darstellungen in Abbildung 3 entsprechen. Die Unterseite der Zündwendel sollte 20 mm vom Boden des Gefäßes entfernt sein. Wenn die Elektroden nicht nachstellbar sind, sollten die Enden des Zünddrahtes zwischen der Wendel und dem Boden des Gefäßes mit einer Keramikumhüllung isoliert werden. Der Draht wird durch konstante Stromversorgung von mindestens 10 A erhitzt.

1.6.2. **Durchführung des Tests** ([1])

Die Apparatur, die komplett mit Druckaufnehmer und Heizsystem montiert ist, bei der jedoch die Berstscheibe nicht eingeführt ist, wird mit dem Zündstopfen nach unten auf dem Ständer befestigt. 2,5 g der zu testenden Flüssigkeit werden mit 2,5 g getrockneter Cellulose in einem Becherglas mit einem Rührstab aus Glas gemischt ([2]). Aus Sicherheitsgründen sollte der Mischvorgang mit einem Schutzschirm zwischen Experimentator und Gemisch durchgeführt werden. Entzündet sich das Gemisch beim Mischen oder beim Einfüllen, sind keine weiteren Tests erforderlich. Das Gemisch wird in kleinen Portionen mit leichtem Klopfen in das Druckgefäß gefüllt, wobei darauf geachtet werden muss, dass das Gemisch die Zündwendel ausreichend umhüllt und damit ein guter Kontakt gewährleistet ist. Es ist wichtig, dass sich die Wendel während des Füllens nicht verformt, da das zu falschen Ergebnissen führen kann ([3]). Die Berstscheibe wird in die vorgesehene Druckgefäßöffnung eingelegt und mit dem Halterungsstopfen fest eingeschraubt. Das gefüllte Gefäß wird auf den Ständer montiert, wobei das Ende mit der Berstscheibe nach oben zeigt. Der Ständer sollte sich in einem geeigneten gepanzerten Abzugsschrank oder in einer Brennkammer befinden. Das Stromkabel ist an den äußeren Anschlusssteckern am Zündstopfen angeschlossen. Die Stromstärke beträgt 10 A. Zwischen dem Beginn des Mischens und dem Anschalten des Stroms sollten nicht mehr als 10 Minuten vergehen.

Das vom Druckaufnehmer erzeugte Signal wird durch ein geeignetes Messdatenerfassungssystem aufgezeichnet, das sowohl die Messung als auch die Aufzeichnung eines Zeit-Druck-Profils ermöglicht (z. B. ein Transientenrecorder in Verbindung mit einem grafischen Drucker). Das Gemisch wird mindestens 60 s lang oder so lange, bis die Berstscheibe aufreißt, erhitzt. Reißt die Scheibe nicht auf, so sollte man das Gemisch abkühlen lassen, bevor die Apparatur vorsichtig abgebaut werden kann, wobei Vorkehrungsmaßnahmen gegen einen eventuellen Druckaufbau getroffen werden sollten. Es werden fünf Prüfgänge mit dem Prüfstoff und dem/den Referenzstoff(en) durchgeführt. Es wird festgehalten, wie viel Zeit vergeht, bis der Druck von 690 kPa auf 2 070 kPa über atmosphärischem Druck steigt. Die durchschnittliche Druckanstiegszeit wird berechnet.

In manchen Fällen können Stoffe einen (zu hohen oder zu niedrigen) Druckanstieg erzeugen, der nicht auf die brandfördernden Eigenschaften des Stoffes zurückzuführen ist. In diesen Fällen muss der Test gegebenenfalls mit einem inerten Stoff, z. B. Diatomit (Kieselgur), anstelle der Cellulose wiederholt werden, um die Art der Reaktion festzustellen.

([1]) Gemische von Oxidationsmitteln und Cellulose sind als potenziell explosiv zu behandeln und mit Vorsicht zu handhaben.

([2]) Dazu kann auch ein Gemisch der zu testenden Flüssigkeit und der Cellulose im Verhältnis 1:1 in größerer Menge zubereitet werden, wovon dann 5 ± 0,1 g in das Druckgefäß gefüllt werden. Das Gemisch ist für jeden Prüfgang frisch zuzubereiten.

([3]) Insbesondere muss vermieden werden, dass nebeneinander liegende Schleifen der Wendel miteinander in Kontakt kommen.

▼B

2. **DATEN**

Druckanstiegszeiten für die Testsubstanz und den/die Referenzstoff(e), Druckanstiegszeiten für die Tests mit einem inerten Stoff, soweit durchgeführt.

2.1. ERGEBNISVERARBEITUNG

Sowohl für die Testsubstanz als auch für den/die Referenzstoff(e) werden die durchschnittlichen Druckanstiegszeiten berechnet.

Die durchschnittliche Druckanstiegszeit wird für die Tests mit einem inerten Stoff berechnet (sofern durchgeführt).

In Tabelle 1 sind einige Ergebnisbeispiele aufgeführt.

*Tabelle 1*

**Ergebnisbeispiele** ([a])

| Stoff ([b]) | Durchschnittliche Druckanstiegszeit für ein 1:1-Gemisch mit Cellulose (ms) |
|---|---|
| Ammoniumdichromat, gesättigte wässrige Lösung | 20 800 |
| Calciumnitrat, gesättigte wässrige Lösung | 6 700 |
| Eisentrinitrat, gesättigte wässrige Lösung | 4 133 |
| Lithiumperchlorat, gesättigte wässrige Lösung | 1 686 |
| Magnesiumperchlorat, gesättigte wässrige Lösung | 777 |
| Nickelnitrat, gesättigte wässrige Losung | 6 250 |
| Salpetersäure, 65 % | 4 767 ([c]) |
| Perchlorsäure, 50 % | 121 ([c]) |
| Perchlorsäure, 55 % | 59 |
| Kaliumnitrat, 30 % wässrige Lösung | 26 690 |
| Silbernitrat, gesättigte wässrige Lösung | ([d]) |
| Natriumchlorat, 40 % wässrige Lösung | 2 555 ([c]) |
| Natriumnitrat, 45 % wässrige Lösung | 4 133 |
| *Inerter Stoff* | |
| Wasser: Cellulose | ([d]) |

([a]) Siehe Bezugsdokument (1) zur Klassifizierung nach den Beförderungsbestimmungen der UN.
([b]) Gesättigte Lösungen sollten bei 20 °C zubereitet werden.
([c]) Durchschnittswert aus Testreihen verschiedener Labors.
([d]) Höchstdruck von 2 070 kPa nicht erreicht.

▼B

3. **BERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

— Art der Testsubstanz, ihre Zusammensetzung, ihre Reinheit usw.,

— Konzentration der Testsubstanz,

— das für die Cellulose verwendete Trocknungsverfahren,

— den Wassergehalt der verwendeten Cellulose,

— die Messergebnisse,

— gegebenenfalls die Ergebnisse der Tests mit einem inerten Stoff,

— die errechneten durchschnittlichen Druckanstiegszeiten,

— eventuelle Abweichungen von diesem Verfahren unter Angabe der Gründe,

— sämtliche zusätzlichen Informationen oder Bemerkungen, die für die Analyse der Ergebnisse relevant sind.

3.2. ANALYSE DER ERGEBNISSE ([1])

Bei der Bewertung der Prüfergebnisse ist Folgendes zu beachten:

a) ob sich das Gemisch von Testsubstanz und Cellulose spontan entzündet, und

b) der Vergleich der durchschnittlichen Zeit, bis der Druck von 690 kPa auf 2 070 kPa gestiegen ist, mit der Druckanstiegszeit des/der Referenzstoffe(s).

Ein flüssiger Stoff wird als brandfördernd beurteilt, wenn

a) ein Gemisch des Stoffes und der Cellulose mit einem Massenverhältnis von 1:1 spontan in Brand gerät oder

b) ein Gemisch des Stoffes und der Cellulose mit einem Massenverhältnis von 1:1 eine durchschnittliche Druckanstiegszeit von höchstens der durchschnittlichen Druckanstiegszeit aufweist wie ein Gemisch 65 %iger Salpetersäure (w/w) in wässriger Lösung und Cellulose im Massenverhältnis von 1:1.

Um falsche positive Ergebnisse zu vermeiden, sollten die beim Test des Stoffes mit einem inerten Stoff erhaltenen Ergebnisse in die Analyse der Ergebnisse mit einbezogen werden.

([1]) Siehe Bezugsdokument 1 zur Analyse der Ergebnisse nach den Beförderungsbestimmungen der UN bei Verwendung verschiedener Referenzstoffe.

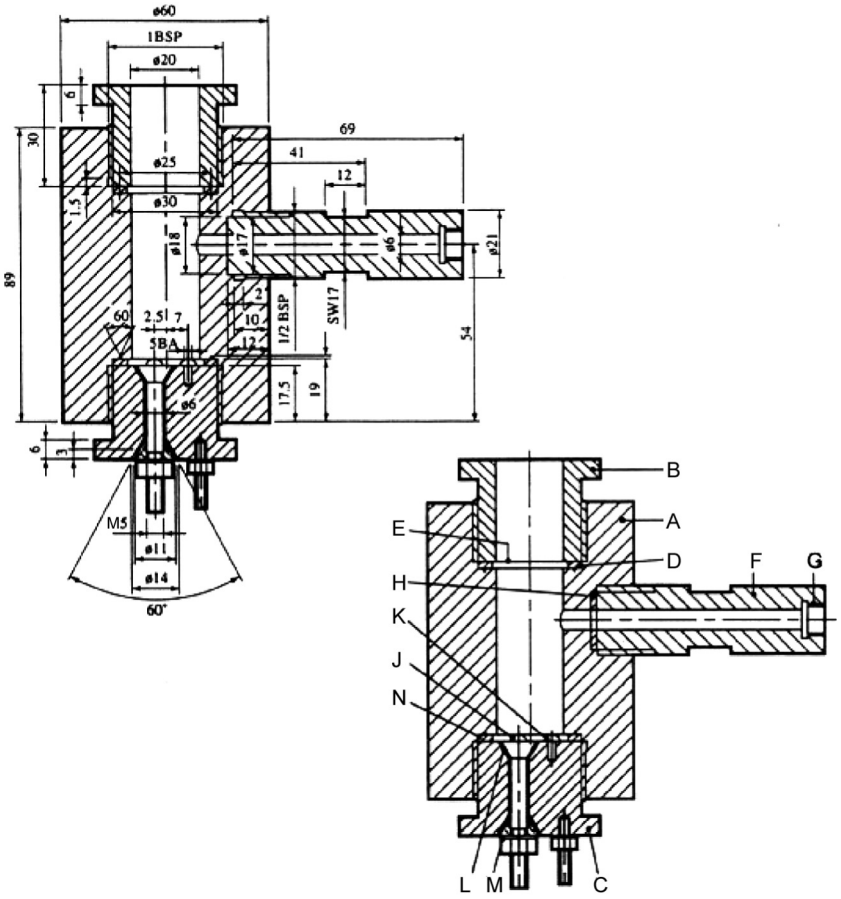
▼B

4. **BEZUGSDOKUMENTE**

(1) UN-Empfehlungen für die Beförderung gefährlicher Güter, Test- und Kriterienhandbuch, 3. geänderte Ausgabe. UN-Veröffentlichungsnummer: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, S. 342. Test O.2: Test auf oxidierende Eigenschaften für flüssige Stoffe.

*Abbildung 1*

**Druckgefäß**




(A) Druckgefäßgehäuse

(B) Berstscheibenhalterungsstopfen

(C) Zündstopfen

(D) Dichtung aus inertem Material (z.B. Weichblei)

(E) Berstscheibe

(F) Seitenarm

(G) Druckübertragerkopf

(H) Unterlegscheibe

(J) Isolierte Elektrode

(K) geerdete Elektrode

(L) Isolierung

(M) Stahlconus

(N) Dichtungsfuge

▼B

*Abbildung 2*

**Ständer**

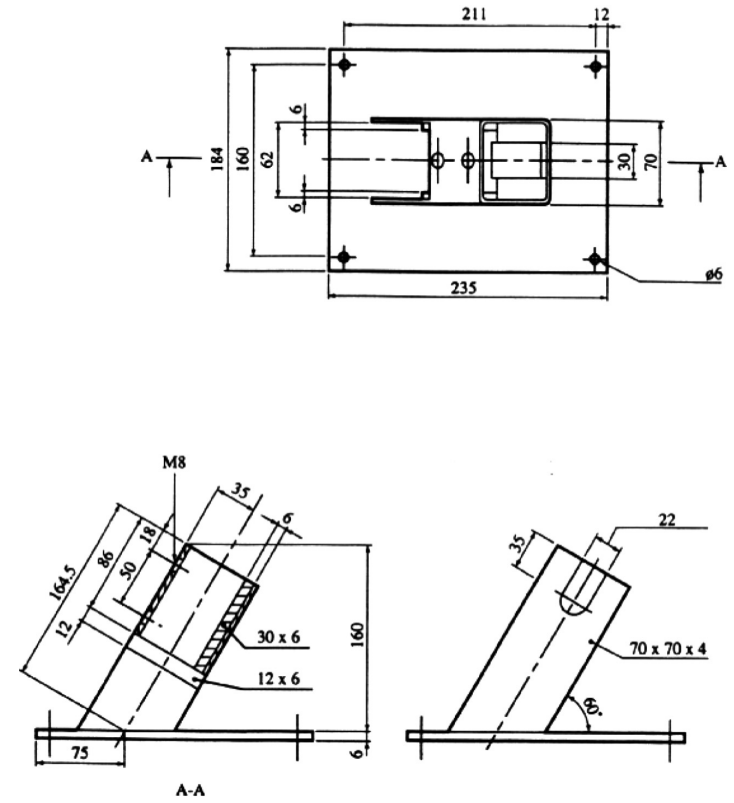
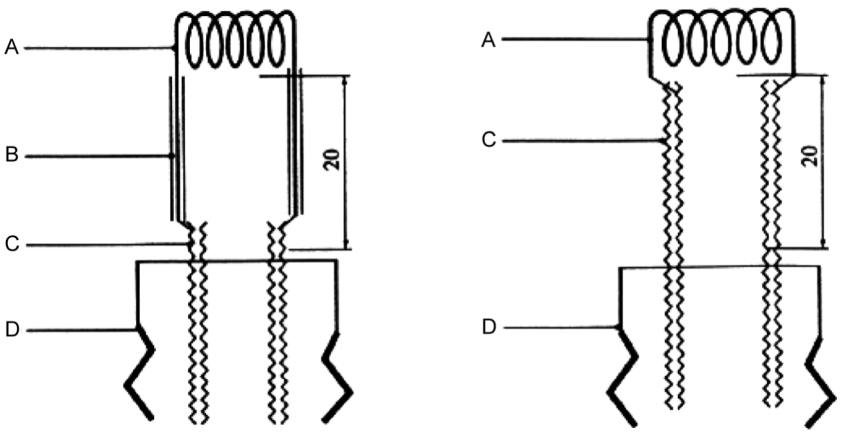



*Abbildung 3*

**Zündvorrichtung**

(A) Zündwendel (B) Isolierung (C) Elektroden (D) Zündstopfen




*Anmerkung*: Eines dieser Systeme kann verwendet werden.

▼M1

## A.22. LÄNGENGEWICHTETER MITTLERER GEOMETRISCHER DURCHMESSER VON FASERN

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Mit dieser Testmethode wird ein Verfahren zur Messung des längengewichteten mittleren geometrischen Durchmessers (GWGMD — Length Weighted Geometric Mean Diameter) von künstlichen Mineralfasern (MMMF — Man Made Mineral Fibres) beschrieben. Da der LWGMD der Population mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zwischen den 95 %-Vertrauensintervallen (LWGMD ± 2 Standardfehler) der Probe liegt, entspricht der im Bericht angegebene Wert (der Testwert) der unteren 95 %-Vertrauensgrenze der Probe (d. h. LWGMD — 2 Standardfehler). Diese Methode basiert auf einer aktualisierten Fassung (Juni 1994) des Entwurfs einer HSE-Industrieverfahrensweisung, die am 26. September 1993 in Chester zwischen ECFIA und HSE vereinbart und für und aus einem zweiten laborinternen Versuch entwickelt wurde (1, 2). Diese Messmethode kann zur Kennzeichnung des Faserdurchmessers von Schüttgutstoffen oder Produkten verwendet werden, die MMMF enthalten, z. B. feuerfeste Keramikfasern (PCF — Refractory Ceramic Fibres), künstliche Glasfasern (MMVF — Man-Made Vitreous Fibres), kristalline und polykristalline Fasern.

Die Längengewichtung dient zur Kompensation der Auswirkungen auf die Durchmesserverteilung, zu denen es durch den Bruch langer Fasern bei der Probenahme oder beim Umgang mit dem Material kommt. Die Größenverteilung der Durchmesser der MMMF wird durch geometrische statistische Verfahren (geometrisches Mittel) gemessen, da diese Durchmesser normalerweise Größenverteilungen aufweisen, die näherungsweise dem Lognormal entsprechen.

Die Messung der Länge und des Durchmessers ist ein mühsamer, zeitaufwändiger Prozess, werden jedoch nur jene Fasern gemessen, die eine unendlich dünne Linie in einem REM-Sichtfeld berühren, so ist die Wahrscheinlichkeit, eine bestimmte Faser auszuwählen, proportional zu deren Länge. Da damit die Länge in den Berechnungen der Längengewichtung berücksichtigt wird, muss lediglich der Durchmesser gewichtet werden; der LWGMD — 2SF kann dann auf die beschriebene Weise berechnet werden.

#### 1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

**Partikel**: Ein Objekt mit einem Länge-Breite-Verhältnis von weniger als 3:1.

**Faser**: Ein Objekt mit einem Länge-Breite-Verhältnis (Seitenverhältnis) von mindestens 3:1.

#### 1.3. UMFANG UND EINSCHRÄNKUNGEN

Durch diese Methode sollen die Durchmesserverteilungen untersucht werden, deren mittlerer Durchmesser zwischen 0,5 μm und 6 μm liegt. Größere Durchmesser können mithilfe geringerer REM-Vergrößerungsfaktoren gemessen werden, allerdings stößt diese Methode bei feineren Faserverteilungen zunehmend an seine Grenzen; bei mittleren Durchmessern unter 0,5 μm wird die Messung mit Transmissions-Elektronenmikroskopen (TEM) empfohlen.

▼**M1**

1.4. PRINZIP DER TESTMETHODE

Aus der Fasermatte oder aus losen Fasern wird eine bestimmte Anzahl repräsentativer Kernproben entnommen. Die Länge der losen Fasern wird durch Brechen verringert und es wird eine repräsentative Teilprobe in Wasser dispergiert. Aliquote Teile werden extrahiert und durch ein Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 0,2 μm gefiltert und zur Untersuchung unter einem Rasterelektronenmikroskop (SEM) vorbereitet. Die Faserdurchmesser werden mit einem Rastervergrößerungsfaktor von × 10 000 oder mehr ([1]) nach einem Line-Intercept-Verfahren gemessen, das eine unverfälschte Schätzung des mittleren Durchmessers ergibt. Das untere 95 %-Vertrauensintervall (auf der Basis eines einseitigen Tests) wird so berechnet, dass ein Schätzwert für den niedrigsten Wert des mittleren geometrischen Faserdurchmessers des Materials entsteht.

1.5. BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.5.1. **Sicherheits-/Vorsichtsmaßnahmen**

Die Belastung des menschlichen Organismus durch Schwebfasern ist zu minimieren; daher ist bei der Arbeit mit den trockenen Fasern ein Abzugsschrank oder eine Glove-Box zu verwenden. In periodischen Abständen ist die Belastung des menschlichen Organismus zu überwachen, um die Wirkung der Schutzverfahren zu überprüfen. Bei der Handhabung von MMMF sind Einweghandschuhe zu tragen, um Hautreizungen zu verringern und eine Querkontaminierung zu vermeiden.

1.5.2. **Geräte/Apparatur**

— Press- und Formwerkzeug (für 10 MPa).

— Polycarbonat-Kapillarporenfilter mit 0,2 μm Porengröße (Durchmesser 25 mm).

— Zelluloseestermembranfilter mit 5 μm Porengröße zur Verwendung als Zusatzfilter.

— Glasfiltervorrichtung (oder Einwegfiltersysteme) für die Aufnahme von Filtern mit 25 mm Durchmesser (z. B. Millipore-Glasmikroanalyse-Filtersatz, Typ XX10 025 00).

— Frisch destilliertes Wasser, das zur Ausfilterung von Mikroorganismen durch einen Filter mit 0,2 μm Porengröße gefiltert wurde.

— Sputter-Beschichtungsvorrichtung mit Gold- oder Gold/-Palladium-Target.

— Rasterelektronenmikroskop mit einem Auflösevermögen bis 10 nm und Vergrößerungsfaktor bis x 10 000.

— Diverses: Spatel, Skalpellmesser Typ 24, Pinzette, REM-Röhrchen, Kohlenstoffkleber oder Kohlenstoffklebeband, Kolloidalsilber („Silver dag“).

— Ultraschallsonde oder Tisch-Ultraschallbad.

— Kernbohrer oder Korkbohrer für die Entnahme von Kernproben aus MMMF-Fasermatten.

([1]) Dieser Vergrößerungsfaktor bezieht sich auf 3 μm-Fasern; bei 6 μm-Fasern ist ein Vergrößerungsfaktor von × 5 000 möglicherweise geeigneter.

▼M1

1.5.3. **Testverfahren**

1.5.3.1. *Probenahme*

Bei Fasermatten und Platten wird ein 25 mm-Kernbohrer oder Korkbohrer zur Entnahme von Proben aus dem Querschnitt verwendet. Diese Proben sind gleichmäßig über die Breite a der Schmalseite der Matte anzuordnen oder, wenn lange Abschnitte der Matte zur Verfügung stehen, aus beliebigen Stellen zu entnehmen. Die gleichen Hilfsmittel können auch für die Entnahme von Zufallsproben aus losen Fasern verwendet werden. Es sind sechs Stichproben möglichst so zu entnehmen, das räumliche Schwankungen im losen Material damit wiedergegeben werden.

Die sechs Kernproben sind in einem Stempel mit 50 mm Durchmesser unter 10 MPa zu zerkleinern. Das Material wird mit einem Spachtel durchmischt und bei 10 MPa erneut gepresst. Anschließend wird das Material aus dem Stempel entnommen und in einer verschlossenen Glasflasche gelagert.

1.5.3.2. *Vorbereitung der Probe*

Falls erforderlich, können organische Bindemittel entzogen werden, indem die Faser ca. eine Stunde lang bei 450 °C in einen Ofen eingelegt wird.

Die Probe nach dem Cone-and-Quarter-Verfahren in vier gleiche Teile unterteilen (dieser Schritt sollte in einem Staubschrank erfolgen).

Mit einem Spatel eine geringe Menge (< 0,5 g) der Probe in 100 ml frisch destilliertes Wasser geben, das durch einen 0,2 µm-Membranfilter gefiltert wurde (andere Beschaffungsquellen von hochreinem Wasser sind ebenfalls zulässig, wenn sie nachgewiesenermaßen von ausreichender Qualität sind). Die Probe mithilfe einer mit 100 W betriebenen Ultraschallsonde, die so eingestellt ist, dass eine Kavitation eintritt, gründlich dispergieren (Steht keine Sonde zur Verfügung, ist wie folgt vorzugehen: 30 Sekunden lang mehrmals schütteln und umkehren; fünfminütige Ultraschallbehandlung in einem Tisch-Ultraschallbad; dann wieder 30 Sekunden lang mehrmals schütteln und umkehren).

Sofort nach der Dispersion der Faser mehrere aliquote Teile (z. B. drei aliquote Teile mit 3, 6 und 10 ml) mit einer breiten Pipette (Aufnahmevermögen 2-5 ml) entnehmen.

Jeder aliquote Teil wird durch einen 0,2 µm-Polycarbonatfilter mit MEC-Zusatzfilter mit 5 µm-Poren unter Verwendung eines 25-mm-Glasfiltertrichters mit zylindrischem Vorratsbehälter vakuumgefiltert. Rund 5 ml des gefilterten destillierten Wassers wird in den Trichter gegeben und den aliquoten Teil langsam in das Wasser gegeben, wobei die Pipettenspitze unterhalb des Meniskus gehalten wird. Pipette und Vorratsbehälter müssen nach dem Pipettieren gründlich gespült werden, da dünne Fasern dazu neigen, sich eher an der Oberfläche anzusammeln.

Filter vorsichtig entnehmen und vom Zusatzfilter trennen, bevor er zum Trocknen in einen Behälter eingelegt wird.

▼M1

Einen Viertel- oder halben Filterquerschnitt der Filterrückstände mit ruckartigen Bewegungen mit einem Skalpell Typ 24 ausschneiden. Den ausgeschnittenen Querschnitt mit Kohlenstoffklebeband oder Kohlenstoffkleber vorsichtig auf dem Träger („Stub“) des REM befestigen. An mindestens drei Stellen ist Kolloidalsilber zur Verbesserung des elektrischen Kontakts der Filterränder und des „Stub“ aufzubringen. Wenn der Klebstoff bzw. das Kolloidalsilber getrocknet ist, durch Sputter-Beschichtung ca. 50 nm Gold oder Gold/-Palladium auf die Oberfläche des Filterrückstands aufbringen.

1.5.3.3. *Kalibrierung und Betrieb des REM*

1.5.3.3.1. K a l i b r i e r u n g

Die Kalibrierung des REM ist mindestens einmal wöchentlich (idealerweise täglich) anhand eines freigegebenen Kalibriergitters zu kontrollieren. Die Kalibrierung ist anhand eines freigegebenen Normals zu kontrollieren; stimmt der Messwert (REM) nicht auf ± 2 % mit dem zertifizierten Wert überein, muss die Kalibrierung des REM nachjustiert und erneut kontrolliert werden.

Das REM muss bei Verwendung einer Probenmatrix mindestens die Auflösung eines sichtbaren Mindestdurchmessers von 0,2 μm bei einem Vergrößerungsfaktor × 2 000 ermöglichen.

1.5.3.3.2. B e t r i e b

Das REM ist mit einem Vergrößerungsfaktor von 10 000 ([1]) unter Bedingungen zu betrieben, die eine gute Auflösung und eine akzeptable Bildqualität bei geringer Abtastgeschwindigkeit von beispielsweise 5 Sekunden je Aufnahme ergeben. Da die Betriebsvoraussetzungen unterschiedlicher REM sich voneinander unterscheiden können, sind bei Materialien mit relativ geringer Atommasse Beschleunigungsspannungen von 5-10 keV zu verwenden, um eine möglichst gute Sichtbarkeit und Auflösung zu erreichen; dabei ist eine geringe Punktgröße und ein kurzer Arbeitsabstand einzustellen. Wird ein Linear-Trverse-Verfahren angewandt, ist eine Neigung von 0° zu verwenden, um Refokussierung auf ein Minimum zu beschränken; weist das REM eine euzentrische Stufe auf, ist der euzentrische Arbeitsabstand zu verwenden. Ein geringerer Vergrößerungsfaktor kann verwendet werden, wenn das Material keine kleinen Fasern (mit geringem Durchmesser) enthält und große Faserdurchmesser (> 5 μm) vorliegen.

1.5.3.4. *Größenbestimmung*

1.5.3.4.1. B e w e r t u n g d e r P r o b e b e i g e r i n g e r V e r g r ö ß e r u n g

Zunächst ist die Probe mit einem geringen Vergrößerungsfaktor auf Anzeichen von Klumpenbildung größerer Fasern zu untersuchen und die Faserndichte zu ermitteln. Bei übermäßiger Klumpenbildung wird empfohlen, eine neue Probe herzustellen.

Aus Gründen der statistischen Genauigkeit muss eine bestimmte Mindestzahl Fasern gemessen werden, eine hohe Faserndichte ist dabei erstrebenswert, da die Untersuchung leerer Felder zeitaufwändig ist und keinen Beitrag zum Analyseergebnis liefert. Ist der Filter jedoch überladen, ist die Messung aller messbaren Fasern erschwert und es besteht die Gefahr, dass kleinere Fasern durch größere Fasern überdeckt und dadurch übersehen werden.

([1]) Siehe vorherige Fußnote zu 3 μm-Fasern.

▼M1

Eine Verfälschung in Richtung einer zu hoch geschätzten LWGMD kann dann eintreten, wenn Faserdichten von mehr als 150 Fasern je Millimeter Linear-Traverse vorliegen. Durch geringe Faserkonzentrationen nimmt andererseits die Dauer der Analyse zu, weshalb es oft kostengünstiger ist, eine Probe herzustellen, deren Faserdichte näher am Optimum liegt, statt ständig die Faserzahlen in Filtern geringer Konzentrationen zu zählen. Die optimale Faserdichte soll durchschnittlich ca. 1 oder 2 zählbare Fasern je Sichtfeld bei einer 5000-fachen Vergrößerung ergeben. Allerdings ist die optimale Dichte von der Größe (Durchmesser) der Fasern abhängig, also muss der Bediener mit entsprechendem Sachverstand entscheiden, ob die Faserdichte dem Optimum nahekommt oder nicht.

1.5.3.4.2. Längengewichtung der Faserdurchmesser

Es werden nur diejenigen Fasern gezählt, die eine (unendlich) dünne Linie auf dem Raster des REM berühren (oder kreuzen). Hierzu wird eine waagerechte (oder vertikale) Linie durch die Rastermitte gezogen.

Alternativ dazu wird ein einzelner Punkt in der Mitte des Rasters angeordnet und ein kontinuierlicher Abtastvorgang in einer Richtung über den Filter hinweg gestartet. Der Durchmesser jeder Faser mit einem Seitenverhältnis von mehr als 3:1, die diesen Punkt berührt oder kreuzt, wird gemessen und aufgezeichnet.

1.5.3.4.3. Bestimmung der Fasergröße

Es wird empfohlen, mindestens 300 Fasern zu messen. Jede Faser wird nur ein einziges Mal am Schnittpunkt mit der auf dem Bild gezeichneten Linie oder Punkt (oder nahe dem Schnittpunkt, wenn die Faserkanten verdeckt sind) gemessen. Werden Fasern mit uneinheitlichen Querschnitten festgestellt, ist eine Messung am durchschnittlichen Faserdurchmesser zugrundezulegen. Bei der Festlegung des Randes und der Messung des geringsten Abstands zwischen den Faserrändern ist vorsichtig vorzugehen. Die Größenbestimmung kann online oder offline an gespeicherten Bildern oder Fotoaufnahmen erfolgen. Die Verwendung von halbautomatischen Bildmesssystemen, bei denen die Daten direkt in eine Tabellenkalkulation geladen werden, ist zu empfehlen, da diese Verfahren Zeit sparen, Abschriftfehler vermeiden und eine automatische Berechnung ermöglichen.

Die Enden langer Fasern sind bei geringer Vergrößerung zu prüfen, damit sichergestellt ist, dass sie sich nicht in den Sichtbereich des Messfeldes rollen und nur einmal gemessen werden.

2. **DATEN**

2.1. BEHANDLUNG DER ERGEBNISSE

Die Faserdurchmesser weisen normalerweise keine Normalverteilung auf. Mit Hilfe einer Log-Transformation kann jedoch eine Verteilung ermittelt werden, die näherungsweise der Normalverteilung entspricht.

Das arithmetische Mittel (mittlerer lnD) und die Standardabweichung ($SD_{lnD}$) der lnD-Werte (log to base e) der n Faserdurchmesser (D) wird berechnet.

$$\text{mittl. lnD} = \frac{\Sigma \text{lnD}}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\Sigma(lnD - \text{mittl. } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Die Standardabweichung wird durch die Quadratwurzel der Anzahl Messungen (n) dividiert und daraus der Standardfehler ($SE_{lnD}$) ermittelt.

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Das Zweifache des Standardfehlers wird vom Mittelwert abgezogen und der Exponentialwert dieses Wertes (Mittelwert minus dem Zweifachen des Standardfehlers) berechnet; dies ergibt den geometrischen Mittelwert minus zwei geometrischen Standardfehlern.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mittl. } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **BERICHTSERSTELLUNG**

TESTBERICHT

Der Testbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

— den Wert für LWGMD-2SE,

— etwaige Abweichungen, vor allem jene, die sich auf Präzision oder Genauigkeit der Ergebnisse auswirken (mit entsprechenden Begründungen).

4. **LITERATUR**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett und G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/-07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division, 1994.

▼M4

## A.23 1-OCTANOL/WASSER-VERTEILUNGSKOEFFIZIENT: METHODE ZUR PRÜFUNG UNTER LANGSAMEM RÜHREN

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 123 (2006). Die $P_{OW}$-Werte ($P_{OW}$ = 1-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient) konnten mit der Methode zur Prüfung unter langsamem Rühren bis zu log $P_{OW}$ 8,2 genau bestimmt werden (1). Entsprechend kommt diese Methode für die direkte Bestimmung der $P_{OW}$-Werte stark hydrophober Substanzen in Betracht.

2. Weitere Methoden zur Bestimmung des 1-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($P_{OW}$) sind die „Schüttelmethode“ (2) und die Bestimmung des $P_{OW}$ aufgrund des Retentionsverhaltens bei der HPLC mit Phasenumkehr (3). Die „Schüttelmethode“ ist wegen der Übertragung von Octanol-Mikrotröpfchen in die wässrige Phase jedoch fehleranfällig. Mit steigenden $P_{OW}$-Werten führt das Vorhandensein dieser Tröpfchen in der wässrigen Phase zu einer zunehmenden Überschätzung der Konzentration der Prüfsubstanz im Wasser. Daher ist diese Methode nur bei Substanzen mit log $P_{OW} < 4$ geeignet. Die zweite Methode beruht auf direkt bestimmten $P_{OW}$-Werten, die zur Kalibrierung der Beziehung zwischen dem Retentionsverhalten in der HPLC und den gemessenen $P_{OW}$-Werten verwendet werden. Es gab einen Entwurf einer OECD-Richtlinie zur Bestimmung des 1-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ionisierbarer Substanzen (4), der aber nicht mehr verwendet werden soll.

3. Diese Prüfmethode wurde in den Niederlanden entwickelt. Die Genauigkeit der in dieser Prüfmethode beschriebenen Verfahren wurde in einer Ringtest-Validierungsstudie unter Beteiligung von 15 Labors validiert und optimiert (5).

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

**Bedeutung und Anwendung**

4. Bei inerten organischen Substanzen wurden hoch signifikante Beziehungen zwischen den 1-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ($P_{OW}$) und der jeweiligen Bioakkumulation in Fischen festgestellt. Außerdem wurde eine Korrelation zwischen den $P_{OW}$-Werten und der Toxizität für Fische sowie zwischen den $P_{OW}$-Werten und der Sorption chemischer Stoffe in Feststoffen wie z. B. in Böden und in Sedimenten nachgewiesen. Das Literaturverzeichnis enthält eine umfassende Übersicht über die verschiedenen Zusammenhänge (6).

5. Zwischen dem 1-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten und sonstigen für die Umwelttoxizität und für das chemische Verhalten erheblichen Merkmalen von Substanzen wurden vielfältige Beziehungen festgestellt. Entsprechend hat sich der 1-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient zum Schlüsselparameter für die Bewertung des mit chemischen Stoffen verbundenen Umweltrisikos sowie zur Prognose der Persistenz chemischer Stoffe in der Umwelt entwickelt.

**Anwendungsbereich**

6. Bei der Methode zur Prüfung unter langsamem Rühren soll die Bildung von 1-Octanol-Mikrotröpfchen in der wässrigen Phase verringert werden. Entsprechend ist ausgeschlossen, dass die Konzentration in der wässrigen Phase wegen der ansonsten mit diesen Tröpfchen verbundenen Moleküle der Prüfsubstanz überschätzt wird. Daher eignet sich die Methode zur Prüfung unter langsamem Rühren insbesondere zur Bestimmung der $P_{OW}$-Werte von Substanzen, bei denen log $P_{OW}$-Werte im Bereich von mindestens 5 zu erwarten sind und bei denen die Schüttelmethode (2) eher fehleranfällig wäre.

▼M4

DEFINITIONEN UND EINHEITEN

7. Der Verteilungskoeffizient einer Substanz für Wasser und ein lipophiles Lösungsmittel (1-Octanol) beschreibt die Gleichgewichtsverteilung des jeweiligen chemischen Stoffs zwischen den beiden Phasen. Der Verteilungskoeffizient für Wasser und 1-Octanol ($P_{OW}$) wird definiert als Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen der Prüfsubstanz in mit Wasser gesättigtem 1-Octanol ($C_O$) und in mit 1-Octanol gesättigtem Wasser ($C_W$).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Für das Konzentrationsverhältnis wird keine Einheit angegeben. Meist wird das Verhältnis als Zehnerlogarithmus (log $P_{OW}$) ausgedrückt. $P_{OW}$ ist temperaturabhängig; entsprechend sollte die Messtemperatur berücksichtigt werden.

PRINZIP DER METHODE

8. Um den Verteilungskoeffizienten zu bestimmen, werden Wasser, 1-Octanol und die Prüfsubstanz bei einer konstanten Temperatur in ein Gleichgewicht gebracht. Anschließend werden die Konzentrationen der Prüfsubstanz in den beiden Phasen bestimmt.

9. Die bei der Prüfung mit der Schüttelmethode auftretenden Schwierigkeiten infolge der Entstehung von Mikrotröpfchen können mit der hier vorgeschlagenen Methode unter langsamem Rühren verringert werden. Bei der Prüfung unter langsamem Rühren werden Wasser, 1-Octanol und die Prüfsubstanz in einem thermostatgeregelten Rührbehälter in ein Gleichgewicht gebracht. Durch das Rühren wird der Austausch zwischen den Phasen beschleunigt. Beim Rühren entstehen begrenzte Turbulenzen, welche den Austausch zwischen 1-Octanol und Wasser begünstigen, ohne dass Mikrotröpfchen entstehen können (1).

ANWENDBARKEIT DER PRÜFMETHODE

10. Da sich das Vorhandensein anderer Substanzen auf den Aktivitätskoeffizienten der Prüfsubstanz auswirken kann, sollte die Prüfsubstanz als reine Substanz untersucht werden. Daher sollte die jeweilige Substanz für die Messung der 1-Octanol/Wasser-Verteilung in der höchsten auf dem Markt verfügbaren Reinheit verwendet werden.

11. Diese Methode ist anzuwenden bei reinen Substanzen, bei denen weder eine Dissoziation noch eine Assoziation erfolgt und die keine erhebliche Grenzflächenaktivität aufweisen. Die Methode kann zur Bestimmung der 1-Octanol/Wasser-Verteilung dieser Substanzen und von Gemischen eingesetzt werden. Wenn die Methode für Gemische eingesetzt wird, hängt die 1-Octanol/Wasser-Verteilung von der chemischen Zusammensetzung des zu prüfenden Gemischs sowie von der Zusammensetzung des als wässrige Phase genutzten Elektrolyten ab. Wenn die Methode um verschiedene Schritte ergänzt wird, kann sie auch für dissoziierende und assoziierende Verbindungen eingesetzt werden (siehe Nummer 12).

12. Aufgrund der unterschiedlichen Gleichgewichte in Wasser und 1-Octanol, die sich bei der 1-Octanol-/Wasser-Verteilung dissoziierender Substanzen wie z. B. organischer Säuren und Phenole, organischer Basen und organometallischer Substanzen ergeben, ist das Verteilungsverhältnis für 1-Octanol/Wasser ebenfalls in hohem Maße von der Zusammensetzung des Elektrolyten abhängig (7)(8). Die Bestimmung des Verteilungsverhältnisses für 1-Octanol/Wasser setzt voraus, dass pH-Wert und Elektrolytzusammensetzung während der Messung überwacht und protokolliert werden. Die Bewertung der Verteilungsverhältnisse muss durch Fachleute erfolgen. Unter Berücksichtigung der Dissoziationskonstante(n) müssen geeignete pH-Werte so ausgewählt werden, dass für jedes Ionisierungsstadium ein Verteilungsverhältnis bestimmt werden kann. Zur Prüfung organometallischer Verbindungen müssen Pufferlösungen eingesetzt werden, die nicht als Komplexbildner wirken (8). Unter Berücksichtigung des aktuellen Kenntnisstandes bezüglich der Chemie der wässrigen Phase (Komplexbildungskonstanten, Dissoziationskonstanten) sollten die Versuchsbedingungen so gewählt werden, dass die Speziation der Prüfsubstanz in der wässrigen Phase bestimmt werden kann. Die Ionenkonzentration sollte in allen Prüfungen gleich sein; um dies zu gewährleisten, sollte ein Hintergrundelektrolyt eingesetzt werden.

▼M4

13. Schwierigkeiten können sich bei der Prüfung in Verbindung mit der Untersuchung von Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit oder mit hohem $P_{OW}$ ergeben, weil die Konzentrationen im Wasser sehr gering werden und eine genaue Bestimmung entsprechend problematisch ist. Diese Prüfmethode erläutert, wie diesem Problem begegnet werden kann.

INFORMATIONEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

14. Die chemischen Reagenzien sollten mindestens Analysequalität besitzen. Es wird empfohlen, nicht markierte Prüfsubstanzen mit bekannter chemischer Zusammensetzung und einer Reinheit von mindestens 99 % oder radioaktiv markierte Prüfsubstanzen mit bekannter chemischer Zusammensetzung und radiochemischer Reinheit einzusetzen. Beim Einsatz von Indikatorsubstanzen mit kurzer Halbwertszeit sollten Korrekturen unter Berücksichtigung des Zerfallsverhaltens vorgenommen werden. Wenn die Prüfsubstanzen radioaktiv markiert wurden, sollte eine speziell für den jeweiligen chemischen Stoff vorgesehene Analysemethode eingesetzt werden, um sicherzustellen, dass die gemessene Radioaktivität unmittelbar auf die Prüfsubstanz zurückzuführen ist.

15. Log $P_{OW}$ kann mit einer im Handel erhältlichen und für diesen Zweck vorgesehenen Software geschätzt werden; alternativ kann die Schätzung auch aufgrund des Verhältnisses der Löslichkeiten in beiden Lösungsmitteln erfolgen.

16. Bevor $P_{OW}$ durch eine Prüfung unter langsamem Rühren bestimmt wird, sollten die folgenden Informationen zur Prüfsubstanz bekannt sein:

a) die Strukturformel,

b) geeignete Analysemethoden zur Bestimmung der Konzentration der Substanz in Wasser und in 1-Octanol,

c) die Dissoziationskonstante(n) ionisierbarer Substanzen (OECD-Richtlinie 112) (9),

d) die Wasserlöslichkeit (10),

e) Informationen zur abiotischen Hydrolyse (11),

f) die leichte biologische Abbaubarkeit (12),

g) der Dampfdruck (13).

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Geräte und Apparatur**

17. Für die Prüfungen werden Standardlaborgeräte benötigt; insbesondere sind folgende Geräte erforderlich:

— Magnetrührer sowie Magnetrührstäbe mit Teflonbeschichtung zum Umrühren der wässrigen Phase,

— geeignete Analyseinstrumente zur Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz in den erwarteten Konzentrationen,

— Rührgefäße mit einem Absperrhahn unten am Gefäß. Abhängig vom geschätzten Wert für log $P_{OW}$ und von der Nachweisgrenze (LOD) der zu prüfenden Verbindung ist der Einsatz eines Reaktionsbehälters mit identischer Geometrie, aber mit einem Volumen von mehr als einem Liter in Betracht zu ziehen, damit hinreichend Wasser für die chemische Extraktion und für die durchzuführende Analyse entnommen werden kann. Dies führt zu höheren Konzentrationen im Wasserextrakt und ermöglicht entsprechend zuverlässigere Analysen. Anlage 1 enthält eine Tabelle mit Schätzwerten für die erforderlichen Mindestvolumina, der Nachweisgrenze der Verbindung, dem geschätzten log $P_{OW}$ und der Löslichkeit in Wasser. Die Tabelle beruht auf der Beziehung zwischen log $P_{OW}$ und dem Verhältnis zwischen der Löslichkeit in Octanol und in Wasser gemäß Pinsuwan u. a. (14):

$$\text{Log } P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

Dabei ist

$SR = S_{oct}/S_w$ (Molarität)

sowie auf der von Lyman (15) definierten Beziehung für die Prognose der Löslichkeit in Wasser. Die mit der in Anlage 1 genannten Formel bestimmten Wasserlöslichkeiten sind als erste Schätzung zu betrachten. Der Prüfende kann die Wasserlöslichkeit auch aufgrund einer sonstigen Beziehung schätzen, die er für besser geeignet hält, Auskunft über die Beziehung zwischen Hydrophobizität und Löslichkeit zu geben. Bei festen Verbindungen wird z. B. die Berücksichtigung des Schmelzpunktes bei der Prognose der Löslichkeit empfohlen. Wenn eine modifizierte Formel verwendet wird, sollte sichergestellt werden, dass die Gleichung zur Berechnung der Löslichkeit in Octanol noch gültig ist. In Anlage 2 ist ein Rührgefäß mit Glasmantel und einem Inhalt von etwa einem Liter dargestellt. Die Proportionen des in Anlage 2 dargestellten Gefäßes haben sich als günstig erwiesen und sollten auch dann beibehalten werden, wenn eine anders dimensionierte Apparatur verwendet wird,

— entscheidend ist eine Vorrichtung, mit der während der Prüfung unter langsamem Rühren eine konstante Temperatur aufrechterhalten werden kann.

18. Die Gefäße sollten aus einem inerten Material bestehen, damit die Adsorption durch die Oberfläche der Gefäße vernachlässigt werden kann.

**Herstellung der Prüflösungen**

19. Der Wert für $P_{OW}$ sollte mit 1-Octanol der höchsten im Handel erhältlichen Reinheit (mindestens + 99 %) bestimmt werden. Die Reinigung von 1-Octanol durch die Extraktion mit einer Säure, einer Base und Wasser und eine anschließende Trocknung werden empfohlen. Außerdem kann 1-Octanol auch durch Destillation gereinigt werden. Zur Herstellung der Standardlösungen der Prüfsubstanzen ist gereinigtes 1-Octanol zu verwenden. Das für die Bestimmung von $P_{OW}$ zu verwendende Wasser sollte durch Glas oder Quarz destilliert oder mit einem Reinigungssystem hergestellt worden sein; alternativ kann auch HPLC-Wasser verwendet werden. Destilliertes Wasser sollte durch ein 0,22-µm-Filter gefiltert werden; mit Blindproben sollte sichergestellt werden, dass die konzentrierten Extrakte keine Verunreinigungen enthalten, welche die Prüfsubstanz verändern könnten. Wenn ein Glasfaserfilter verwendet wird, sollte das Filter durch mindestens dreistündige Erhitzung auf 400 °C gereinigt werden.

20. Beide Lösungsmittel werden vor Durchführung der Prüfung wechselseitig gesättigt, indem sie in einem hinreichend großen Gefäß in ein Gleichgewicht gebracht werden. Dazu wird das aus zwei Phasen bestehende System zwei Tage lang langsam gerührt.

21. Eine geeignete Konzentration der Prüfsubstanz wird ausgewählt und in 1-Octanol (mit Wasser gesättigt) gelöst. Der 1-Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ist in verdünnten Lösungen mit 1-Octanol und Wasser zu bestimmen. Daher sollte die Konzentration der Prüfsubstanz höchstens 70 % ihrer Löslichkeit bei einer Höchstkonzentration von 0,1 M in beiden Phasen betragen (1). Die für die Prüfungen verwendeten 1-Octanol-Lösungen dürfen keine suspendierten Feststoffe aus der Prüfsubstanz enthalten.

22. Eine geeignete Menge der Prüfsubstanz wird in 1-Octanol (mit Wasser gesättigt) gelöst. Wenn die Schätzung für log $P_{OW}$ einen Wert über fünf ergibt, ist besonders darauf zu achten, dass die für die Prüfung verwendeten 1-Octanol-Lösungen keine suspendierten Feststoffe aus der Prüfsubstanz enthalten. Dazu ist bei chemischen Stoffen mit einem geschätzten log $P_{OW} > 5$ wie folgt zu verfahren:

— Die Prüfsubstanz wird in 1-Octanol (mit Wasser gesättigt) gelöst.

▼M4

— Es wird hinreichend Zeit gelassen, damit sich suspendierte Feststoffe absetzen können. Während des Absetzens wird die Konzentration der Prüfsubstanz überwacht.

— Nachdem sich die gemessenen Konzentrationen der 1-Octanol-Lösung stabilisiert haben, wird die Stammlösung mit einer geeigneten Menge 1-Octanol verdünnt.

— Anschließend wird die Konzentration der verdünnten Stammlösung gemessen. Wenn die gemessene Konzentration mit der Verdünnung übereinstimmt, kann die verdünnte Stammlösung zur Prüfung unter langsamem Rühren verwendet werden.

**Extraktion und Analyse der Proben**

23. Für die Untersuchung der Prüfsubstanz sollte eine validierte Analysemethode verwendet werden. Der Prüfende muss nachweisen, dass die Konzentrationen in dem mit Wasser gesättigten 1-Octanol sowie in der mit 1-Octanol gesättigten wässrigen Phase während der Prüfung über der bei dem eingesetzten Analyseverfahren für die Methode festgesetzten Quantifizierungsgrenze liegen. In Fällen, in denen Extraktionsmethoden erforderlich sind, muss die analytische Wiederfindung der Prüfsubstanzen aus der wässrigen Phase und aus der 1-Octanol-Phase vor der Prüfung erfolgen. Die Anforderungen an die Analysesignale sind aufgrund von Blindwerten zu korrigieren; dabei ist darauf zu achten, dass keine Analytübertragungen zwischen den Proben vorkommen können.

24. Bei hydrophoben Prüfsubstanzen sind wegen der eher niedrigen Konzentrationen der Prüfsubstanzen in der wässrigen Phase vor der Analyse wahrscheinlich eine Extraktion der wässrigen Phase mit einem organischen Lösungsmittel und eine Vorkonzentration des Extrakts vorzunehmen. Aus demselben Grund müssen die eventuell verwendeten Blindprobenkonzentrationen reduziert werden. Dazu sind hochreine und vorzugsweise für Rückstandsanalysen vorgesehene Lösungsmittel zu verwenden. Die Verwendung sorgfältig vorgereinigter Glasgeräte (z. B. durch Spülen mit einem Lösungsmittel oder unter starker Erwärmung) kann zusätzlich helfen, Kreuzkontamination zu vermeiden.

25. Log $P_{OW}$ kann mit einem geeigneten Programm ermittelt oder von Fachleuten mit entsprechender Erfahrung geschätzt werden. Bei Werten über 6 müssen Blindwert-Korrekturen und Analyteintragungen sorgfältig überwacht werden. Wenn der geschätzte Wert für log $P_{OW}$ über 6 liegt, muss ein Surrogatstandard für die Wiederfindungskorrektur verwendet werden, damit die erforderlichen hohen Vorkonzentrationsfaktoren erreicht werden können. Auf dem Markt werden verschiedene Computer-Programme zur Schätzung von log $P_{OW}$ angeboten ([1]) (z. B. Clog P(16), KOWWIN(17), ProLogP(18) und ACD log P(19)). Das Literaturverzeichnis enthält Beschreibungen der verschiedenen Schätzverfahren (20-22).

26. Die Quantifizierungsgrenzen (LOQ) für die Bestimmung der Prüfsubstanz in 1-Octanol und Wasser werden mit anerkannten Methoden bestimmt. Als Faustregel kann die Konzentration in Wasser oder 1-Octanol, bei der sich ein Signal-/Rauschverhältnis von 10 ergibt, als Quantifizierungsgrenze für die betreffende Methode angenommen werden. Entsprechend sollten eine geeignete Methode zur Extraktion und zur Vorkonzentration ausgewählt und Verfahren für die analytische Wiederfindung spezifiziert werden. Der Vorkonzentrationsfaktor ist so auszuwählen, dass sich bei der Analyse ein Signal der geforderten Stärke ergibt.

([1]) Die Angaben dienen nur zur Information. Wenn mit anderen Programmen nachweislich dieselben Ergebnisse ermittelt werden, können auch diese Programme verwendet werden.

▼M4

27. Ausgehend von den Parametern der Analysemethode und von den erwarteten Konzentrationen wird die Probengröße bestimmt, die für eine genaue Bestimmung der Konzentration der jeweiligen Verbindung ungefähr erforderlich ist. Wasserproben, die so klein sind, dass kein hinreichendes Analysesignal festgestellt werden kann, sollten nicht verwendet werden. Ebenso sollte die Verwendung zu großer Wasserproben vermieden werden, weil ansonsten möglicherweise zu wenig Wasser für die erforderlichen Analysen (n = 5) verbleibt. In Anlage 1 wird das Proben-Mindestvolumen abhängig vom Gefäßvolumen, von der Nachweisgrenze der Prüfsubstanz und von der Löslichkeit der Prüfsubstanz angegeben.

28. Die Quantifizierung der Prüfsubstanzen erfolgt durch den Vergleich mit Kalibrierungskurven der entsprechenden Verbindung. Die Konzentrationen in den analysierten Proben müssen innerhalb der Bandbreite der Standardkonzentrationen liegen.

29. Bei Prüfsubstanzen mit log $P_{OW}$-Werten über 6 muss der Wasserprobe vor der Extraktion ein Surrogatstandard zugesetzt werden, um die bei der Extraktion und bei der Vorkonzentration der Wasserprobe auftretenden Verluste zu erfassen. Für exakte Wiederfindungskorrekturen müssen die Surrogate Merkmale aufweisen, die denen der Prüfsubstanz möglichst ähnlich sind oder vollständig mit deren Merkmalen übereinstimmen. Dazu werden vorzugsweise mit einem (stabilen) Isotop markierte, den Prüfsubstanzen analoge Verbindungen verwendet (z. B. deuterierte oder mit $^{13}C$ markierte Verbindungen). Wenn mit einem stabilen Isotop (d. h. mit $^{13}C$ oder $^{2}H$) markierte Verbindungen nicht verwendet werden können, sollte anhand zuverlässiger Daten in der Fachliteratur nachgewiesen werden, dass die physikalisch-chemischen Merkmale der Surrogate den Merkmalen der Prüfsubstanzen sehr nahekommen. Bei der Flüssig-flüssig-Extraktion der wässrigen Phase können Emulsionen entstehen. Diese Emulsionen können durch die Zugabe von Salz und Ausfällen der Emulsion über Nacht verringert werden. Die Methoden zur Extraktion und zur Vorkonzentration der Proben sind zu protokollieren.

30. Aus der 1-Octanol-Phase gezogene Proben können vor der Analyse erforderlichenfalls mit einem geeigneten Lösungsmittel verdünnt werden. Die Verwendung von Surrogatstandards zur Wiederfindungskorrektur wird für Substanzen empfohlen, bei denen in Wiederfindungsprüfungen starke Schwankungen zu verzeichnen waren (relative Standardabweichung > 10 %).

31. Die Analysemethode ist detailliert zu protokollieren. Zu erfassen sind unter anderem die Extraktionsmethode, Vorkonzentrations- und Verdünnungsfaktoren, Geräteparameter, die Kalibrierungsroutine, der Kalibrierungsbereich, Angaben zur analytischen Wiederfindung der Prüfsubstanzen aus dem Wasser, Zugaben von Surrogatstandards zur Wiederfindungskorrektur, Blindwerte, Nachweisgrenzen und Quantifizierungsgrenzen.

**Durchführung der Prüfung**

*Optimale 1-Octanol-/Wasser-Verhältnisse*

32. Bei der Auswahl der Volumina von Wasser und 1-Octanol sollten die folgenden Punkte berücksichtigt werden: die Quantifizierungsgrenze (LOQ) in 1-Octanol und Wasser, die Vorkonzentrationsfaktoren der Wasserproben, das Volumen der aus 1-Octanol und aus Wasser genommenen Proben und die zu erwartenden Konzentrationen. Aus durchführungspraktischen Gründen sollte das 1-Octanol-Volumen bei dem System zur Prüfung unter langsamem Rühren so gewählt werden, dass die 1-Octanol-Schicht hinreichend stark (> 0,5 cm) ist, damit die Proben ohne Beeinträchtigung aus der 1-Octanol-Phase entnommen werden können.

33. Typische Phasenverhältnisse für die Bestimmung von Verbindungen mit log $P_{OW}$-Werten von mindestens 4,5 sind 20 bis 50 ml 1-Octanol und 950 bis 980 ml Wasser in einem 1-l-Gefäß.

▼M4

*Prüfbedingungen*

34. Während der Prüfung wird das Reaktionsgefäß mit einem Thermostaten so geregelt, dass die Temperaturschwankungen unter 1 °C liegen. Die Untersuchung sollte bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt werden.

35. Das Prüfsystem sollte vor Tageslichteinfall geschützt werden, indem die Prüfungen entweder im Dunkeln durchgeführt werden oder das Reaktionsgefäß mit einer Aluminiumfolie bedeckt wird.

36. Außerdem sollte die Prüfung in (möglichst) staubfreier Umgebung erfolgen.

37. Das 1-Octanol-Wasser-System wird gerührt, bis das erforderliche Gleichgewicht hergestellt ist. In einem Pilottest unter langsamem Rühren bei regelmäßiger Entnahme von Proben aus der wässrigen Phase und aus der 1-Octanol-Phase wird die Zeitspanne bis zur Herstellung des Gleichgewichts ermittelt. Zwischen den verschiedenen Probenahmen sollten jeweils mindestens 5 Stunden liegen.

38. Die $P_{OW}$-Werte sind in mindestens drei unabhängig voneinander durchzuführenden Prüfungen unter langsamem Rühren zu bestimmen.

*Bestimmung der zur Herstellung des Gleichgewichts erforderlichen Zeitspanne*

39. Es wird angenommen, dass das Gleichgewicht dann erreicht ist, wenn das Konzentrationsverhältnis für 1-Octanol und Wasser in einem Zeitraum mit vier Messzeitpunkten bei einem p-Wert von 0,05 so weit zurückgegangen ist, dass der Endwert nicht mehr signifikant von 0 abweicht. Die Zeitspanne zur Herstellung des Gleichgewichts beträgt mindestens einen Tag. Erst dann kann mit der Probenahme begonnen werden. Als Faustregel kann davon ausgegangen werden, dass bei Substanzen, bei denen log $P_{OW}$ auf unter 5 geschätzt wird, die Probenahme am zweiten und am dritten Tag erfolgen kann. Bei stärker hydrophoben Verbindungen dauert die Herstellung des Gleichgewichts unter Umständen länger. Bei einer Verbindung mit log $P_{OW}$ 8,23 (Decachlorbiphenyl) wurde das Gleichgewicht nach 144 Stunden erreicht. Ob das Gleichgewicht hergestellt ist, wird anhand mehrfacher Probenahmen aus einem einzigen Gefäß beurteilt.

*Beginn der Prüfung*

40. Zu Beginn der Prüfung wird das Reaktionsgefäß Wasser befüllt, das mit 1-Octanol gesättigt wurde. Dabei sollte genügend Zeit zum Erreichen der thermostatgeregelten Temperatur gelassen werden.

41. Die gewünschte Menge der Prüfsubstanz (im erforderlichen Volumen des mit Wasser gesättigten 1-Octanol) wird vorsichtig in das Reaktionsgefäß gegeben. Dies ist ein entscheidender Schritt bei der Prüfung, da bei der Mischung der beiden Phasen Verwirbelungen vermieden werden müssen. Dazu kann die 1-Octanol-Phase langsam mit einer Pipette dicht über der Wasseroberfläche gegen die Wand des Prüfgefäßes getropft werden. Die 1-Octanol-Phase fließt dann an der Glaswand hinab und bildet einen Film auf der wässrigen Phase. Eine direkte Dekantierung von 1-Octanol in den Kolben sollte in jedem Fall vermieden werden; unter keinen Umständen sollten 1-Octanol-Tropfen direkt auf die Wasseroberfläche fallen.

42. Nach dem Beginn des Rührvorgangs sollte die Rührgeschwindigkeit langsam gesteigert werden. Wenn die Rührmotoren nicht in geeigneter Weise eingestellt werden können, sollte der Einsatz eines Transformators in Erwägung gezogen werden. Die Rührgeschwindigkeit sollte so eingestellt werden, dass am Übergang zwischen Wasser und 1-Octanol ein Wirbel mit einer Tiefe von 0,5 cm bis höchstens 2,5 cm entsteht. Die Rührgeschwindigkeit ist zu verringern, wenn der Wirbel tiefer als 2,5 cm wird; andernfalls können 1-Octanol-Mikrotröpfchen in der wässrigen Phase entstehen und dazu führen, dass die Konzentration der Prüfsubstanz im Wasser überschätzt wird. Die Rührgeschwindigkeit, bei der ein Wirbel mit einer Tiefe von höchstens 2,5 cm entsteht, wird ausgehend von den Ergebnissen der Ringtest-Validierungsstudie empfohlen (5). Diese Rührgeschwindigkeit gewährleistet einen Kompromiss zwischen der möglichst raschen Herstellung des erforderlichen Gleichgewichts und der Vermeidung von 1-Octanol-Mikrotröpfchen.

▼M4

*Probenahme und Behandlung der Proben*

43. Vor der Probenahme sollte der Rührmotor ausgeschaltet und gewartet werden, bis die Flüssigkeiten zur Ruhe gekommen sind. Nach der Probenahme wird der Rührmotor bei geringer Rührgeschwindigkeit wieder eingeschaltet und die Rührgeschwindigkeit wie oben beschrieben langsam gesteigert.

44. Die Probenahme aus der wässrigen Phase erfolgt aus einem Absperrhahn unten am Reaktionsgefäß. Dabei ist das Totvolumen des im Hahn enthaltenen Wassers (in dem in Anlage 2 abgebildeten Gefäß etwa 5 ml) zu verwerfen. Das im Hahn enthaltene Wasser wurde nicht umgerührt und befindet sich daher nicht im Gleichgewicht mit der übrigen Flüssigkeit. Das Volumen der Wasserproben wird protokolliert; außerdem ist die Menge der im verworfenen Wasservolumen enthaltenen Prüfsubstanz bei der Berechnung der Massenbilanz zu berücksichtigen. Verdampfungsverluste sollten vermieden werden; dazu sollte dem Wasser Gelegenheit gegeben werden, ruhig in den Abscheidetrichter abzufließen, damit die Wasser-1-Octanol-Schicht nicht gestört wird.

45. Die Probenahme aus der 1-Octanol-Phase erfolgt, indem eine kleine Aliquote (ca. 100 µl) mit einer 100-Mikroliter-Glas-Metall-Spritze aus der 1-Octanol-Schicht gezogen wird. Dabei ist darauf zu achten, dass der Übergangsbereich nicht berührt wird. Anschließend wird das Volumen der als Probe entnommenen Flüssigkeit protokolliert. Eine kleine Aliquote ist ausreichend, da die 1-Octanol-Probe verdünnt wird.

46. Bei der Handhabung der Proben sollten unnötige Übertragungsschritte vermieden werden. Daher sollte das Probenvolumen gravimetrisch bestimmt werden. Bei Wasserproben kann dies geschehen, indem die Wasserproben in einem Abscheidetrichter gesammelt werden, der bereits die erforderliche Lösungsmittelmenge erhält.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

47. Bei der hier beschriebenen Prüfmethode wird $P_{OW}$ aufgrund von drei Prüfungen der zu untersuchenden Verbindung (drei Prüfeinheiten) unter langsamem Rühren bestimmt; dabei müssen jeweils identische Bedingungen gegeben sein. Die zum Nachweis des hergestellten Gleichgewichts vorgenommene Regression sollte auf den Ergebnissen von mindestens vier $C_O/C_W$-Werten zu aufeinanderfolgenden Zeitpunkten beruhen. Anhand dieser Ergebnisse kann eine Varianz als Maß für die Unsicherheit des pro Prüfeinheit ermittelten Durchschnittswerts berechnet werden.

48. $P_{OW}$ kann über die Varianz der in den einzelnen Prüfeinheiten ermittelten Daten beschrieben werden. Aufgrund dieser Information wird $P_{OW}$ nämlich als gewichteter Durchschnitt der Ergebnisse der einzelnen Prüfeinheiten berechnet. Dazu wird der Kehrwert der Varianz der Ergebnisse der Prüfeinheiten als Gewichtung angenommen. Dies hat zur Folge, dass sich Daten mit großen Schwankungen (ausgedrückt in einer hohen Varianz) und entsprechend geringerer Zuverlässigkeit weniger auf das Ergebnis auswirken als Daten mit niedriger Varianz.

49. In entsprechender Weise wird die gewichtete Standardabweichung berechnet. Die Standardabweichung beschreibt die Wiederholbarkeit der $P_{OW}$-Messung. Eine niedrige gewichtete Standardabweichung ist Ausdruck einer sehr hohen Wiederholbarkeit der $P_{OW}$-Bestimmung in ein und demselben Labor. Im Folgenden wird die formale statistische Behandlung der Daten beschrieben.

▼M4

**Auswertung der Ergebnisse**

*Nachweis der Herstellung des Gleichgewichts*

50. Für jeden Probenahmezeitpunkt wird der Logarithmus des Verhältnisses der Konzentration der Prüfsubstanz in 1-Octanol und Wasser (log ($C_O/C_W$)) berechnet. Die Herstellung des chemischen Gleichgewichts wird nachgewiesen, indem dieses Verhältnis bezogen auf die betreffende Zeit dargestellt wird. Ein Plateau in der aus Messungen zu mindestens vier aufeinanderfolgenden Zeitpunkten erstellten Kurve zeigt, dass ein Gleichgewicht erreicht und die Verbindung tatsächlich in 1-Octanol gelöst ist. Andernfalls sind die Prüfungen fortzusetzen, bis sich aus den Werten von vier aufeinanderfolgenden Zeitpunkten eine Kurve ergibt, deren Steigung sich bei einem p-Wert von 0,05 nicht mehr signifikant von null unterscheidet, und die entsprechend zeigt, dass log $C_O/C_W$ nicht mehr zeitabhängig ist.

*Berechnung von Log $P_{OW}$*

51. Log $P_{OW}$ der Versuchseinheit wird als gewichteter Durchschnitt von log $C_o/C_w$ für den Teil der Kurve zur Darstellung des Verhältnisses von log $C_o/C_w$ zur Zeitspanne berechnet, in dem das Gleichgewicht nachgewiesen wurde. Zur Berechnung des gewichteten Durchschnitts werden die Daten mit dem Kehrwert der Varianz so berechnet, dass der Einfluss der Daten auf das Endergebnis umgekehrt proportional zur Unsicherheit der Daten ist.

*Durchschnittlicher Wert für log $P_{OW}$*

52. Der durchschnittliche Wert für log $P_{OW}$ bei verschiedenen Versuchseinheiten wird als Durchschnitt der Ergebnisse der einzelnen mit der jeweiligen Varianz gewichteten Versuchseinheiten berechnet.

Die Berechnung erfolgt nach der nachstehenden Formel:

$$\text{Log } P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

Dabei ist

Log $P_{OW,i}$ = log $P_{OW}$ der jeweiligen Versuchseinheit i,

log $P_{OW,Av}$ = gewichteter Durchschnitt der jeweils ermittelten Werte für log $P_{OW}$,

$w_i$ = statistische Gewichtung von log $P_{OW}$ der Versuchseinheit i.

Der Kehrwert der Varianz von log $P_{OW,i}$ wird als $w_i$ eingesetzt ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Der Fehler des Durchschnitts von log $P_{OW}$ wird geschätzt als die in den einzelnen Versuchseinheiten während der Gleichgewichtsphase ermittelte Wiederholbarkeit von log $C_O/C_W$ und als gewichtete Standardabweichung von log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log POW,Av}$) ausgedrückt, die wiederum ein Maß für den mit log $P_{OW,Av}$ verbundenen Fehler ist. Die gewichtete Standardabweichung kann wie folgt aus der gewichteten Varianz ($\text{var}_{\log POW,Av}$) berechnet werden:

$$\text{var}_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (\text{var}_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Dabei steht n für die Anzahl der Versuchseinheiten.

▼M4

**Prüfbericht**

54. Der Prüfbericht sollte folgende Informationen enthalten:

*Prüfsubstanz:*

— Handelsname (Common name), chemischer Name, CAS-Nummer, Strukturformel (mit Angabe der Lage der Markierung bei Verwendung radioaktiv markierten Materials) und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften (siehe Nummer 17),

— Reinheit (Verunreinigungen) der Prüfsubstanz,

— Reinheit der Markierung von markierten Chemikalien und molare Aktivität (soweit zutreffend),

— vorläufige Schätzung von log $P_{OW}$ sowie Methode zur Ableitung des Wertes.

*Prüfbedingungen:*

— Daten der Durchführung der Untersuchungen,

— Temperatur während der Prüfung,

— Volumina an 1-Octanol und Wasser bei Beginn der Prüfung,

— Volumina der entnommenen 1-Octanol- und Wasserproben,

— in den Prüfgefäßen verbliebene Volumina an 1-Octanol und Wasser,

— Beschreibung der Prüfgefäße und der Rührbedingungen (Geometrie von Rührstab und Prüfgefäß, Wirbeltiefe in mm und — wenn bekannt — Rührgeschwindigkeit),

— Analysemethoden zur Bestimmung der Prüfsubstanz und Methode zur Bestimmung der Quantifizierungsgrenze,

— Probenahmezeiten,

— pH-Wert der wässrigen Phase und verwendete Pufferlösungen, wenn der pH-Wert unter Berücksichtigung der ionisierbaren Moleküle korrigiert wurde,

— Anzahl der Wiederholungen.

*Ergebnisse:*

— Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit der verwendeten Analysemethoden,

— bestimmte Konzentrationen der Prüfsubstanz in 1-Octanol und in Wasser abhängig von der Zeit,

— Berechnung der Massenbilanz,

— Temperatur und Standardabweichung oder Temperaturbereich während der Prüfung,

— zeitabhängige Regression des Konzentrationsverhältnisses,

— durchschnittlicher Wert log $P_{OW,Av}$ und Standardfehler,

— Diskussion und Auswertung der Ergebnisse,

▼M4

— beispielhafte Rohdaten repräsentativer Analysen (sämtliche Rohdaten sind gemäß den GLP-Standards zu speichern); u. a. Daten zur Wiederfindung von Surrogaten, Anzahl der bei der Kalibrierung verwendeten Konzentrationen (sowie Kriterien für den Korrelationskoeffizienten der Kalibrierungskurve) und Ergebnisse der Qualitätssicherung/Qualitätskontrolle (QA/QC),

— wenn verfügbar: Validierungsbericht zum Untersuchungsverfahren (im Literaturverzeichnis anzugeben).

*LITERATUR:*


1. De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring" method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

2. Kapitel A.8 dieses Anhangs, Verteilungskoeffizient.

3. Kapitel A.8 dieses Anhangs, Verteilungskoeffizient.

4. OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

5. Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

6. Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

7. Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

8. Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

9. OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

10. Kapitel A.6 dieses Anhangs, Wasserlöslichkeit.

11. Kapitel C.7 dieses Anhangs, Abbaubarkeit — abiotischer Abbau: Hydrolyse in Abhängigkeit vom pH-Wert.

12. Kapitel C.4 — Teile II — VII (Methoden A bis F) dieses Anhangs -Bestimmung der „leichten" biologischen Abbaubarkeit.

13. Kapitel A.4 dieses Anhangs, Dampfdruck.

14. Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

15. Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

16. Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

17. Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

18. Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

19. ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

20. Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

21. Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

22. Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

*Anlage 1*

**Tabelle zur Berechnung der für den Nachweis von prüfsubstanzen mit unterschiedlichen log$P_{OW}$-Werten in der wässrigen Phase mindestens erforderlichen Volumina**

Voraussetzungen:

— Maximales Volumen der einzelnen Aliquoten = 10 % des Gesamtvolumens; 5 Aliquoten = 50 % des Gesamtvolumens.

— Konzentration der Prüfsubstanzen = 0,7 × Löslichkeit in beiden Phasen; bei niedrigeren Konzentrationen sind größere Volumina erforderlich.

— Zur Bestimmung der Nachweisgrenze verwendetes Volumen = 100 ml.

— log $P_{OW}$ vs. Log $S_W$ und log $P_{OW}$ vs. SR ($S_{OCT}/S_W$) sind sinnvolle Darstellungen der Beziehungen zwischen den Prüfsubstanzen.

*Geschätzter Wert für $S_w$*

| log $P_{ow}$ | Formel | log $S_w$ | $S_w$ (mg/l) |
|---|---|---|---|
| 4 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | 0,496 | 3,133E+00 |
| 4,5 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | 0,035 | 1,084E+00 |
| 5 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 0,426 | 3,750E-01 |
| 5,5 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 0,887 | 1,297E-01 |
| 6 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 1,348 | 4,487E-02 |
| 6,5 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 1,809 | 1,552E-02 |
| 7 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 2,270 | 5,370E-03 |
| 7,5 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 2,731 | 1,858E-03 |
| 8 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 3,192 | 6,427E-04 |

*Geschätzter Wert für $S_{oct}$*

| log $P_{ow}$ | Formel | $S_{oct}$ (mg/l) |
|---|---|---|
| 4 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$ | 3,763E+04 |
| 4,5 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$ | 4,816E+04 |
| 5 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$ | 6,165E+04 |
| 5,5 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$ | 7,890E+04 |
| 6 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$ | 1,010E+05 |
| 6,5 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$ | 1,293E+05 |
| 7 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$ | 1,654E+05 |
| 7,5 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$ | 2,117E+05 |
| 8 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$ | 2,710E+05 |

▼**M4**

| Gesamtmasse der Prüfsubstanz (mg) | $Masse_{Oct}$/ $Masse_{Wasser}$ | $Masse_{H2O}$ (mg) | $Konz_{H2O}$ (mg/l) | $Masse_{oct}$ (mg) | $Konz_{oct}$ (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 319 | 526 | 2,5017 | 2,6333 | 1 317 | 26 333 |
| 1 686 | 1 664 | 1,0127 | 1,0660 | 1 685 | 33 709 |
| 2 158 | 5 263 | 0,4099 | 0,4315 | 2 157 | 43 149 |
| 2 762 | 16 644 | 0,1659 | 0,1747 | 2 762 | 55 230 |
| 3 535 | 52 632 | 0,0672 | 0,0707 | 3 535 | 70 691 |
| 4 524 | 1664 36 | 0,0272 | 0,0286 | 4 524 | 90 480 |
| 5 790 | 5263 16 | 0,0110 | 0,0116 | 5 790 | 115 807 |
| 7 411 | 1 664 357 | 0,0045 | 0,0047 | 7 411 | 148 223 |
| 9 486 | 5 263 158 | 0,0018 | 0,0019 | 9 486 | 189 713 |

*Berechnung der Volumina*

**Erforderliches Mindestvolumen der $H_2O$-Phase bei den verschiedenen LOD-Konzentrationen**

| $\log K_{ow}$ | LOD (µg/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | | 0,04 | 0,38 | 3,80 | 38 | 380 |
| 4,5 | | 0,09 | 0,94 | 9,38 | 94 | 938 |
| 5 | | 0,23 | 2,32 | 23,18 | 232 | 2 318 |
| 5,5 | | 0,57 | 5,73 | 57,26 | 573 | 5 726 |
| 6 | | 1,41 | 14,15 | 141 | 1 415 | 14 146 |
| 6,5 | | 3,50 | 34,95 | 350 | 3 495 | 34 950 |
| 7 | | 8,64 | 86,35 | 864 | 8 635 | 86 351 |
| 7,5 | | 21,33 | 213 | 2 133 | 21 335 | 213 346 |
| 8 | | 52,71 | 527 | 5 271 | 52 711 | 527 111 |
| Volumen für Nachweis-grenze LOD (l) | 0,1 | | | | | |

*Erläuterungen*

< 10 % des Gesamtvolumens der wässrigen Phase, 1-l-Ausgleichsgefäß.

< 10 % des Gesamtvolumens der wässrigen Phase, 2-l-Ausgleichsgefäß.

< 10 % des Gesamtvolumens der wässrigen Phase, 5-l-Ausgleichsgefäß.

< 10 % des Gesamtvolumens der wässrigen Phase, 10-l-Ausgleichsgefäß.

Mehr als 10 % des Volumens eines 10-l-Ausgleichsgefäßes.

▼M4

**Übersicht über die benötigten Volumina abhängig von der Wasserlöslichkeit und von log $P_{OW}$**

Erforderliches Mindestvolumen der $H_2O$-Phase bei den verschiedenen LOD-Konzentrationen (ml)

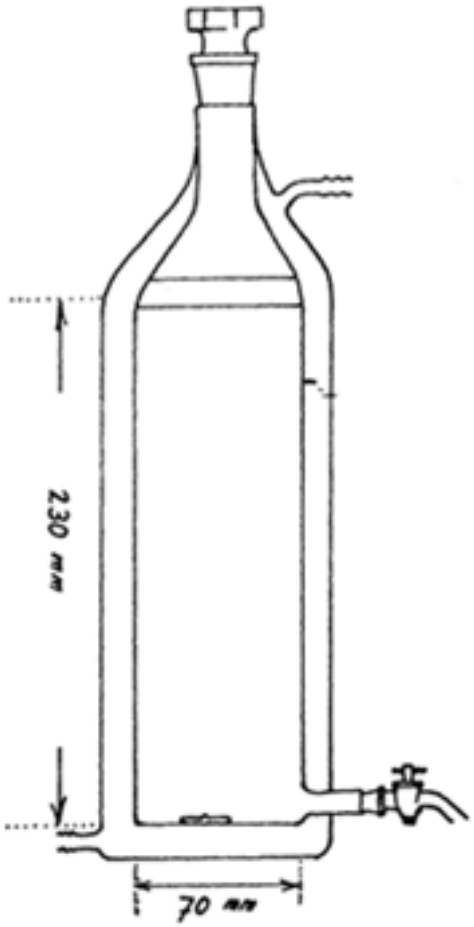
| log $P_{ow}$ | $S_w$ (mg/l) | LOD (µg/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 10 | | 0,01 | 0,12 | 1,19 | 11,90 | 118,99 |
| | 5 | | 0,02 | 0,24 | 2,38 | 23,80 | 237,97 |
| | 3 | | 0,04 | 0,40 | 3,97 | 39,66 | 396,62 |
| | 1 | | 0,12 | 1,19 | 11,90 | 118,99 | 1 189,86 |
| 4,5 | 5 | | 0,02 | 0,20 | 2,03 | 20,34 | 203,37 |
| | 2 | | 0,05 | 0,51 | 5,08 | 50,84 | 508,42 |
| | 1 | | 0,10 | 1,02 | 10,17 | 101,68 | 1 016,83 |
| | 0,5 | | 0,20 | 2,03 | 20,34 | 203,37 | 2 033,67 |
| 5 | 1 | | 0,09 | 0,87 | 8,69 | 86,90 | 869,01 |
| | 0,5 | | 0,17 | 1,74 | 17,38 | 173,80 | 1 738,02 |
| | 0,375 | | 0,23 | 2,32 | 23,18 | 231,75 | 2 317,53 |
| | 0,2 | | 0,43 | 4,35 | 43,45 | 434,51 | 4 345,05 |
| 5,5 | 0,4 | | 0,19 | 1,86 | 18,57 | 185,68 | 1 856,79 |
| | 0,2 | | 0,37 | 3,71 | 37,14 | 371,36 | 3 713,59 |
| | 0,1 | | 0,74 | 7,43 | 74,27 | 742,72 | 7 427,17 |
| | 0,05 | | 1,49 | 14,85 | 148,54 | 1 485,43 | 14 854,35 |
| 6 | 0,1 | | 0,63 | 6,35 | 63,48 | 634,80 | 6 347,95 |
| | 0,05 | | 1,27 | 12,70 | 126,96 | 1 269,59 | 12 695,91 |
| | 0,025 | | 2,54 | 25,39 | 253,92 | 2 539,18 | 25 391,82 |
| | 0,0125 | | 5,08 | 50,78 | 507,84 | 5 078,36 | 50 783,64 |
| 6,5 | 0,025 | | 2,17 | 21,70 | 217,02 | 2 170,25 | 21 702,46 |
| | 0,0125 | | 4,34 | 43,40 | 434,05 | 4 340,49 | 43 404,93 |
| | 0,006 | | 9,04 | 90,43 | 904,27 | 9 042,69 | 90 426,93 |
| | 0,003 | | 18,09 | 180,85 | 1 808,54 | 18 085,39 | 180 853,86 |
| 7 | 0,006 | | 7,73 | 77,29 | 772,89 | 7 728,85 | 77 288,50 |
| | 0,003 | | 15,46 | 154,58 | 1 545,77 | 15 457,70 | 154 577,01 |
| | 0,0015 | | 23,19 | 231,87 | 2 318,66 | 23 186,55 | 231 865,51 |
| | 0,001 | | 46,37 | 463,73 | 4 637,31 | 46 373,10 | 463 731,03 |
| 7,5 | 0,002 | | 19,82 | 198,18 | 1 981,77 | 19 817,73 | 198 177,33 |
| | 0,001 | | 39,64 | 396,35 | 3 963,55 | 39 635,47 | 396 354,66 |
| | 0,0005 | | 79,27 | 792,71 | 7 927,09 | 79 270,93 | 792 709,32 |

▼**M4**

| log $P_{ow}$ | $S_w$ (mg/l) | LOD (µg/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,00025 | | 158,54 | 1 585,42 | 15 854,19 | 158 541,86 | 1 585 418,63 |
| 8 | 0,001 | | 33,88 | 338,77 | 3 387,68 | 33 876,77 | 338 767,72 |
| | 0,0005 | | 67,75 | 677,54 | 6 775,35 | 67 753,54 | 677 535,44 |
| | 0,00025 | | 135,51 | 1 355,07 | 13 550,71 | 135 507,09 | 1 355 070,89 |
| | 0,000125 | | 271,01 | 2 710,14 | 27 101,42 | 271 014,18 | 2 710 141,77 |
| Volumen für Nachweisgrenze LOD (l) | | 0,1 | | | | | |

*Anlage 2*

**Beispiel eines Prüfgefäßes mit Glasmantel zur Bestimmung von $P_{OW}$ unter langsamem Rühren**



▼B

## TEIL B: METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT UND SONSTIGER AUSWIRKUNGEN AUF DIE GESUNDHEIT

INHALTSVERZEICHNIS


ALLGEMEINE EINLEITUNG

B.1 bis. AKUTE ORALE TOXIZITÄT — FEST-DOSIS-METHODE

B.1 tris. AKUTE ORALE TOXIZITÄT — AKUT-TOXISCHE KLASSENMETHODE

B.2. AKUTE INHALATIONSTOXIZITÄT

B.3. AKUTE TOXIZITÄT (DERMAL)

B.4. AKUTE TOXIZITÄT: HAUTREIZUNG/-VERÄTZUNG

B.5. AKUTE TOXIZITÄT: AUGENREIZUNG/-VERÄTZUNG

B.6. SENSIBILISIERUNG DER HAUT

B.7. 28-TAGE-TOXIZITÄTSSTUDIE MIT WIEDERHOLTER ORALER VERABREICHUNG AN NAGETIEREN

B.8. PRÜFUNG AUF SUBAKUTE TOXIZITÄT NACH INHALATION — 28-TAGE-TEST

B.9. TOXIZITÄT NACH 28-TÄGIGER GABE (DERMAL)

B.10. MUTAGENITÄT — *IN-VITRO*-TEST AUF CHROMOSOMENABERRATIONEN IN SÄUGETIERZELLEN

B.11. MUTAGENITÄT — *IN-VIVO*-TEST AUF CHROMOSOMENABERRATIONEN IN SÄUGETIERKNOCHENMARKZELLEN

B.12. MUTAGENITÄT — *IN-VIVO*-ERYTHROZYTEN-MIKROKERNTEST BEI SÄUGERN

B.13./14. MUTAGENITÄT — RÜCKMUTATIONSTEST UNTER VERWENDUNG VON BAKTERIEN

B.15. MUTAGENITÄT (EINSCHLIESSLICH PRESCREENING BETREFFEND KREBSERZEUGENDE EIGENSCHAFTEN) — GENMUTATION — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.16. MITOTISCHE REKOMBINATION — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.17. MUTAGENITÄT — IN VITRO-GENMUTATIONSTEST AN SÄUGETIERZELLEN

B.18. DNS-SCHÄDIGUNG UND REPARATUR — UNPLANMÄSSIGE DNS-SYNTHESE (UDS) — SÄUGETIERZELLEN — IN VITRO

B.19. *IN-VITRO*-SCHWESTERCHROMATIDAUSTAUSCH-TEST

B.20. TEST ZUR ERFASSUNG GESCHLECHTSGEBUNDENER REZESSIVER LETALMUTATIONEN AN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼B

B.21. *IN-VITRO*-ZELLTRANSFORMATIONSTEST

B.22. SÄUGER-*IN-VIVO*-DOMINANT-LETAL-TEST

B.23. SPERMATOGONIEN-CHROMOSOMENABERRATIONSTEST BEI SÄUGETIEREN

B.24. *IN-VIVO*-SÄUGER-FELLFLECKENTEST DER MAUS

B.25. *IN-VIVO*-SÄUGER-TRANSLOKATIONSTEST

B.26. PRÜFUNG AUF SUB-CHRONISCHE ORALE TOXIZITÄT — 90-TAGE-TOXIZITÄTSSTUDIE BEI WIEDERHOLTER ORALER VERABREICHUNG AN NAGETIEREN

B.27. PRÜFUNG AUF SUB-CHRONISCHE ORALE TOXIZITÄT — 90-TAGE-TOXIZITÄTSSTUDIE BEI WIEDERHOLTER ORALER VERABREICHUNG AN NICHT-NAGETIEREN

B.28. PRÜFUNG AUF SUB-CHRONISCHE TOXIZITÄT NACH DERMALER APPLIKATION — 90-TAGE-TEST MIT NAGERN

B.29. PRÜFUNG AUF SUB-CHRONISCHE TOXIZITÄT NACH INHALATION — 90-TAGE-TEST

B.30. PRÜFUNGEN AUF CHRONISCHE TOXIZITÄT

B.31. STUDIE ZUR PRÜFUNG AUF PRÄNATALE ENTWICKLUNGSTOXIZITÄT

B.32. PRÜFUNGEN AUF KANZEROGENITÄT

B.33. KOMBINIERTE STUDIEN ZUR PRÜFUNG AUF CHRONISCHE TOXIZITÄT UND KANZEROGENITÄT

B.34. PRÜFUNG AUF REPRODUKTIONSTOXIZITÄT WÄHREND EINER GENERATION

B.35. ZWEIGENERATIONENSTUDIE ZUR PRÜFUNG AUF REPRODUKTIONSTOXIZITÄT

B.36. TOXIKOKINETIK

B.37. VERZÖGERTE NEUROTOXIZITÄT PHOSPHORORGANISCHER SUBSTANZEN NACH AKUTER EXPOSITION

B.38. VERZÖGERTE NEUROTOXIZITÄT PHOSPHORORGANISCHER SUBSTANZEN BEI WIEDERHOLTER GABE ÜBER 28 TAGE

B.39. *IN-VIVO*-TEST ZUR UNPLANMÄSSIGEN DNA-SYNTHESE (UDS) IN SÄUGETIERLEBERZELLEN

B.40. *IN-VITRO*-PRÜFUNG AUF HAUTÄTZENDE WIRKUNG: TER-TEST (TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL RESISTANCE TEST)

B.40 bis. *IN-VITRO*-PRÜFUNG AUF HAUTÄTZENDE WIRKUNG: TEST MIT MENSCHLISCHEM HAUTMODELL

▼**B**

B.41. *IN-VITRO*-3T3-NRU-FOTOTOXIZITÄTSTEST

B.42. HAUTSENSIBILISIERUNG: LOKALER LYMPHKNOTEN-TEST

B.43. PRÜFUNG AUF NEUROTOXIZITÄT BEI NAGETIEREN

B.44. HAUTRESORPTION: *IN-VIVO*-METHODE

B.45. HAUTRESORPTION: *IN-VITRO*-METHODE

B.46. *IN-VITRO*-HAUTREIZUNG: TEST AN REKONSTRUIERTEN MODELLEN HUMANER EPIDERMIS

B.47. TRÜBUNGS- UND DURCHLÄSSIGKEITSTEST AN DER ISOLIERTEN RINDERHORNHAUT ZWECKS IDENTIFIZIERUNG VON STOFFEN MIT AUGENVERÄTZENDER UND STARK AUGENREIZENDER WIRKUNG

B.48. TEST AM ISOLIERTEN HÜHNERAUGE ZUR IDENTIFIZIERUNG VON STOFFEN MIT AUGENVERÄTZENDER UND STARK AUGENREIZENDER WIRKUNG

B.49. *IN VITRO*-MIKRONUKLEUSTEST AN SÄUGETIERZELLEN

B.50. HAUTSENSIBILISIERUNG: LOKALER LYMPHKNOTEN-TEST: DA

B.51. HAUTSENSIBILISIERUNG: LOKALER LYMPHKNOTEN-TEST: BRDU-ELISA

▼**M4**

B.52. AKUTE INHALATIONSTOXIZITÄT — AKUT-TOXISCHE KLASSENMETHODE

▼B

## ALLGEMEINE EINLEITUNG

### A. CHARAKTERISIERUNG DER PRÜFSUBSTANZ

Die Zusammensetzung der Prüfsubstanz, einschließlich der Hauptverunreinigungen, ihre relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie die Stabilität der Substanz müssen vor Beginn einer Toxizitätsuntersuchung bekannt sein.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz sind mitentscheidend für die Auswahl des Verabreichungsweges, die Art der einzelnen Prüfungen sowie für die Handhabung und Lagerung der Prüfsubstanz.

Der eigentlichen Untersuchung sollte daher die Entwicklung eines Analyseverfahrens zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Prüfsubstanz (möglichst einschließlich der Hauptverunreinigungen) im Verabreichungsmedium und im biologischen Material vorausgehen.

Alle Angaben bezüglich der Identifikation, der physikalisch-chemischen Eigenschaften, der Reinheit und des Verhaltens der Prüfsubstanz sollten im Prüfbericht enthalten sein.

### B. TIERPFLEGE

Eine strenge Kontrolle der Umweltbedingungen sowie eine den jeweiligen Tierarten angemessene Tierhaltung sind wesentliche Voraussetzungen für toxikologische Untersuchungen.

i) *Haltungsbedingungen*

Die Umgebungsbedingungen in den Versuchstierräumen sind der jeweiligen Tierart anzupassen. Für Ratten, Mäuse und Meerschweinchen ist eine Raumtemperatur von 22 °C ± 3 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30-70 % angezeigt; bei Kaninchen sollte die Temperatur 20 ± 3 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30-70 % betragen.

Einige Untersuchungsmethoden sind besonders empfindlich gegenüber Temperatureinflüssen. Für diese Fälle sind Einzelheiten über die entsprechenden Umgebungsbedingungen in der Beschreibung des Prüfverfahrens enthalten. Bei allen Untersuchungen auf toxische Wirkungen sind Temperatur und Luftfeuchtigkeit zu überwachen, aufzuzeichnen und in den Abschlussbericht der Untersuchung aufzunehmen.

Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. Einzelheiten des Beleuchtungsmusters sind aufzuzeichnen und in den Abschlussbericht der Studie aufzunehmen.

Sofern in der Beschreibung der Prüfmethode nichts anderes angegeben ist, sollten die Tiere einzeln oder in kleinen Gruppen aus Tieren desselben Geschlechts in Käfigen untergebracht sein. Bei Gruppenhaltung sollten maximal fünf Tiere in einem Käfig untergebracht sein.

In Berichten über Tierversuche ist unbedingt die Art der Käfighaltung sowie die Anzahl der in einem Käfig untergebrachten Tiere sowohl während der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz als auch während der darauf folgenden Beobachtungszeit anzugeben.

▼B

ii) *Fütterungsbedingungen*

Das Futter muss allen ernährungswissenschaftlichen Anforderungen für die jeweils eingesetzte Spezies entsprechen. Werden den Tieren Prüfsubstanzen im Futter verabreicht, so kann der Nährwert durch Wechselwirkung zwischen der jeweiligen Substanz und einem Futterbestandteil eingeschränkt sein. Die Möglichkeit einer solchen Reaktion muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Es kann herkömmliches Labortierfutter verwendet werden bei uneingeschränkter Versorgung mit Trinkwasser. Die Auswahl des Futters kann auch dadurch mitbestimmt werden, dass eine geeignete Beimischung der Prüfsubstanz gewährleistet sein muss, wenn die Prüfsubstanz auf diese Art verabreicht werden soll.

Verunreinigungen im Futter, die sich nachweislich auf die Toxizität auswirken, dürfen nicht in störenden Konzentrationen vorhanden sein.

C. **ALTERNATIVE PRÜFMETHODEN**

Die Europäische Union ist fest entschlossen, die Entwicklung und Validierung alternativer Verfahren, welche dieselben Informationen liefern können wie die gegenwärtigen Tierversuche, aber weniger Tiere erfordern, weniger Leiden verursachen oder die Verwendung von Tieren völlig überflüssig machen, zu fördern.

Solche Methoden müssen, sobald sie zur Verfügung stehen, nach Möglichkeit für die Charakterisierung von Gefahren und die anschließende Einstufung und Kennzeichnung im Hinblick auf substanzeigene Gefahren in Betracht gezogen werden.

D. **BEWERTUNG UND INTERPRETATION**

Bei der Auswertung und Interpretation von Tests sind gewisse Grenzen hinsichtlich der direkten Extrapolation der Ergebnisse der Tier- und *In-vitro*-Versuche auf den Menschen zu berücksichtigen; deshalb können Belege für unerwünschte Wirkungen beim Menschen, soweit solche vorliegen, zur Bestätigung der Versuchsergebnisse herangezogen werden.

E. **LITERATURHINWEISE**

Die meisten dieser Methoden werden im Rahmen des OECD-Programms für Prüfrichtlinien entwickelt und sollten in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der guten Laborpraxis durchgeführt werden, um eine möglichst breite gegenseitige Datenakzeptanz zu gewährleisten.

Weitere Informationen finden sich in den in den OECD-Richtlinien genannten Literaturangaben sowie in der an anderen Stellen publizierten einschlägigen Literatur.

▼B

B.1 **bis — AKUTE ORALE TOXIZITÄT — FEST-DOSIS-METHODE**

1. **METHODE**

Diese Prüfmethode entspricht der OECD TG 420 (2001).

1.1. EINLEITUNG

Herkömmliche Methoden zur Bewertung der akuten Toxizität verwenden den Tod der Versuchstiere als Endpunkt. 1984 hat die British Toxicology Society einen neuen Ansatz zur Bewertung der akuten Toxizität vorgeschlagen, der von der Verabreichung einer Serie fester Dosen ausging (1). Dieser Ansatz bezog sich nicht auf den Tod der Versuchstiere als Endpunkt, sondern stützte sich auf die Beobachtung deutlicher Toxizitätszeichen, die bei einer bestimmten Dosis aus einer Serie fester Dosierungen auftraten. Nach *In-vivo*-Validierungsstudien im Vereinigten Königreich (2) sowie in internationalem Rahmen (3) wurde das Verfahren im Jahre 1992 als Prüfmethode anerkannt. Später wurden die statistischen Eigenschaften der Fest-Dosis-Methode mit Hilfe mathematischer Modelle in einer Reihe von Studien berechnet (4) (5) (6). Mit *In-vivo*-Studien und anhand von Modellstudien konnte nachgewiesen werden, dass das Verfahren reproduzierbar ist, mit einer geringeren Anzahl an Versuchstieren auskommt und weniger Leiden verursacht als die herkömmlichen Methoden und eine ähnliche Bewertung der Substanzen ermöglicht wie die sonstigen Methoden zur Prüfung der akuten Toxizität.

Leitlinien für die Auswahl der geeignetsten Testmethode für einen bestimmten Zweck enthält das Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (7). Dieser Leitfaden beinhaltet darüber hinaus weitere Informationen zur Durchführung und Auswertung der Prüfmethode B.1 bis.

Eines der Prinzipien der Methode besteht darin, dass in der Hauptstudie nur mäßig toxische Dosen eingesetzt werden und dass die Verabreichung von voraussichtlich letalen Dosen vermieden werden sollte. Außerdem brauchen keine Dosierungen verabreicht zu werden, die aufgrund ätzender oder stark reizender Wirkungen bekanntermaßen starke Schmerzen und schweres Leiden verursachen. Moribunde Tiere oder Tiere, die offensichtlich unter Schmerzen leiden oder Anzeichen von schwerem und anhaltendem Leiden zeigen, sind auf humane Weise zu töten und werden bei der Auswertung der Testergebnisse auf die gleiche Weise gewertet wie während des Tests gestorbene Tiere. Kriterien für die Entscheidung, moribunde oder schwer leidende Tiere zu töten, sowie Hinweise zur Erkennung des absehbaren oder bevorstehenden Todes sind Gegenstand eines gesonderten Leitfadens (8).

Die Methode führt zu Informationen über die gefährlichen Eigenschaften und ermöglicht die Bewertung und Klassifizierung der Substanz gemäß dem Globalen Harmonisierten System (GHS) zur Klassifizierung chemischer Stoffe mit akut toxischer Wirkung (9).

Das Prüflabor soll vor der Durchführung der Studie sämtliche verfügbaren Informationen berücksichtigen. Zu diesen Informationen gehören die Identität und die chemische Struktur der zu testenden Substanzen, die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanzen, die Ergebnisse sonstiger *In-vivo*- oder *In-vitro*-Toxizitätstests in Verbindung mit den betreffenden Substanzen, toxikologische Daten über strukturverwandte Substanzen sowie die vorgesehene(n) Verwendung(en) der Substanzen. Diese Informationen werden benötigt, um die zuständigen Stellen zu überzeugen, dass der Test für den Schutz der menschlichen Gesundheit wichtig ist und bei der Wahl der geeigneten Startdosis hilft.

▼B

1.2. DEFINITIONEN

**Akute orale Toxizität:** Schädliche Wirkungen, die nach der oralen Verabreichung einer Einzeldosis oder mehrerer innerhalb von 24 Stunden verabreichter Dosen einer Substanz auftreten.

**Verzögerter Tod:** Das betreffende Tier stirbt zwar nicht binnen 48 Stunden und wirkt in diesem Zeitraum nicht moribund; der Tod tritt jedoch später während des 14-tägigen Beobachtungszeitraums ein.

**Dosis:** Verabreichte Menge der Testsubstanz; die Dosis wird als Gewicht der Testsubstanz pro Gewichtseinheit des Versuchstiers ausgedrückt (z. B. mg/kg).

**Evidente Toxizität:** Ein allgemeiner Begriff, der deutliche Anzeichen von Toxizität nach der Verabreichung einer Testsubstanz dahin gehend beschreibt, dass bei der nächsthöheren festen Dosis entweder starke Schmerzen und anhaltende Anzeichen für schweres Leiden, ein moribunder Zustand (Kriterien siehe Humane Endpoints Guidance Document (8)) oder wahrscheinlich der Tod der meisten Versuchstiere zu erwarten sind (siehe z. B. (3)).

**GHS:** Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (Weltweit harmonisiertes Klassifizierungssystem für chemische Substanzen und Gemische); ein gemeinsames Projekt von OECD (Menschliche Gesundheit und Umwelt), UN-Expertenausschuss für den Transport von Gefahrgütern (physikalisch-chemische Eigenschaften) und ILO (Gefahrenanzeige) koordiniert im Rahmen des Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

**Bevorstehender Tod:** Der moribunde Zustand oder Tod ist vor dem nächsten vorgesehenen Beobachtungszeitpunkt zu erwarten. Anzeichen für diesen Zustand können bei Nagetieren Krämpfe, Seitenlage, liegende Stellung und Tremor sein (siehe Humane Endpoint Guidance Document (8)).

**$LD_{50}$ (mittlere Letaldosis):** Statistisch ermittelte Einzeldosis einer Substanz, bei der davon ausgegangen werden kann, dass sie bei oraler Verabreichung den Tod von 50 % der Tiere verursacht; der $LD_{50}$-Wert wird als Gewicht der Testsubstanz pro Gewichtseinheit der Versuchstiere ausgedrückt (mg/kg).

**Limit-Dosis:** Dosis am oberen Grenzwert für den betreffenden Versuch (2 000 oder 5 000 mg/kg)

Moribunder Zustand: Zustand des Sterbens oder des Unvermögens, (selbst bei Behandlung) zu überleben (siehe Humane Endpoint Guidance Document (8))

**Voraussagbarer Tod:** Vorhandensein klinischer Zeichen, die auf den Eintritt des Todes zu einem bekannten Zeitpunkt in der Zukunft — vor dem planmäßigen Ende des Experiments — hinweisen, z. B. das Unvermögen, Wasser oder Nahrung aufzunehmen (siehe Humane Endpoint Guidance Document (8))

▼B

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

An Gruppen von Versuchstieren eines Geschlechts wird in einem schrittweisen Verfahren jeweils die feste Dosis 5, 50, 300 und 2 000 mg/kg verabreicht. (Im Ausnahmefall kann eine weitere feste Dosis von 5 000 mg/kg in Betracht gezogen werden (siehe Abschnitt 1.6.2)). Als Startdosis wird auf der Grundlage einer Vorstudie die Dosis gewählt, die voraussichtlich gewisse Toxizitätsanzeichen verursachen wird, ohne schwere toxische Wirkungen oder Mortalität hervorzurufen. Klinische Anzeichen und Zustände, die mit Schmerzen, Leiden und bevorstehendem Tod verbunden sind, werden in einem gesonderten OECD-Leitfaden (8) ausführlich beschrieben. Weiteren Versuchstiergruppen können höhere oder niedrigere feste Dosen in Abhängigkeit davon verabreicht werden, ob Anzeichen von Toxizität oder Mortalität zu erkennen sind. Diese Vorgehensweise wird fortgesetzt, bis die Dosis ermittelt ist, die offensichtlich toxisch wirkt oder den Tod maximal eines Versuchstieres verursacht hat, bzw. bis bei der höchsten Dosis keine Wirkungen zu erkennen sind oder bis bereits bei der niedrigsten Dosis der Tod von Versuchstieren eintritt.

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Auswahl der Tierspezies**

Die bevorzugte Nagetierspezies ist die Ratte, es können aber auch andere Spezies verwendet werden. In der Regel werden weibliche Tiere verwendet (7). Weibliche Tiere werden bevorzugt, da die in der Literatur zitierten Untersuchungen zu konventionellen $LD_{50}$-Tests zwischen den Geschlechtern in der Regel nur geringfügige Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit belegen, in den Fällen, in denen Unterschiede beobachtet werden, jedoch zeigen, dass weibliche Tiere im Allgemeinen etwas empfindlicher sind (10). Wenn jedoch die vorhandenen Informationen über die toxikologischen oder toxikokinetischen Eigenschaften von strukturverwandten Chemikalien darauf hinweisen, dass vermutlich die männlichen Tiere empfindlicher sind, sollten männliche Tiere verwendet werden. Wird ein Versuch an männlichen Tieren durchgeführt, sollte dies hinreichend begründet werden.

Es sollen junge, gesunde, ausgewachsene Tiere aus üblicherweise eingesetzten Laborstämmen verwendet werden. Die weiblichen Tiere dürfen weder bereits geworfen haben noch momentan trächtig sein. Alle Tiere müssen zu Beginn der Verabreichung zwischen 8 und 12 Wochen alt sein; ihre Gewichtswerte müssen im Bereich von ± 20 % des mittleren Gewichts sämtlicher zuvor verwendeter Tiere liegen.

1.4.2. **Haltung und Fütterung**

Die Temperatur des Versuchstierraums soll 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit soll mindestens 30 % betragen und außer während der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen; anzustreben ist ein Wert von 50-60 %. Der Raum soll künstlich beleuchtet sein, wobei die Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus ein- und ausgeschaltet werden soll. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Tiere können in den Käfigen nach Verabreichungsdosen gruppiert werden, wobei aber die Anzahl der Tiere pro Käfig noch eine genaue Beobachtung der einzelnen Tiere ermöglichen muss.

1.4.3. **Vorbereitung der Versuchstiere**

Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zwecks Identifizierung markiert und für die Dauer von mindestens 5 Tagen vor Versuchsbeginn in ihren Käfigen gehalten, damit sie sich an die Laborbedingungen gewöhnen können.

▼B

1.4.4. **Vorbereitung der Dosen**

Generell sollen die Testsubstanzen mit einem für den gesamten zu testenden Dosierungsbereich gleichbleibenden Volumen verabreicht werden, indem jeweils die Konzentration der Dosiszubereitung variiert wird. Wenn jedoch ein flüssiges Endprodukt oder Gemisch zu testen ist, kann die Anwendung der unverdünnten, d. h. mit gleichbleibender Konzentration verabreichten Testsubstanz für die anschließende Risikobewertung der betreffenden Substanz größere Relevanz haben und wird daher von verschiedenen Behörden vorgeschrieben. In jedem Fall darf das maximal zu verabreichende Dosisvolumen nicht überschritten werden. Welches Flüssigkeitsvolumen jeweils höchstens auf einmal verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Bei Nagetieren soll das Volumen im Normalfall 1 ml pro 100 g Körpergewicht nicht überschreiten; bei wässrigen Lösungen können aber auch 2 ml pro 100 g Körpergewicht in Betracht gezogen weiden. Bezüglich der Formulierung wird, wenn dies möglich ist, eine wässrige Lösung/Suspension/-Emulsion empfohlen, danach in der Reihenfolge der Präferenz eine Lösung/Suspension/Emulsion in Öl (z. B. Maisöl) sowie an dritter Stelle eventuell eine Lösung in anderen Vehikeln. Bei anderen Vehikeln als Wasser sollen die toxikologischen Eigenschaften des jeweiligen Vehikels bekannt sein. Die Dosen dürfen erst kurz vor der Verabreichung zubereitet werden, sofern die Zubereitung über den Zeitraum, in dem sie angewandt werden soll, nicht bekanntermaßen eine annehmbare Stabilität aufweist.

1.5. VERFAHRENSWEISE

1.5.1. **Verabreichung der Dosen**

Die Testsubstanz wird als Einzeldosis mit einer Sonde über eine Magensonde oder über eine geeignete Intubationskanüle verabreicht. In dem seltenen Fall, dass die Verabreichung als Einzeldosis nicht möglich ist, kann die Dosis über einen Zeitraum von maximal 24 Stunden in kleineren Teilmengen verabreicht werden.

Die Versuchstiere sollten vor der Verabreichung nüchtern sein (z. B. sollte Ratten das Futter (nicht das Wasser) über Nacht vorenthalten werden; Mäusen sollte das Futter (nicht das Wasser) 3-4 Stunden zuvor vorenthalten werden). Nach diesem Futterentzug sollen die Tiere gewogen werden und die Testsubstanz verabreicht bekommen. Nach der Verabreichung der Substanz kann das Futter bei Ratten weitere 3-4 Stunden bzw. bei Mäusen weitere 1-2 Stunden zurückgehalten werden. Wenn die Dosis über einen bestimmten Zeitraum hinweg in Teilmengen verabreicht wird, kann es je nach Länge dieses Zeitraums erforderlich sein, die Tiere mit Futter und Wasser zu versorgen.

1.5.2. **Vorstudie**

Zweck der Sichtungsstudie ist die Ermittlung der zweckmäßigen Ausgangsdosis für die Hauptuntersuchung, Die Testsubstanz wird einzelnen Tieren in einem sequenziellen Verfahren gemäß den Flussdiagrammen in Anlage 1 verabreicht. Die Sichtungsstudie ist abgeschlossen, wenn eine Entscheidung über die Ausgangsdosis für die Hauptstudie getroffen werden kann (oder wenn bereits bei der niedrigsten festen Dosis der Tod eines Versuchstiers eintritt).

Als Ausgangsdosis für die Sichtungsstudie wird von den festen Dosierungen 5, 50, 300 und 2 000 mg/kg die Dosis ausgewählt, die voraussichtlich eine evidente Toxizität bewirken wird, wobei nach Möglichkeit die Erkenntnisse aus *In-vivo*- und *In-vitro*-Daten für denselben chemischen Stoff sowie für strukturverwandte chemische Stoffe zugrunde liegen sollten. Wenn keine entsprechenden Informationen vorliegen, wird die Ausgangsdosis 300 mg/kg verwendet.

Zwischen den Versuchen an jedem einzelnen Tier liegt ein zeitlicher Abstand von mindestens 24 Stunden. Alle Tiere sollten mindestens 14 Tage lang beobachtet werden,

▼B

In Ausnahmefallen — und nur, wenn dies durch konkrete Vorschriften begründet ist — kann die Anwendung einer weiteren festen oberen Dosis von 5 000 mg pro kg Körpergewicht in Erwägung gezogen werden (siehe Anlage 3). Aus Tierschutzgründen wird von Tierversuchen im Bereich der GHS-Kategorie 5 (2 000 — 5 000 mg/kg) abgeraten; diese Versuche sollten nur dann in Betracht gezogen werden, wenn die Ergebnisse eines solchen Tests für den Schutz der Gesundheit von Menschen oder Tieren oder der Umwelt mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt relevant sind.

Wenn ein Versuchstier, das mit der niedrigsten festen Dosis (5 mg/kg) getestet wird, bei der Sichtungsstudie stirbt, wird die Studie normalerweise beendet und die Substanz der GHS-Kategorie 1 zugewiesen (wie in Anlage 1 dargestellt). Ist jedoch eine weitere Bestätigung dieser Klassifizierung erforderlich, kann das folgende ergänzende Verfahren in Betracht gezogen werden: Ein zweites Versuchstier wird mit der Dosis 5 mg/kg getestet. Wenn dieses zweite Tier stirbt, wird die GHS-Kategorie 1 bestätigt und die Studie sofort beendet. Wenn das zweite Tier überlebt, wird maximal drei weiteren Tieren die Dosis 5 mg/kg verabreicht. Da ein hohes Mortalitätsrisiko besteht, sollten diese Tiere aus Tierschutzgründen nacheinander getestet werden. Der zeitliche Abstand zwischen den Versuchen an den einzelnen Tieren sollte groß genug sein, um die Überlebenswahrscheinlichkeit des vorherigen Tieres bestätigen zu können. Wenn ein zweites Tier stirbt, wird die Versuchsreihe sofort beendet, und es werden keine weiteren Tiere getestet. Da der Tod eines zweiten Tieres (unabhängig davon, wie viele Tiere bis zum Zeitpunkt der Beendigung getestet wurden) zu Ergebnis A zählt (2 oder mehr tote Tiere), wird nach der Klassifizierungsregel aus Anlage 2 für die feste Dosis 5 mg/kg vorgegangen (Kategorie 1 bei zwei oder mehr toten Versuchstieren bzw. Kategorie 2, wenn nur ein Tier stirbt). Zur Ergänzung wird in Anlage 4 die Klassifizierung im EU-System bis zur Einführung des neuen GHS erläutert.

1.5.3. **Hauptstudie**

1.5.3.1. *Anzahl der Versuchstiere und Dosierung*

Welche Maßnahmen nach dem Versuch mit der Anfangsdosierung durchgeführt werden sollen, ist den Flussdiagrammen in Anlage 2 zu entnehmen. In Betracht kommt jeweils eine von drei Maßnahmen: Versuch beenden und die entsprechende Gefahrenklassifikationsklasse zuweisen, mit einer höheren festen Dosis testen oder mit einer niedrigeren festen Dosis testen. Aus Tierschutzgründen wird jedoch eine Dosierung, die in der Sichtungsstudie zum Tod geführt hat, in der Hauptstudie nicht wiederholt (siehe Anlage 2). Die bisher gemachten Erfahrungen lassen als wahrscheinlichstes Ergebnis bei der Ausgangsdosierung vermuten, dass die Substanz ohne weitere Tests klassifiziert werden kann.

Im Normalfall werden für jede untersuchte Dosierung insgesamt fünf Tiere gleichen Geschlechts verwendet. Zu diesen fünf Tieren gehören ein Tier aus der Sichtungsstudie, dem die gewählte Dosierung verabreicht wurde, sowie vier weitere Tiere (außer wenn im Ausnahmefall eine in der Hauptstudie verwendete Dosierung in der Sichtungsstudie nicht enthalten war).

Der Zeitabstand zwischen den Versuchen mit der jeweiligen Dosierung richtet sich nach dem Einsetzen, der Dauer und dem Schweregrad der Toxizitätsanzeichen. Die Behandlung der Versuchstiere mit der nächsten Dosis sollte hinausgezögert werden, bis angenommen werden kann, dass die zuvor verwendeten Tiere überlebt haben. Bei Bedarf wird ein Abstand von drei bis vier Tagen zwischen den Versuchen mit den einzelnen Dosierungen empfohlen, um die Feststellung einer zeitverzögerten Toxizität zu ermöglichen. Dieser Zeitabstand kann nach Bedarf angepasst werden, wenn z. B. die beobachteten Reaktionen keine Schlussfolgerungen zulassen.

▼B

Wenn eine obere feste Dosis von 5 000 mg/kg in Erwägung gezogen wird, sollte verfahren werden, wie in Anlage 3 beschrieben (siehe auch Abschnitt 1.6.2).

1.5.3.2. *Limit-Test*

Der Limit-Test wird hauptsächlich dann eingesetzt, wenn die Person, die den Test durchführt, nach ihr vorliegenden Informationen annehmen kann, dass das zu testende Material wahrscheinlich nicht toxisch ist, d. h. nur oberhalb der in Vorschriften festgelegten Grenzdosen toxisch wirkt. Informationen über die Toxizität des Testmaterials können aus Kenntnissen über ähnliche getestete Verbindungen, Gemische oder Produkte gewonnen werden, wobei Art und Prozentanteil der Komponenten zu berücksichtigen sind, deren toxikologische Relevanz bekannt ist. In den Fällen, in denen nur wenige oder keine Informationen über die Toxizität des Testmaterials vorliegen oder in denen von einer Toxizität des Testmaterials ausgegangen wird, sollte der Haupttest durchgeführt werden.

Bei der normalen Vorgehensweise wird für den Limit-Test im Rahmen dieses Leitfadens eine Ausgangsdosis von 2 000 mg/kg (bzw. im Ausnahmefall 5 000 mg/kg) für die Sichtungsstudie verwendet; anschließend werden vier weitere Tiere dieser Dosis ausgesetzt.

1.6. BEOBACHTUNGEN

Die Tiere werden nach der Verabreichung einzeln beobachtet: mindestens einmal während der ersten 30 Minuten, in regelmäßigen Abständen während der ersten 24 Stunden, wobei die ersten vier Stunden besonders zu beachten sind, sowie anschließend täglich während einer Gesamtdauer von 14 Tagen, sofern die Tiere nicht aus Tierschutzgründen aus dem Versuch genommen und auf humane Weise gelötet werden müssen oder ihr Tod festgestellt wird. Die Beobachtungsdauer sollte nicht strikt festgelegt werden, sondern abhängig von den toxischen Reaktionen, vom Zeitpunkt des Einsetzens dieser Reaktionen und von der Länge der Erholungsdauer festgelegt werden und kann daher ausgedehnt werden, wenn dies erforderlich scheint. Der Zeitpunkt, zu dem die Anzeichen von Toxizität auftreten und wieder verschwinden, ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn eine Tendenz zur zeitlichen Verzögerung der Toxizitätsanzeichen besteht (11). Sämtliche Beobachtungen werden für die Tiere systematisch jeweils in Einzelprotokollen dokumentiert.

Zusätzliche Beobachtungen sind erforderlich, wenn bei den Tieren weiterhin Anzeichen für Toxizität zu beobachten sind. Die Beobachtungen sollten Veränderungen an Haut und Fell, Augen und Schleimhäuten erfassen und auch die Atmung, den Kreislauf, das vegetative und zentrale Nervensystem sowie somatomotorische Aktivitäten und Verhaltensmuster berücksichtigen. Auf Symptome wie Tremores, Krämpfe, Speichelfluss, Durchfall, Lethargie, Schlaf und Koma sollte geachtet werden. Die im Humane Endpoints Guidance Document (8) zusammengefassten Prinzipien und Kriterien sind zu berücksichtigen. Tiere, bei denen ein moribunder Zustand festgestellt wird, sowie Tiere, die starke Schmerzen haben oder anhaltende Anzeichen von schwerem Leiden zeigen, sollten auf humane Weise getötet werden. Wenn Tiere aus humanen Gründen getötet werden oder ihr Tod festgestellt wird, sollte der Todeszeitpunkt so genau wie möglich registriert werden.

1.6.1. **Körpergewicht**

Das Gewicht der einzelnen Tiere soll kurz vor der Verabreichung der Testsubstanz sowie spätestens eine Woche danach ermittelt werden. Gewichtsveränderungen sollen berechnet und registriert werden. Am Ende des Tests werden die überlebenden Tiere gewogen und anschließend auf humane Weise getötet.

▼B

1.6.2. **Pathologie**

Alle Versuchstiere (einschließlich der Tiere, die während des Tests sterben oder aus Tierschutzgründen aus der Studie genommen werden) sollen auf makrologische Veränderungen untersucht werden. Alle makrologischen Veränderungen sollen für jedes einzelne Tier registriert werden. Bei Tieren, die 24 oder mehr Stunden lang überlebt haben, kann auch eine mikroskopische Untersuchung von Organen mit makropathologischen Befunden in Erwägung gezogen werden, da sich hieraus eventuell nützliche Informationen gewinnen lassen.

2. **DATEN**

Es sollen Daten zu den einzelnen Tieren bereitgestellt werden. Darüber hinaus sollen sämtliche Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden, wobei für jede Testgruppe die folgenden Daten zu erfassen sind; Anzahl der verwendeten Tiere, Anzahl der Tiere mit Anzeichen für eine toxische Wirkung, Anzahl der Tiere, deren Tod während des Versuchs festgestellt wurde oder die aus humanen Gründen getötet wurden, Todeszeitpunkt der einzelnen Tiere, Beschreibung und Zeitverlauf der toxischen Wirkungen und ihrer Reversibilität sowie pathologische Befunde.

3. **BERICHT**

3.1. TESTBERICHT

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten (soweit angemessen):

Testsubstanz:

— physikalische Beschaffenheit, Reinheit und, sofern relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften (einschließlich Isomerisierung),

— Identifizierungsdaten, einschließlich CAS-Nummer.

Vehikel (wenn verwendet):

— Begründung für die Auswahl des Vehikels (außer bei Wasser).

Versuchstiere:

— verwendete Spezies/Stamm,

— mikrobiologischer Zustand der Tiere, sofern bekannt,

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere (gegebenenfalls mit Begründung für den Einsatz von männlichen statt weiblichen Tieren),

— Bezugsquelle der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.

Testbedingungen:

— Angaben über die Zubereitung der Testsubstanz, einschließlich Angaben über die physikalische Beschaffenheit des verabreichten Stoffs,

— Angaben über die Verabreichung der Testsubstanz, einschließlich Applikationsvolumen und Zeitpunkt der Verabreichung,

— Angaben zur Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/-Herkunft des Futters, Herkunft des Wassers),

— Begründung für die Wahl der Startdosis.

▼B

Ergebnisse:

— tabellarische Erfassung der erhobenen Daten und der Dosis für jedes einzelne Tier (d. h. Tiere, die Anzeichen für Toxizität zeigen, einschließlich Mortalität sowie Art, Schweregrad und Dauer der Wirkungen),

— tabellarische Erfassung des Körpergewichts und der Änderungen des Körpergewichts,

— Gewicht der einzelnen Tiere am Tag der Verabreichung, danach in wöchentlichen Abständen sowie am Tag des Todes bzw. der Tötung,

— Datum und Uhrzeit des Todes, sofern vor der planmäßigen Tötung eingetreten,

— zeitlicher Verlauf des Einsetzens von Toxizitätsanzeichen sowie Angabe, ob diese reversibel waren (für jedes Tier gesondert),

— Obduktionsergebnisse und histopathologische Ergebnisse für jedes einzelne Tier (wenn vorhanden).

Diskussion und Interpretation der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

4. **LITERATUR**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987), Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walter, AP. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical $LD_{50}$ test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Cumow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Human Exptl. Toxicol., 21, 183-196.

(7) OECD (200l). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

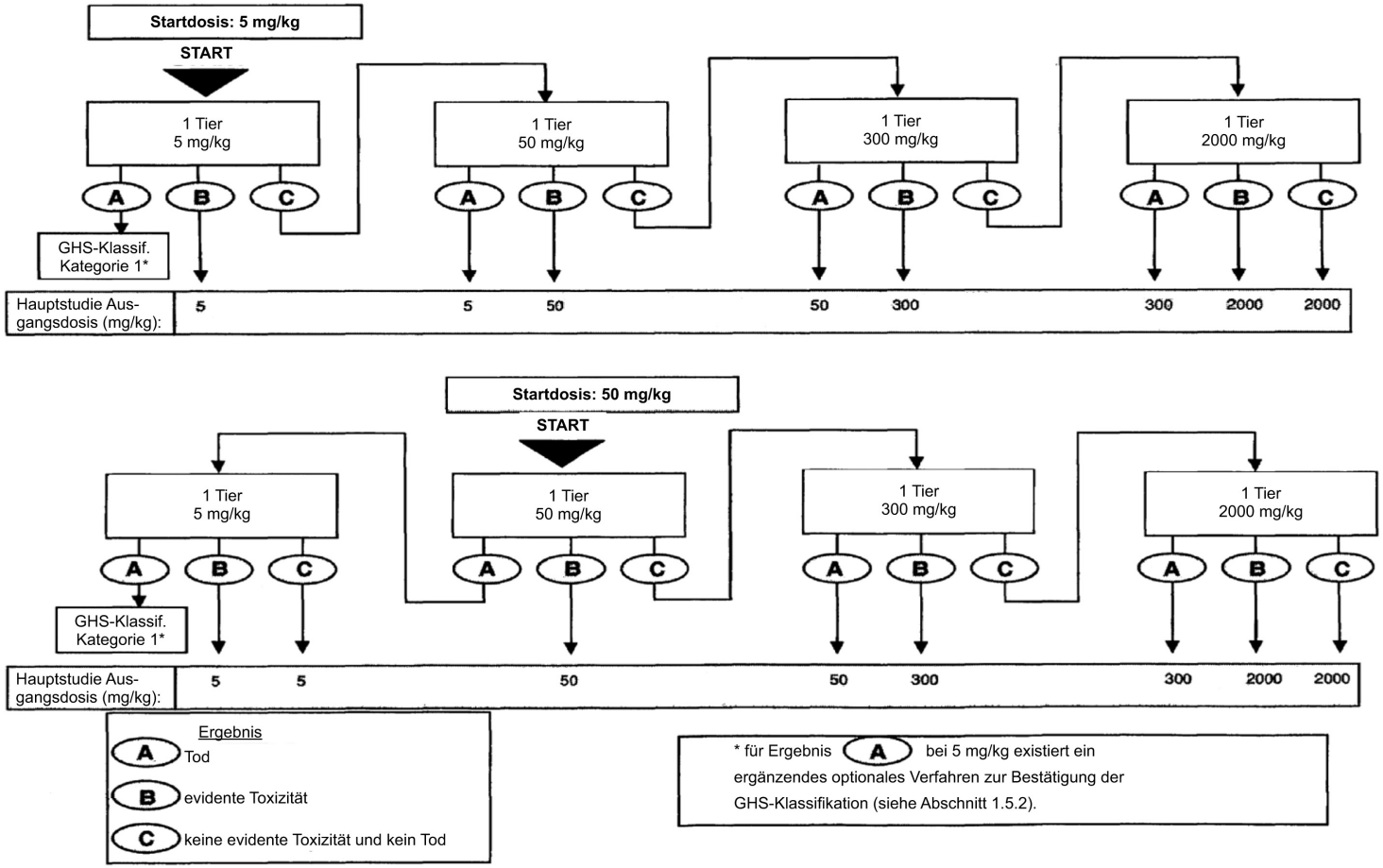
(9) OECD (1998), Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, S. 11 (http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygener; d/0,3380,EN- documents-521-14-no-24-no-0,FF.html).

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N.; Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional $LD_{50}$, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

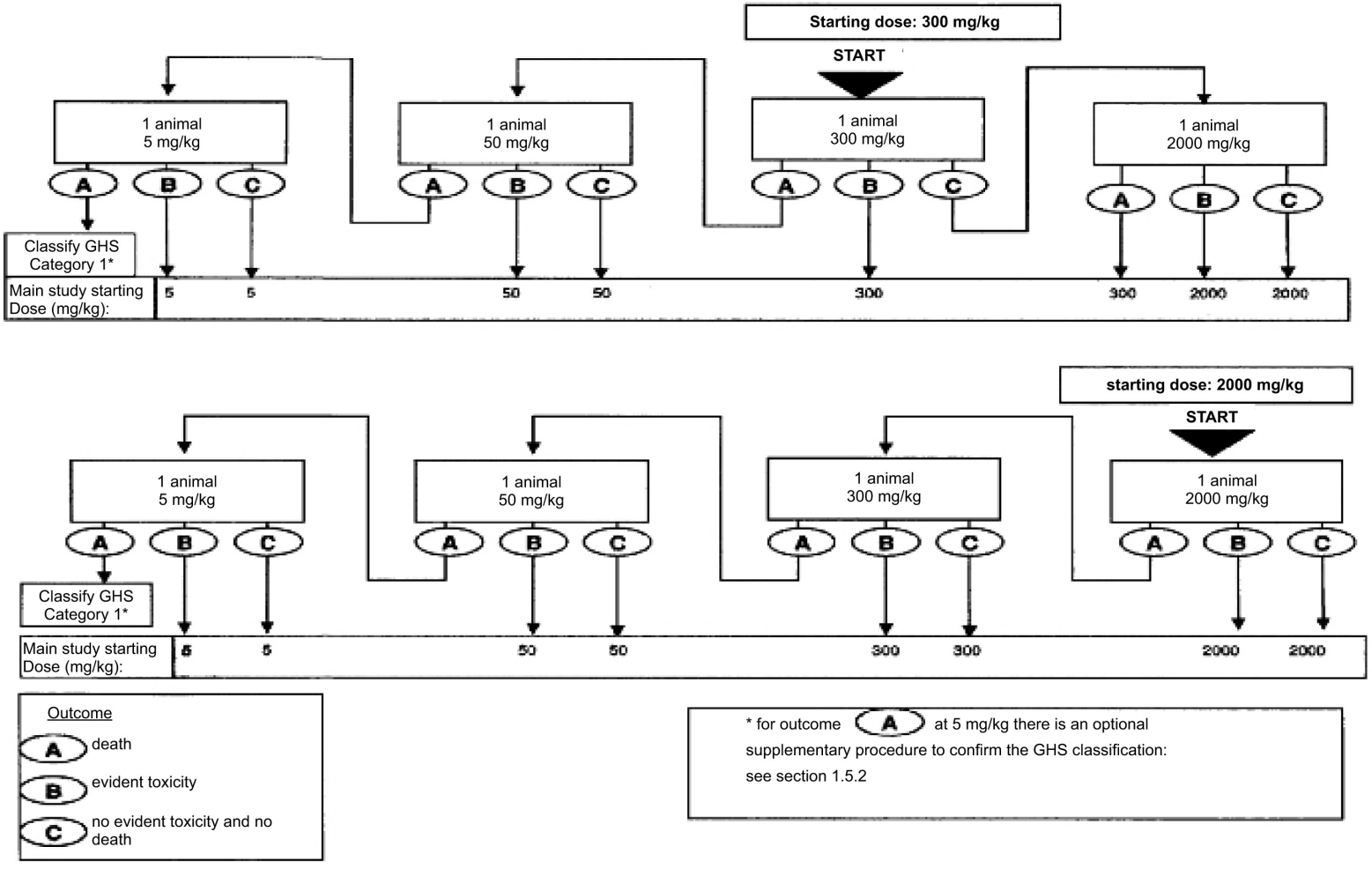
(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd, New York, USA.

*Anlage 1*

## PRÜFVERFAHREN FÜR DIE VORSTUDIE

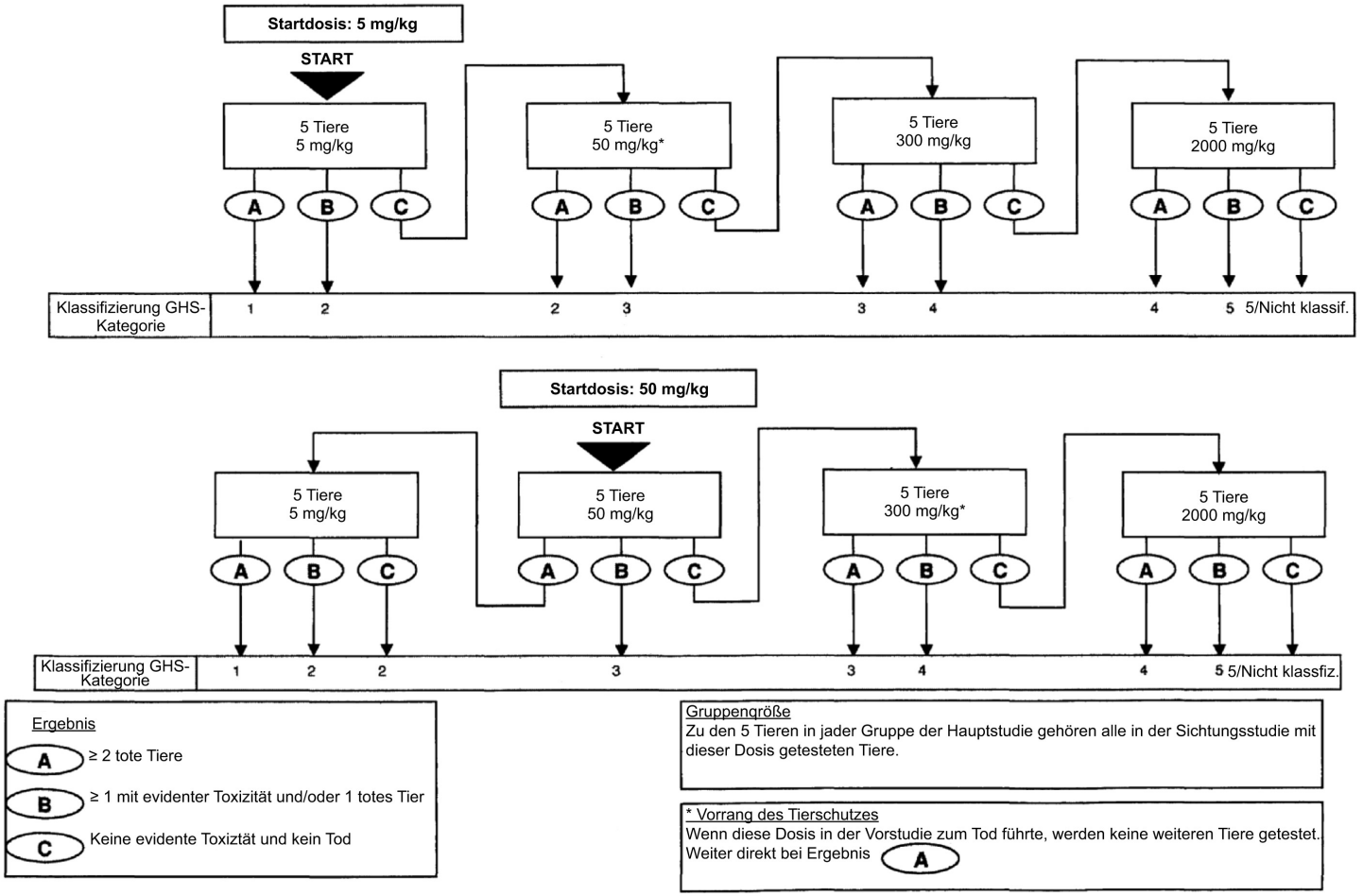


▼B

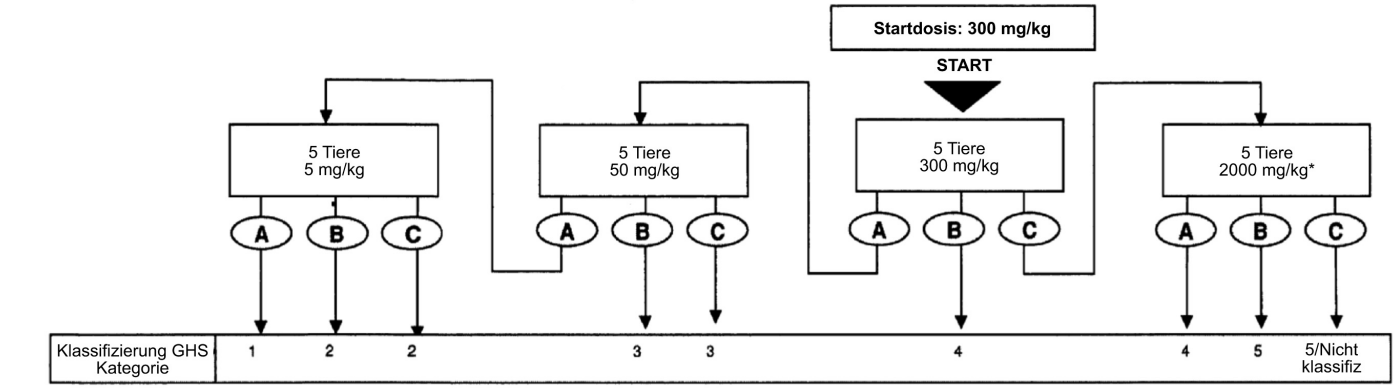

Starting dose: 300 mg/kg
START
1 animal
5 mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2000 mg/kg
A
B
C
Classify GHS
Category 1*
Main study starting
Dose (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
starting dose: 2000 mg/kg
START
1 animal
5 mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2000 mg/kg
A
B
C
Classify GHS
Category 1*
Main study starting
Dose (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Outcome
A
death
B
evident toxicity
C
no evident toxicity and no
death
* for outcome A at 5 mg/kg there is an optional
supplementary procedure to confirm the GHS classification:
see section 1.5.2

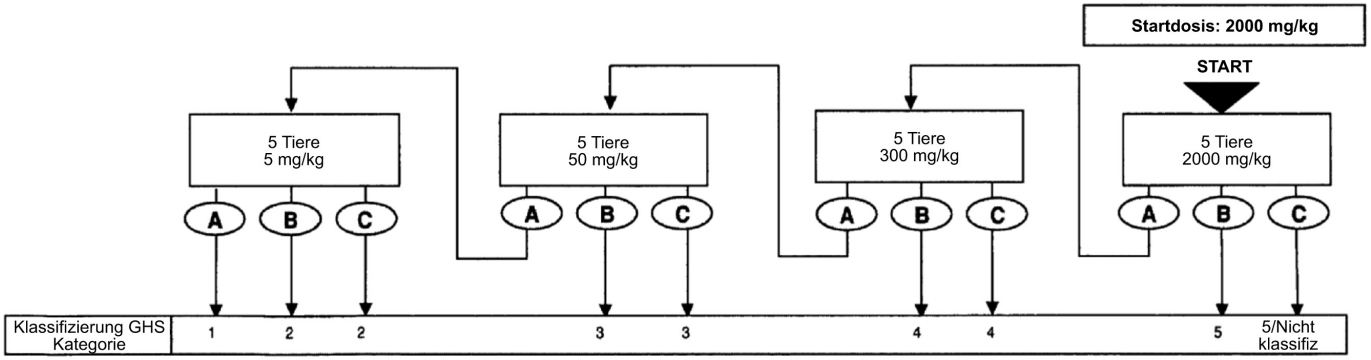
*Anlage 2*

## PRÜFVERFAHREN FÜR DIE HAUPTSTUDIE



▼B




Ergebnis

A ≥ 2 tote Tiere

B ≥ 1 Tier mit evidenter Toxizität und/oder 1 totes Tier

C Keine evidente Toxizität und kein Tod

Gruppenqröße

Zu den 5 Tieren in jeder Gruppe der Hauptstudie gehören alle in der Vorstudie mit dieser Dosis getesteten Tiere:

* Vorrang des Tierschutzes

Wenn diese Dosis in der Vorstudie zum Tod führte, werden keine weiteren Tiere gelestet. Weiter direkt bei Ergebnis A.

▼B

*Anlage 3*

**KRITERIEN FÜR DIE KLASSIFIZIERUNG VON TESTSUBSTANZEN MIT ERWARTETEN $LD_{50}$-WERTEN ÜBER 2 000 MG/KG OHNE ERFORDERLICHE TESTS**

Die Kriterien für die Gefahrenkategorie 5 sollen die Identifikation von Testsubstanzen ermöglichen, die eine vergleichsweise geringe akute Toxizitätsgefahr aufweisen, aber unter bestimmten Umstanden eine Gefahr für anfällige Bevölkerungsgruppen darstellen. Bei diesen Substanzen wird von einer oralen oder dermalen $LD_{50}$ im Bereich 2 000-5 000 mg/kg bzw. von vergleichbaren Dosen für andere Verabreichungswege ausgegangen. Die Testsubstanzen sollte in den folgenden Fällen in die Gefahrenkategorie 2 000 mg/kg < $LD_{50}$ < 5 000 mg/kg (GHS-Kategorie 5) eingestuft werden:

a) wenn eines der Prüfschemata aus Anlage 2 aufgrund von Mortalitätsfällen dieser Kategorie zuzuordnen ist;

b) wenn bereits zuverlässige Erkenntnisse dafür vorliegen, dass der $LD_{50}$-Wert im Bereich der Kategorie 5 liegt, oder wenn andere Tierversuche oder toxische Wirkungen auf Menschen akute Folgen für die menschlichen Gesundheit erwarten lassen;

c) wenn nach Extrapolierung, Schätzung oder Messung von Daten die Zuordnung zu einer höheren Gefahrenklasse nicht gerechtfertigt ist und

   — zuverlässige Informationen vorliegen, die auf signifikante toxische Wirkungen beim Menschen hinweisen, oder

   — Mortalitäten bei oraler Verabreichung in Versuchen mit Dosen bis zu der Kategorie 4 auftreten, oder

   — eine fachkundige Beurteilung bei Versuchen mit Dosierungen bis zu den in Kategorie 4 genannten Werten signifikante klinische Toxizitätsanzeichen bestätigt (außer Durchfall, Haaraufrichtung oder zerzaustes Fell), oder

   — eine fachkundige Beurteilung verlässliche Informationen bestätigt, die aus den anderen Tierversuchen ein Potenzial für signifikante akute Wirkungen erkennen lassen.

**VERSUCHE MIT DOSEN ÜBER 2 000 mg/kg**

In Ausnahmefällen — und nur, wenn dies durch konkrete Vorschriften begründet ist — kann die Anwendung einer weiteren festen oberen Dosis von 5 000 mg pro kg Körpergewicht in Erwägung gezogen werden. Aus Tierschutzgründen wird von Versuchen mit 5 000 mg/kg abgeraten; diese Versuche sollen nur dann in Erwägung gezogen werden, wenn die Ergebnisse eines solchen Versuchs für den Schulz der Gesundheit von Menschen oder Tieren oder der Umwelt mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt relevant sind (9).

**Vorstudie**

Die Entscheidungsgrundlagen für das in Anlage 1 vorgestellte sequenzielle Verfahren werden auf eine Dosis von 5 000 mg/kg erweitert: Wenn eine Startdosis von 5 000 mg/kg für die Vorstudie verwendet wird, bedingt Ergebnis A (Tod) den Test eines zweiten Tieres mit 2 000 mg/kg; die Ergebnisse B und C (evidente Toxizität oder keine Toxizität) führen zum Einsatz von 5 000 mg/kg als Startdosis für die Hauptstudie. Analog wird bei Verwendung einer anderen Startdosis als 5 000 mg/kg der Versuch mit 5 000 mg/kg fortgesetzt, wenn bei 2 000 mg/kg Ergebnis B oder C eintritt; wenn anschließend bei 5 000 mg/kg Ergebnis A eintritt, bedingt dies eine Startdosis von 2 000 mg/kg bei der Hauptstudie, während die Ergebnisse B und C zu einer Startdosis von 5 000 mg/kg bei der Hauptstudie führen.

▼B

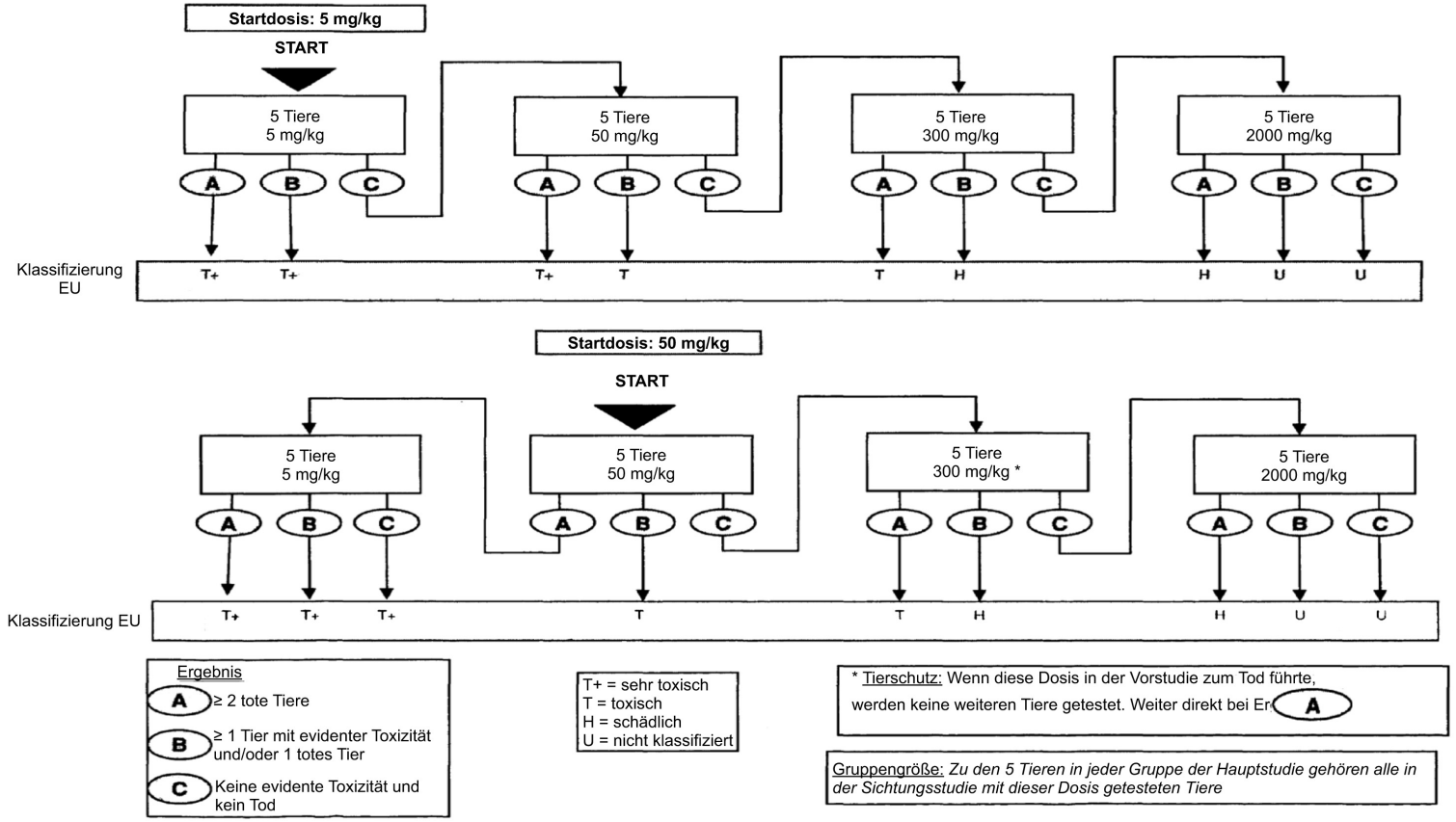
**Hauptstudie**

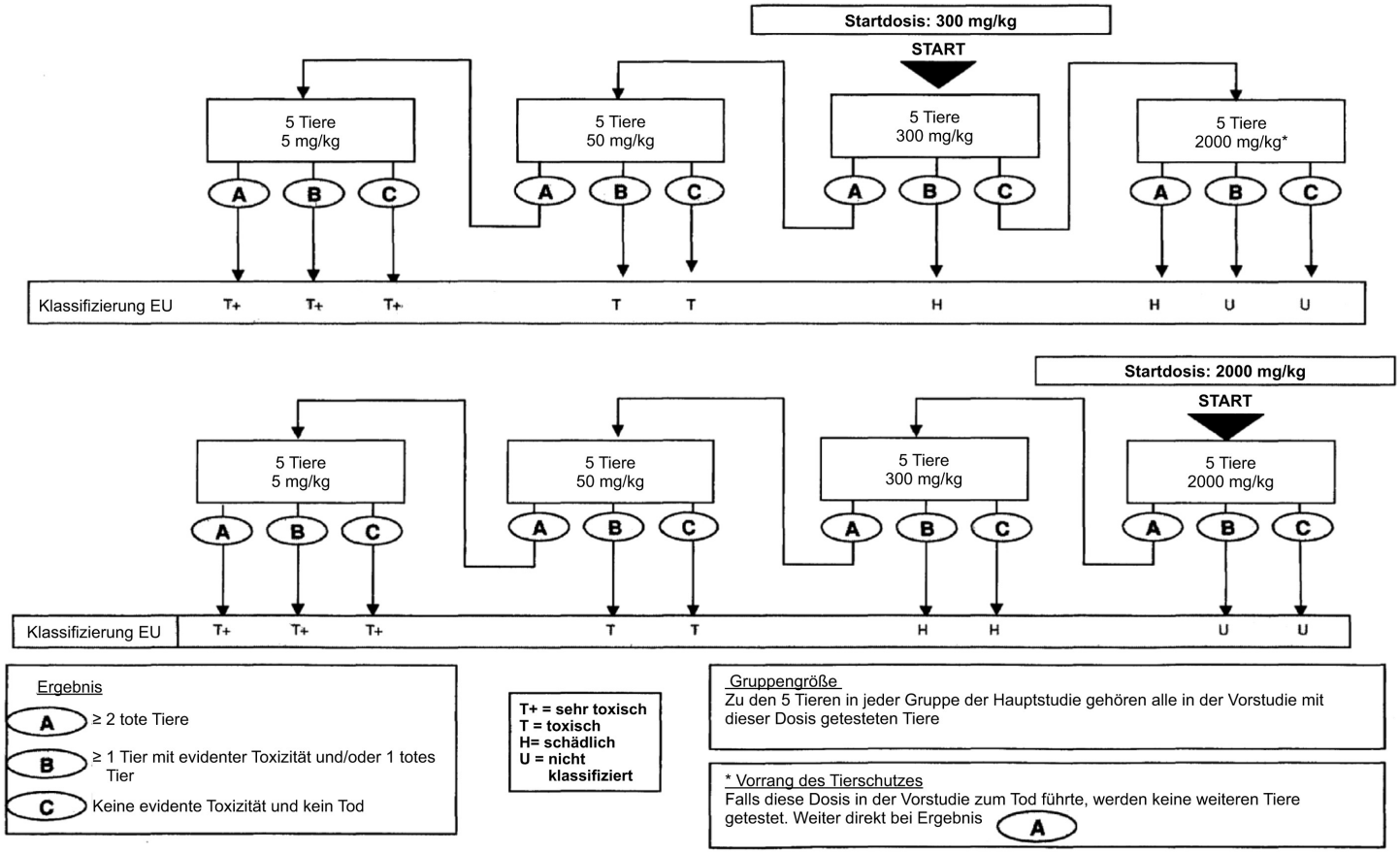
Die Entscheidungsgrundlagen für das in Anlage 2 vorgestellte sequenzielle Verfahren werden auf eine Dosierung von 5 000 mg/kg erweitert: Wenn in der Hauptstudie eine Startdosis von 5 000 mg/kg verwendet wird, ist bei Ergebnis A (≥ 2 tote Versuchstiere) eine zweiten Gruppe mit 2 000 mg/kg zu testen; die Ergebnisse B (evidente Toxizität und/oder ≤ 1 totes Versuchstier) oder C (keine Toxizität) fuhren dazu, dass die Substanz keine Klassifizierung gemäß GHS erhält. Analog wird bei Verwendung einer anderen Startdosis als 5 000 mg/kg der Versuch mit 5 000 mg/kg fortgesetzt, wenn bei 2 000 mg/kg Ergebnis C eintritt; führt eine Gabe von 5 000 mg/kg zu Ergebnis A, wird die Substanz GHS-Kategorie 5 zugewiesen; bei den Ergebnissen B und C wird die Substanz nicht klassifiziert.

*Anlage 4*

## PRÜFMETHODE B.1 bis

**Anleitung für die Klassifizierung gemäß dem EU-System zur Überbrückung des Übergangszeitraums bis zur vollständigen Umsetzung des „Globalen Harmonisierten Systems“ (GHS) (Auszug aus Literaturhinweis (8))**




Startdosis: 300 mg/kg
START
5 Tiere 5 mg/kg
5 Tiere 50 mg/kg
5 Tiere 300 mg/kg
5 Tiere 2000 mg/kg*
A B C
Klassifizierung EU T+ T+ T+ T T H H U U
Startdosis: 2000 mg/kg
START
5 Tiere 5 mg/kg
5 Tiere 50 mg/kg
5 Tiere 300 mg/kg
5 Tiere 2000 mg/kg
Klassifizierung EU T+ T+ T+ T T H H U U
Ergebnis
A ≥ 2 tote Tiere
B ≥ 1 Tier mit evidenter Toxizität und/oder 1 totes Tier
C Keine evidente Toxizität und kein Tod
T+ = sehr toxisch
T = toxisch
H= schädlich
U = nicht klassifiziert
Gruppengröße
Zu den 5 Tieren in jeder Gruppe der Hauptstudie gehören alle in der Vorstudie mit dieser Dosis getesteten Tiere
* Vorrang des Tierschutzes
Falls diese Dosis in der Vorstudie zum Tod führte, werden keine weiteren Tiere getestet. Weiter direkt bei Ergebnis A

▼B

B.1.tris. **AKUTE ORALE TOXIZITÄT — AKUT-TOXISCHE KLASSENMETHODE**

1. **METHODE**

Diese Prüfmethode entspricht der OECD TG 423 (2001).

1.1. EINLEITUNG

Die hier beschriebene Akut-Toxische Klassenmethode (1) besteht aus einem schrittweisen Verfahren, bei dem pro Einzelschritt jeweils drei Tiere des gleichen Geschlechts verwendet werden. Je nach Mortalität und/oder moribundem Zustand der Tiere können im Mittel zwei bis vier Schritte erforderlich sein, um eine Beurteilung der akuten Toxizität der Testsubstanz zu ermöglichen. Dieses Verfahren ist reproduzierbar, erfordert nur sehr wenige Tiere und ermöglicht eine gleichartige Bewertung der Substanzen wie andere Methoden zur Prüfung der akuten Toxizität. Die Akut-Toxische Klassenmethode basiert auf biometrischen Berechnungen (2) (3) (4) (5) mit festgesetzten Dosen, die sich hinreichend unterscheiden, um die Einordnung einer Substanz zu Klassifizierungszwecken und zur Bewertung des Gefährdungspotenzials zu ermöglichen. Die Methode, wie sie 1996 anerkannt wurde, wurde durch umfassende *In-vivo*-Versuche im Vergleich mit $LD_{50}$-Daten aus der Literatur sowohl auf nationaler (6) als auch auf internationaler (7) Ebene validiert.

Leitlinien für die Auswahl der geeignetsten Testmethode für einen bestimmten Zweck enthält das Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8). Dieser Leitfaden beinhaltet darüber hinaus weitere Informationen zur Durchführung und Auswertung der Prüfmethode B.1 tris.

Testsubstanzen sind nicht in Dosen zu verabreichen, wenn diese aufgrund ätzender oder stark reizender Wirkungen bekanntermaßen starke Schmerzen und schweres Leiden verursachen. Moribunde Tiere oder Tiere, die offensichtlich unter Schmerzen leiden oder Anzeichen von schwerem und anhaltendem Leiden zeigen, sind auf humane Weise zu töten und werden bei der Auswertung der Testergebnisse auf die gleiche Weise gewertet wie während des Tests gestorbene Tiere. Kriterien für die Entscheidung, moribunde oder schwer leidende Tiere zu töten, sowie Hinweise zur Erkennung des absehbaren oder bevorstehenden Todes sind Gegenstand eines gesonderten Leitfadens (9).

Die Methode beruht auf festgesetzten Dosen, und die Ergebnisse ermöglichen die Bewertung und Klassifizierung von Substanzen gemäß dem Globalen Harmonisierten System (GHS) zur Klassifizierung chemischer Stoffe mit akut-toxischen Wirkungen (10).

Vom Prinzip her ist die Methode nicht zur Berechnung eines exakten $LD_{50}$-Wertes geeignet, sondern zur Bestimmung definierter Expositionsbereiche, in denen eine Letalität auftreten kann, da der Tod eines Teils der Tiere noch immer den wichtigsten Endpunkt dieser Methode darstellt. Ein $LD_{50}$-Wert kann nur dann mit dieser Methode bestimmt werden, wenn mindestens zwei Dosen zu einer Mortalität von über 0 %, aber unter 100 % führen. Die Auswahl von festgesetzten Dosen unabhängig von der Testsubstanz zusammen mit der Koppelung an eine Anzahl von Tieren in unterschiedlichem Zustand an eine Klassifizierung verbessert die Konsistenz und die Reproduzierbarkeit zwischen den Laboratorien.

▼B

Das Prüflabor soll vor der Durchführung der Studie sämtliche verfügbaren Informationen berücksichtigen. Zu diesen Informationen gehören die Identität und die chemische Struktur der Substanz, ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, das Ergebnis anderer *In-vivo*- oder *In-vitro*-Toxizitätstests der betreffenden Substanz, toxikologische Daten über die strukturverwandten Substanzen sowie die vorgesehene(n) Verwendung(en) der Substanz. Diese Informationen werden benötigt, um die zuständigen Stellen zu überzeugen, dass der Test für den Schutz der menschlichen Gesundheit wichtig ist und bei der Wahl der geeigneten Startdosis hilft.

1.2. DEFINITIONEN

**Akute orale Toxizität:** Schädliche Wirkungen, die nach der oralen Verabreichung einer Einzeldosis oder mehrerer innerhalb von 24 Stunden verabreichter Dosen einer Substanz auftreten.

**Verzögerter Tod:** Das betreffende Tier stirbt zwar nicht binnen 48 Stunden und wirkt in diesem Zeitraum nicht moribund; der Tod tritt jedoch später während des 14-tägigen Beobachtungszeitraums ein.

**Dosis:** Verabreichte Menge der Testsubstanz; die Dosis wird als Gewicht der Testsubstanz pro Gewichtseinheit des Versuchstiers ausgedrückt (z. B. mg/kg).

**GHS:** Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (Weltweit harmonisiertes Klassifizierungssystem für chemische Substanzen und Gemische); ein gemeinsames Projekt von OECD (Menschliche Gesundheit und Umwelt), UN-Expertenausschuss für den Transport von Gefahrgütern (physikalisch-chemische Eigenschaften) und ILO (Gefahrenanzeige) koordiniert im Rahmen des Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

**Bevorstehender Tod:** Der moribunde Zustand oder Tod ist vor dem nächsten vorgesehenen Beobachtungszeitpunkt zu erwarten. Anzeichen für diesen Zustand können bei Nagetieren Krämpfe, Seitenlage, liegende Stellung und Tremores sein (siehe Humane Endpoint Guidance Document (9)).

**$LD_{50}$ (mittlere orale Letaldosis):** Eine statistisch ermittelte Einzeldosis einer Substanz, bei der davon ausgegangen werden kann, dass sie bei oraler Verabreichung den Tod von 50 % der Tiere verursacht; der $LD_{50}$-Wert wird als Gewicht der Testsubstanz pro Gewichtseinheit der Versuchstiere ausgedrückt (mg/kg).

**Limit-Dosis:** Dosis am oberen Grenzwert für den betreffenden Versuch (2 000 oder 5 000 mg/kg).

**Moribunder Zustand:** Zustand des Sterbens oder des Unvermögens, (selbst bei Behandlung) zu überleben (siehe Humane Endpoint Guidance Document (9)).

**Voraussagbarer Tod:** Vorhandensein klinischer Zeichen, die auf den Eintritt des Todes zu einem bekannten Zeitpunkt in der Zukunft — vor dem planmäßigen Ende des Experiments — hinweisen, z. B. das Unvermögen, Wasser oder Nahrung aufzunehmen (siehe Humane Endpoint Guidance Document (9)).

▼B

1.3. PRINZIP DER PRÜFMEHODE

Das Versuchsprinzip besteht darin, in einem schrittweisen Verfahren bei Verwendung einer minimalen Anzahl von Tieren pro Einzelschritt genügend Informationen über die akute Toxizität der Testsubstanz zu gewinnen, um ihre Klassifizierung zu ermöglichen, Die Substanz wird einer Gruppe von Versuchstieren oral mit einer der festgelegten Dosen verabreicht. Die Substanz wird in einem schrittweisen Verfahren getestet, wobei für jeden Schritt jeweils drei Tiere des gleichen Geschlechts (normalerweise weibliche Tiere) verwendet werden. Das Eintreten oder Nichteintreten von prüfsubstanzbedingten Todesfällen bei dem in einem Schritt behandelten Tieren bestimmt über den nächsten Schritt, d. h.:

— ob keine weiteren Tests erforderlich sind,

— ob drei weitere Tiere mit der gleichen Dosis zu behandeln sind,

— ob der nächste Schritt an drei weiteren Tieren mit der nächsthöheren oder nächstniedrigeren Dosis durchzuführen ist.

In Anlage 1 ist die Testmethode im Einzelnen beschrieben. Die Methode ermöglicht die Beurteilung, eine Testsubstanz innerhalb einer Reihe von Toxizitätsklassen einzuordnen, die durch feste $LD_{50}$-Abgrenzungswerte definiert sind.

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Auswahl der Tierspezies**

Die bevorzugte Nagetierspezies ist die Ratte, es können aber auch andere Spezies verwendet werden. In der Regel werden weibliche Tiere verwendet (9). Weibliche Tiere werden bevorzugt, da die in der Literatur zitierten Untersuchungen zu konventionellen $LD_{50}$-Tests zwischen den Geschlechtern in der Regel nur geringfügige Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit belegen, in den Fällen, in denen Unterschiede beobachtet werden, jedoch zeigen, dass weibliche Tiere im Allgemeinen etwas empfindlicher sind (11). Wenn jedoch die vorhandenen Informationen über die toxikologischen oder toxikokinetischen Eigenschaften von strukturverwandten Chemikalien darauf hinweisen, dass vermutlich die männlichen Tiere empfindlicher sind, sollten männliche Tiere verwendet werden. Wenn der Versuch an männlichen Tieren durchgeführt wird, sollte dies hinreichend begründet werden.

Es sollen junge, gesunde, ausgewachsene Tiere aus üblicherweise eingesetzten Laborstämmen verwendet werden. Die weiblichen Tiere dürfen weder bereits geworfen haben noch momentan trächtig sein. Alle Tiere müssen zu Beginn der Verabreichung zwischen 8 und 12 Wochen all sein; ihre Gewichtswerte müssen im Bereich von ± 20 % des mittleren Gewichts sämtlicher zuvor verwendeter Tiere liegen.

1.4.2. **Haltung und Fütterung**

Die Temperatur im Versuchstierraum soll 22 °C (± 3 °C) betragen. Die Temperatur des Versuchstierraums soll 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit soll mindestens 30 % betragen und außer während der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen; anzustreben ist ein Wert von 50-60 %. Der Raum soll künstlich beleuchtet sein, wobei die Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus ein- und ausgeschaltet werden soll. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Tiere können in den Käfigen nach Verabreichungsdosen gruppiert werden, wobei aber die Anzahl der Tiere pro Käfig noch eine genaue Beobachtung der einzelnen Tiere ermöglichen muss.

▼B

1.4.3. **Vorbereitung der Versuchstiere**

Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zwecks Identifizierung markiert und für die Dauer von mindestens 5 Tagen vor Versuchsbeginn in ihren Käfigen gehalten, damit sie sich an die Laborbedingungen gewöhnen können.

1.4.4. **Vorbereitung der Dosen**

Generell sollen die Testsubstanzen mit einem für den gesamten zu testenden Dosierungsbereich gleichbleibenden Volumen verabreicht werden, indem jeweils die Konzentration der Dosiszubereitung variiert wird. Wenn jedoch ein flüssiges Endprodukt oder Gemisch zu testen ist, kann die Anwendung der unverdünnten, d. h. mit gleichbleibender Konzentration verabreichten Testsubstanz für die anschließende Risikobewertung der betreffenden Substanz größere Relevanz haben und wird daher von verschiedenen Behörden vorgeschrieben. In jedem Fall darf das maximal zu verabreichende Dosisvolumen nicht überschritten werden. Welches Flüssigkeitsvolumen jeweils höchstens auf einmal verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Bei Nagetieren soll das Volumen im Normalfall 1 ml pro 100 g Körpergewicht nicht überschreiten; bei wässrigen Lösungen können aber auch 2 ml pro 100 g Körpergewicht in Betracht gezogen werden. Bezüglich der Formulierung wird, wenn dies möglich ist, eine wässrige Lösung/Suspension/Emulsion empfohlen, danach in der Reihenfolge der Präferenz eine Lösung/Suspension/Emulsion in Öl (z. B. Maisöl) sowie an dritter Stelle eventuell eine Lösung in anderen Vehikeln. Bei anderen Vehikeln als Wasser sollen die toxikologischen Eigenschaften des jeweiligen Vehikels bekannt sein. Die Dosen dürfen erst kurz vor der Verabreichung zubereitet werden, sofern die Zubereitung über den Zeitraum, in dem sie angewandt werden soll, nicht bekanntermaßen eine annehmbare Stabilität aufweist.

1.5. VERFAHRENSWEISE

1.5.1. **Verabreichung der Dosen**

Die Testsubstanz wird als Einzeldosis mit einer Sonde über einen Magensonde oder über eine geeignete Intubationskanüle verabreicht. In dem seltenen Fall, dass die Verabreichung als Einzeldosis nicht möglich ist, kann die Dosis über einen Zeitraum von maximal 24 Stunden in kleineren Teilmengen verabreicht werden.

Die Versuchstiere sollten vor der Verabreichung nüchtern sein (z. B. sollte Ratten das Futter (nicht das Wasser) über Nacht vorenthalten werden; Mäusen sollte das Futter (nicht das Wasser) 3-4 Stunden zuvor vorenthalten werden). Nach diesem Futterentzug sollen die Tiere gewogen werden und die Testsubstanz verabreicht bekommen. Nach der Verabreichung der Substanz kann das Futter bei Ratten weitere 3-4 Stunden bzw. bei Mäusen weitere 1-2 Stunden zurückgehalten werden. Wenn die Dosis über einen bestimmten Zeitraum hinweg in Teilmengen verabreicht wird, kann es je nach Länge dieses Zeitraums erforderlich sein, die Tiere mit Futter und Wasser zu versorgen.

1.5.2. **Anzahl der Versuchstiere und Dosierung**

Für jeden Schritt werden drei Tiere verwendet. Die als Ausgangsdosis zu verwendende Dosis wird aus vier festen Dosiswerten gewählt: 5, 50, 300 und 2 000 mg pro kg Körpergewicht. Als Startdosis soll die Dosis gewählt werden, die mit der größten Wahrscheinlichkeit zur Mortalität einiger der behandelten Tiere führt. Die Prüfschemata in Anlage 1 beschreiben für jede dieser Ausgangsdosen die jeweils zu befolgende Vorgehensweise. Zur Ergänzung wird in Anlage 4 die Klassifizierung im EU-System bis zur Einführung des neuen GHS erläutert.

▼B

Wenn bereits verfügbare Informationen vermuten lassen, dass bei der höchsten Startdosis (2 000 mg pro kg Körpergewicht) keine Mortalität zu erwarten ist, soll ein Limit-Test durchgeführt werden. Wenn für eine zu testende Substanz keine Informationen zur Verfügung stehen, wird aus Tierschutzgründen empfohlen, als Ausgangsdosis 300 mg pro kg Körpergewicht zu verwenden.

Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen richtet sich nach dem Einsetzen, der Dauer und dem Schweregrad der toxischen Zeichen. Die Behandlung der Versuchstiere mit der nächsten Dosis soll so lange abgewartet werden, bis angenommen werden kann, dass die zuvor behandelten Tiere überleben.

In Ausnahmefällen — und nur, wenn dies durch konkrete Vorschriften begründet ist — kann die Anwendung einer weiteren oberen Dosis von 5 000 mg pro kg Körpergewicht in Erwägung gezogen werden (siehe Anlage 2). Aus Tierschutzgründen wird von Tierversuchen im Bereich der GHS-Kategorie 5 (2 000 - 5 000 mg/kg) abgeraten; diese Versuche sollen nur dann in Betracht gezogen werden, wenn die Ergebnisse eines solchen Tests für den Schutz der Gesundheit von Menschen oder Tieren oder der Umwelt mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt relevant wären.

1.5.3. **Limit-Test**

Der Limit-Test wird hauptsächlich dann eingesetzt, wenn die Person, die den Test durchführt, nach ihr vorliegenden Informationen davon ausgehen kann, dass das zu testende Material wahrscheinlich nicht toxisch ist, d. h. nur oberhalb der regulatorisch festgelegten Grenzdosen toxisch wirkt. Informationen über die Toxizität des Testmaterials können aus Kenntnissen über ähnliche getestete Verbindungen, Mischungen oder Produkte gewonnen werden, wobei Art und Prozentanteil der Komponenten zu berücksichtigen sind, deren toxikologische Relevanz bekannt ist. In den Fällen, in denen nur wenige oder keine Informationen über die Toxizität des Testmaterials vorliegen oder in denen von einer Toxizität des Testmaterials ausgegangen wird, sollte der Haupttest durchgeführt werden.

Ein Limit-Test mit einer Dosis von 2 000 mg pro kg Körpergewicht kann mit sechs Tieren durchgeführt werden (drei Tiere pro Schritt). In Ausnahmefällen kann ein Limit-Test mit einer Dosis von 5 000 mg/kg mit drei Tieren durchgeführt werden (siehe Anlage 2). Wenn eine mit der Testsubstanz in Zusammenhang stehende Mortalität ermittelt wird, müssen eventuell weitere Prüfungen mit der nächstniedrigeren Dosis durchgeführt werden.

1.6. BEOBACHTUNGEN

Die Tiere werden nach der Verabreichung einzeln beobachtet: mindestens einmal während der ersten 30 Minuten, in regelmäßigen Abständen während der ersten 24 Stunden, wobei die ersten vier Stunden besonders zu beachten sind, sowie anschließend täglich während einer Gesamtdauer von 14 Tagen, sofern die Tiere nicht aus Tierschutzgründen aus dem Versuch genommen und auf humane Weise getötet werden müssen oder ihr Tod festgestellt wird. Die Beobachtungsdauer sollte jedoch nicht strikt festgelegt werden; vielmehr sollte sie in Abhängigkeit von den toxischen Reaktionen, vom Zeitpunkt des Einsetzens dieser Reaktionen und von der Länge der Erholungsdauer festgelegt werden und kann daher ausgedehnt werden, wenn dies erforderlich scheint. Der Zeitpunkt, zu dem die Anzeichen von Toxizität auftreten und wieder verschwinden, ist von Bedeutung, und zwar insbesondere dann, wenn eine Tendenz zur zeitlichen Verzögerung der Toxizitätsanzeichen besteht (12). Sämtliche Beobachtungen werden für die Tiere systematisch jeweils in Einzelprotokollen dokumentiert.

▼B

Zusätzliche Beobachtungen sind erforderlich, wenn bei den Tieren weiterhin Anzeichen für Toxizität zu beobachten sind. Die Beobachtungen sollten Veränderungen an Haut und Fell, Augen und Schleimhäuten erfassen und auch die Atmung, den Kreislauf, das vegetative und zentrale Nervensystem sowie somatomotorische Aktivitäten und Verhaltensmuster berücksichtigen. Auf Beobachtungen wie Tremores, Krämpfe, Speichelfluss, Durchfall, Lethargie, Schlaf und Koma sollte geachtet werden. Die im Humane Endpoints Guidance Document (9) zusammengefassten Prinzipien und Kriterien sind zu berücksichtigen. Tiere, bei denen ein moribunder Zustand festgestellt wird, sowie Tiere, die starke Schmerzen haben oder anhaltende Anzeichen von schwerem Leiden zeigen, sollten auf humane Weise getötet werden. Wenn Tiere aus humanen Gründen getötet werden oder ihr Tod festgestellt wird, sollte der Todeszeitpunkt so genau wie möglich registriert werden.

1.6.1. **Körpergewicht**

Das Gewicht der einzelnen Tiere sollte kurz vor der Verabreichung der Testsubstanz sowie spätestens eine Woche danach ermittelt werden. Gewichtsveränderungen sollen berechnet und registriert werden. Am Ende des Tests werden die überlebenden Tiere gewogen und auf humane Weise getötet.

1.6.2. **Pathologie**

Alle Versuchstiere (einschließlich der Tiere, die während des Tests sterben oder aus Tierschutzgründen aus der Studie genommen werden) sollen auf makroskopische Veränderungen untersucht werden. Alle makroskopischen Veränderungen sollen für jedes einzelne Tier registriert werden. Bei Tieren, die 24 oder mehr Stunden lang überlebt haben, kann auch eine mikroskopische Untersuchung von Organen mit makropathologischen Befunden in Erwägung gezogen werden, da sich hieraus eventuell nützliche Informationen gewinnen lassen.

2. **DATEN**

Es sollen Daten zu den einzelnen Tieren bereitgestellt werden. Darüber hinaus sollen sämtliche Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden, wobei für jede Testgruppe die folgenden Daten zu erfassen sind: Anzahl der verwendeten Tiere, Anzahl der Tiere mit Anzeichen für eine toxische Wirkung, Anzahl der Tiere, deren Tod während des Versuchs festgestellt wurde oder die aus humanen Gründen getötet wurden, Todeszeitpunkt der einzelnen Tiere, Beschreibung und Zeitverlauf der toxischen Wirkungen und ihrer Reversibilität sowie pathologische Befunde.

3. **BERICHT**

3.1. **Prüfbericht**

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten (soweit angemessen):

Testsubstanz:

— physikalische Beschaffenheit, Reinheit und, wenn maßgeblich, physikalisch-chemische Eigenschaften (einschließlich Isomerisierung),

— Identifizierungsdaten, einschließlich CAS-Nummer.

Vehikel (wenn verwendet):

— Begründung für die Auswahl des Vehikels (außer bei Wasser).

Versuchstiere:

— verwendete Spezies/Stamm,

▼B

— mikrobiologischer Zustand der Tiere (wenn bekannt),

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere (gegebenenfalls mit Begründung für den Einsatz von männlichen statt weiblichen Tieren),

— Bezugsquelle der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.

Testbedingungen:

— Angaben über die Zubereitung der Testsubstanz, einschließlich Angaben über die physikalische Beschaffenheit des verabreichten Stoffs,

— Angaben über die Verabreichung der Testsubstanz, einschließlich Applikationsvolumen und Zeitpunkt der Verabreichung,

— Angaben zur Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Herkunft des Wassers),

— Begründung für die Wahl der Startdosis.

Ergebnisse:

— tabellarische Erfassung der erhobenen Daten und der Dosis für jedes einzelne Tier (d. h. Tiere, die Anzeichen für Toxizität zeigen, einschließlich Mortalität sowie Art, Schweregrad und Dauer der Wirkungen),

— tabellarische Erfassung des Körpergewichts und der Änderungen des Körpergewichts,

— Gewicht der einzelnen Tiere am Tag der Verabreichung, danach in wöchentlichen Abständen sowie am Tag des Todes bzw. der Tötung,

— Datum und Uhrzeit des Todes, sofern vor der planmäßigen Tötung eingetreten,

— zeitlicher Verlauf des Einsetzens von Toxizitätsanzeichen sowie Angabe, ob diese reversibel waren, für jedes einzelne Tier,

— Obduktionsergebnisse und histopathologische Ergebnisse für jedes einzelne Tier (wenn vorhanden).

Diskussion und Interpretation der Ergebnisse.

Schlussfolgerung.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. and Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schiede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schiede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W. and Schiede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/$LC_{50}$ Tests. ALTEX 16, 129-134

(6) Schiede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method — An Alternative to the $LD_{50}$ Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

(7) Schiede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, S. 11 (http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html),

(11) Lipnick R.L., Cotruvo, J.A., Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walker A.P., Chu I.; Goddard M., Segal L., Springer J.A. and Myers R.C. (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional $LD_{50}$, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd, New York, USA.

▼B

*Anlage 1*

**ZU BEACHTENDE VORGEHENSWEISE FÜR ALLE STARTDOSEN**

*ALLGEMEINE HINWEISE*

Die in dieser Anlage dargestellten Prüfschemata geben für jede Ausgangsdosis die jeweils zu beachtende Vorgehensweise an.

— Anlage 1A: Startdosis 5 mg pro kg Körpergewicht

— Anlage 1B: Startdosis 50 mg pro kg Körpergewicht

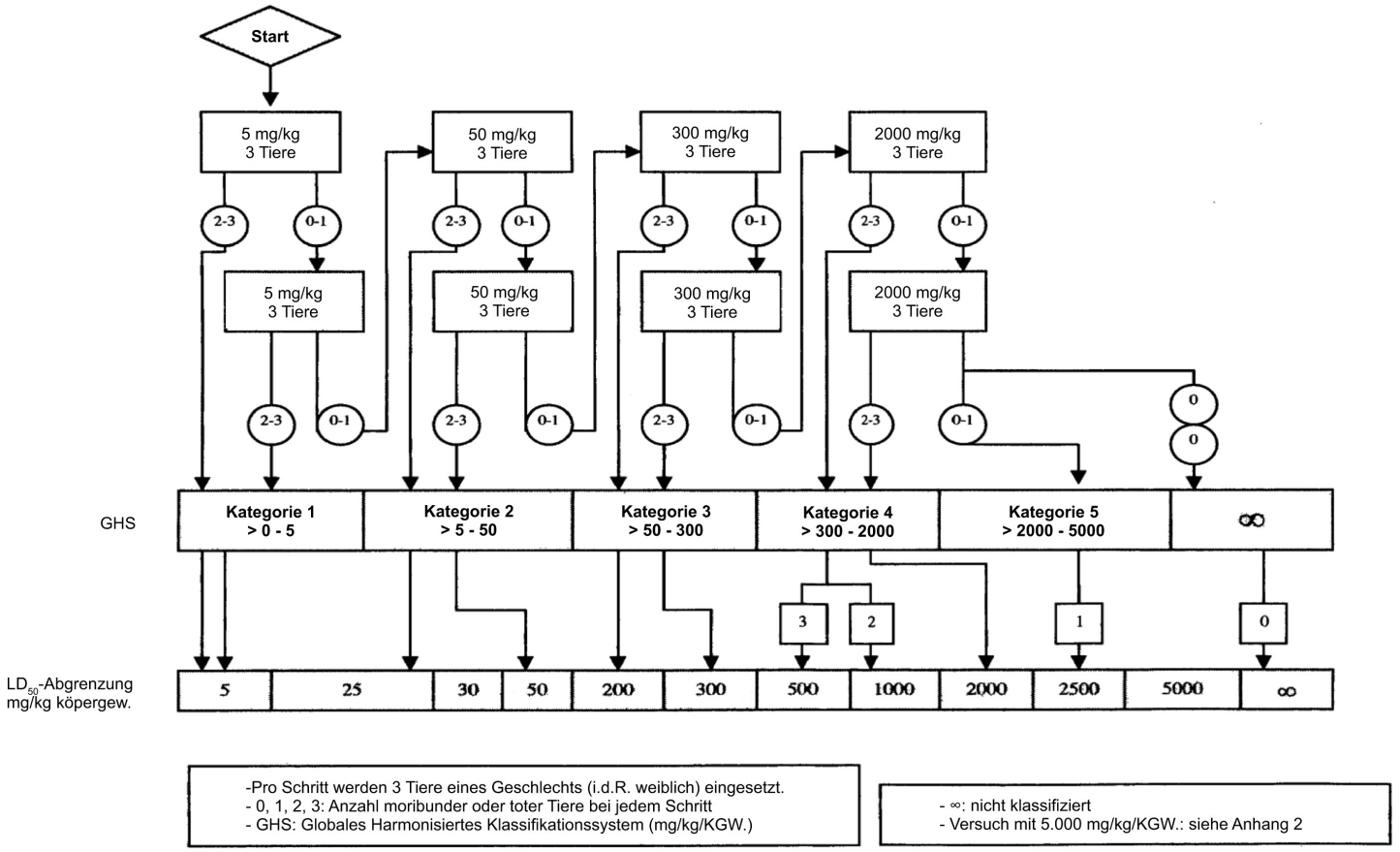
— Anlage 1C: Startdosis 300 mg pro kg Körpergewicht

— Anlage 1D: Startdosis 2 000 mg pro kg Körpergewicht

Der Testverlauf folgt je nach Anzahl der auf humane Weise getöteten oder gestorbenen Versuchstiere den angegebenen Pfeilen.

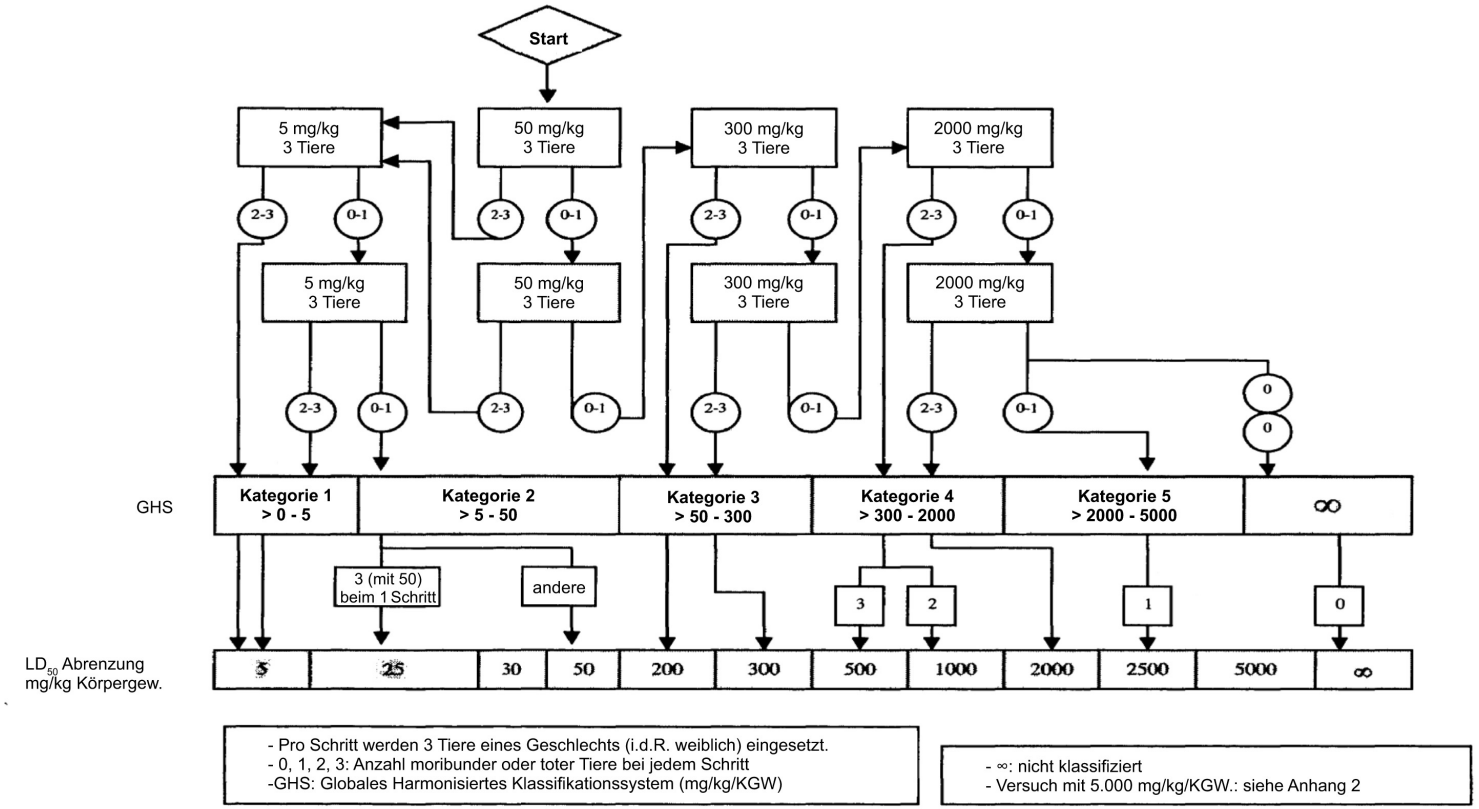
*Anlage 1A*

## PRÜFVERFAHREN BEI EINER STARTDOSIS VON 5 MG PRO KG KÖRPERGEWICHT



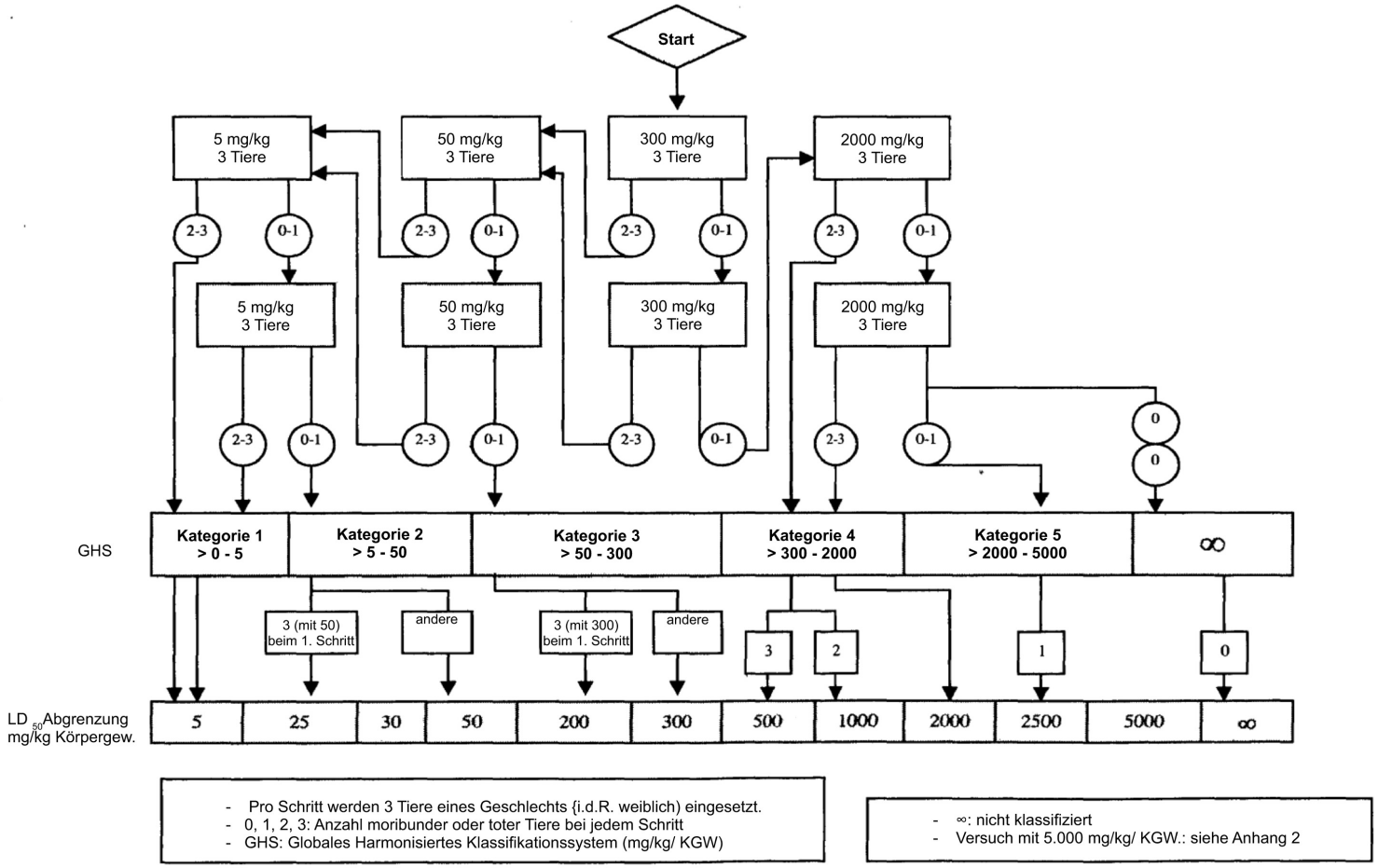
*Anlage 1B*

**PRÜFVERFAHREN BEI EINER STARTDOSIS VON 50 mg PRO kg KÖRPERGEWICHT**



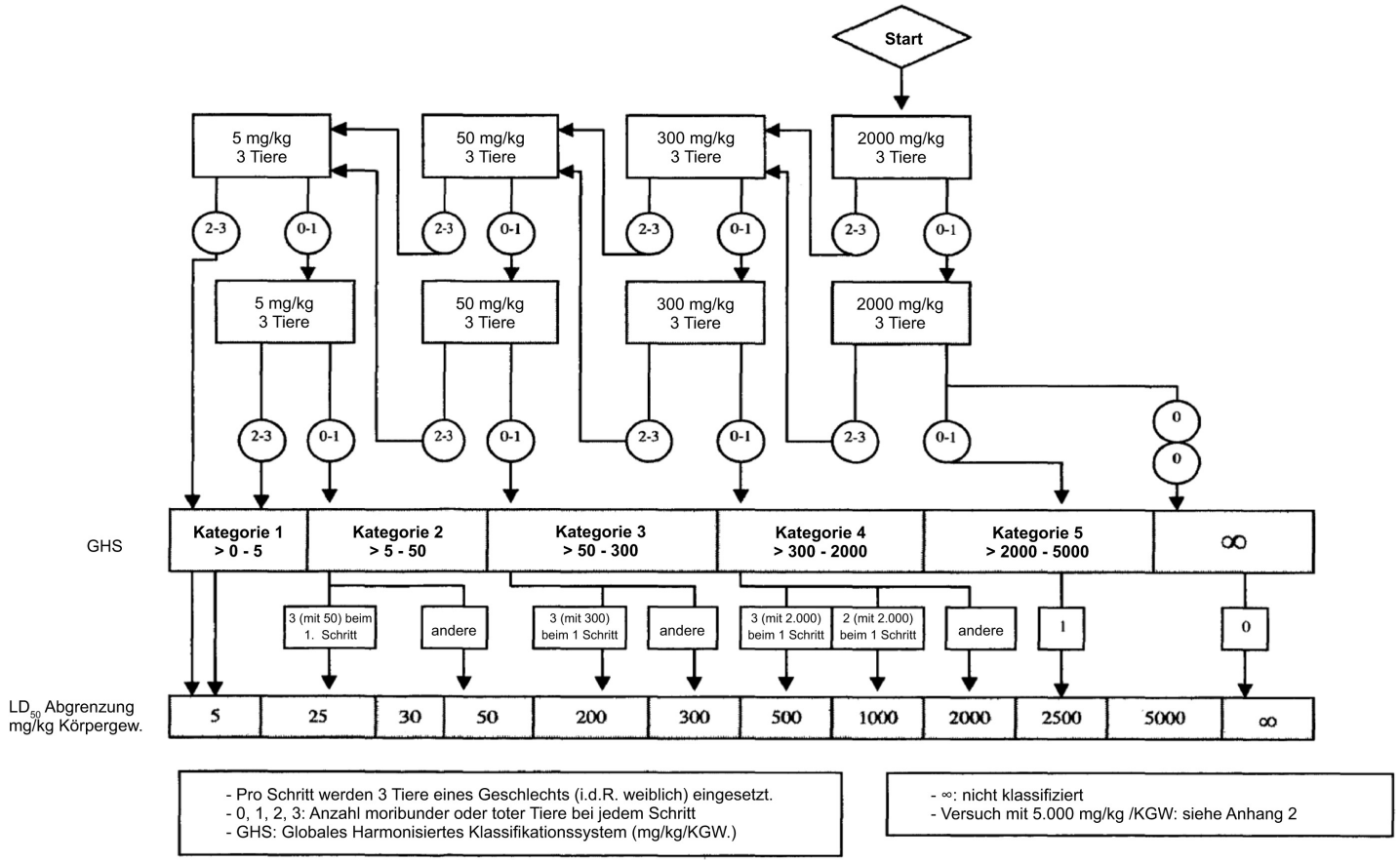
*Anlage 1C*

## PRÜFVERFAHREN BEI EINER STARTDOSIS VON 300 mg PRO kg KÖRPERGEWICHT



*Anlage 1D*

**PRÜFVERFAHREN-BEI EINER STARTDOSIS VON 2 000 mg PRO kg KÖRPERGEWICHT**




- Pro Schritt werden 3 Tiere eines Geschlechts (i.d.R. weiblich) eingesetzt.
- 0, 1, 2, 3: Anzahl moribunder oder toter Tiere bei jedem Schritt
- GHS: Globales Harmonisiertes Klassifikationssystem (mg/kg/KGW.)

- ∞: nicht klassifiziert
- Versuch mit 5.000 mg/kg /KGW: siehe Anhang 2

▼B

*Anlage 2*

**KRITERIEN FÜR DIE KLASSIFIZIERUNG VON TESTSUBSTANZEN MIT ERWARTETEN $LD_{50}$-WERTEN ÜBER 2 000 mg/kg OHNE ERFORDERLICHE TESTS**

Die Kriterien für die Gefahrenkategorie 5 sollen die Identifikation von Testsubstanzen ermöglichen, die eine vergleichsweise geringe akute Toxizitätsgefahr aufweisen, die aber unter bestimmten Umständen eine Gefahr für anfällige Bevölkerungsgruppen darstellen. Bei diesen Substanzen wird von einer oralen oder dermalen $LD_{50}$ im Bereich 2 000-5 000 mg/kg bzw. von vergleichbaren Dosen für andere Verabreichungswege ausgegangen. Die Testsubstanz sollte in den folgenden Fällen in die Gefahrenkategorie 2 000 mg/kg < $LD_{50}$ < 5 000 mg/kg (GHS-Kategorie 5) eingestuft werden:

a) wenn eines der Prüfschemata — aus Anlage 1A-1D aufgrund von Mortalitätsfällen zu dieser Kategorie führt;

b) wenn bereits zuverlässige Erkenntnisse dafür vorliegen, dass der $LD_{50}$-Wert im Bereich der Kategorie 5 liegt, oder wenn andere Tierversuche oder toxische Wirkungen auf Menschen akute Folgen für die menschlichen Gesundheit erwarten lassen;

c) wenn nach Extrapolierung, Schätzung oder Messung von Daten die Zuordnung zu einer höheren Gefahrenklasse nicht gerechtfertigt ist und

   — zuverlässige Informationen vorliegen, die auf signifikante toxische Wirkungen bei Menschen hinweisen, oder

   — Mortalitäten bei oraler Verabreichung in Versuchen mit Dosen bis zu der Kategorie 4 auftreten, oder

   — eine fachkundige Beurteilung bei Versuchen mit Dosen bis zu den in Kategorie 4 genannten Werten signifikante klinische Toxizitätsanzeichen bestätigt (außer Durchfall, Haaraufrichtung oder zerzaustes Fell), oder

   — eine fachkundige Beurteilung verlässliche Informationen bestätigt, die aus den anderen Tierversuchen ein Potenzial für signifikante akute Wirkungen erkennen lassen.

**VERSUCHE MIT DOSEN ÜBER 2 000 mg/kg**

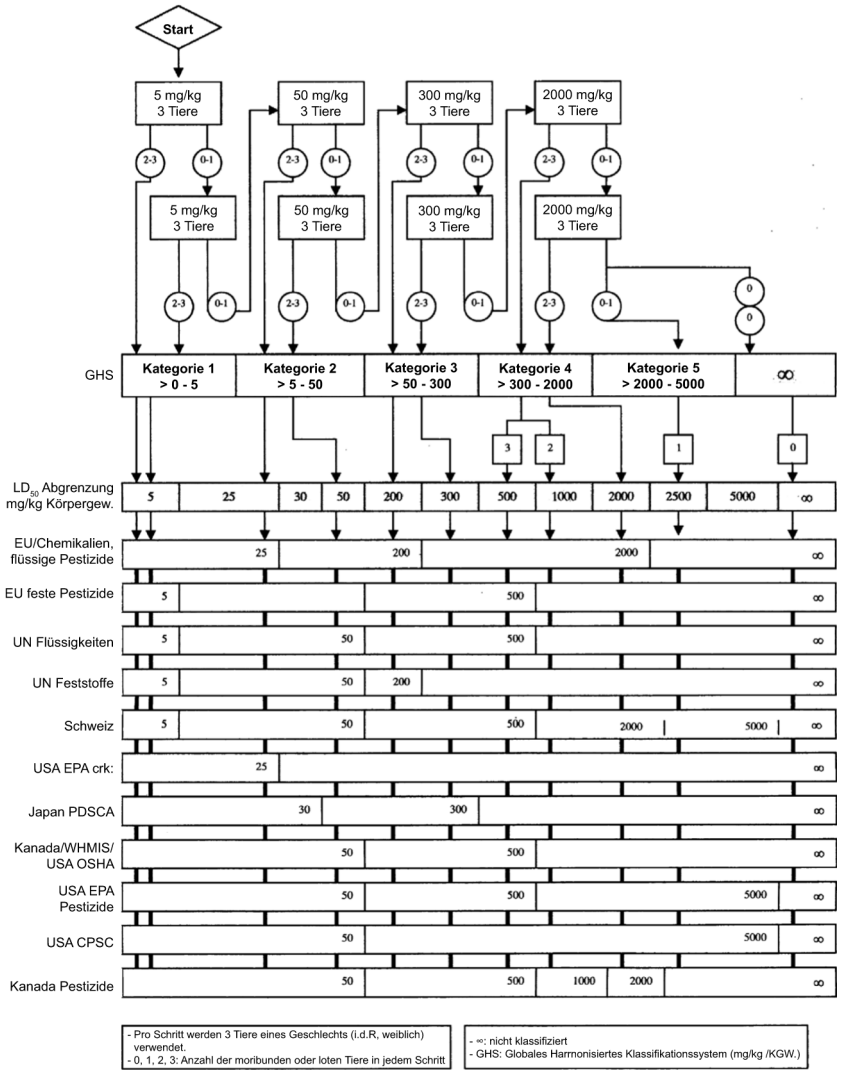
Aus Tierschutzgründen wird von Tierversuchen im Bereich der Kategorie 5 (5 000 mg/kg) abgeraten; diese Versuche sollen nur dann in Erwägung gezogen werden, wenn die Ergebnisse eines solchen Versuchs für den Schutz der Gesundheit von Menschen oder Tieren oder der Umwelt mit hoher Wahrscheinlichkeit direkt relevant wären (10). Weitere Versuche mit noch höheren Dosierungen sollen nicht durchgeführt werden.

Wenn Versuche mit einer Dosis von 5 000 mg/kg notwendig sind, ist nur ein Schritt (d. h. drei Tiere) erforderlich. Wenn das erste Versuchstier stirbt, wird der Versuch mit einer Dosis von 2 000 mg/kg gemäß den Prüfschemata in Anlage 1 fortgesetzt. Wenn das erste Tier überlebt, wird die Substanz zwei weiteren Tieren verabreicht. Wenn nur eines der drei Tiere stirbt, wird ein $LD_{50}$-Wert von über 5 000 mg/kg angenommen. Wenn beide Tiere sterben, wird der Versuch mit der Dosis von 2 000 mg/kg fortgesetzt.

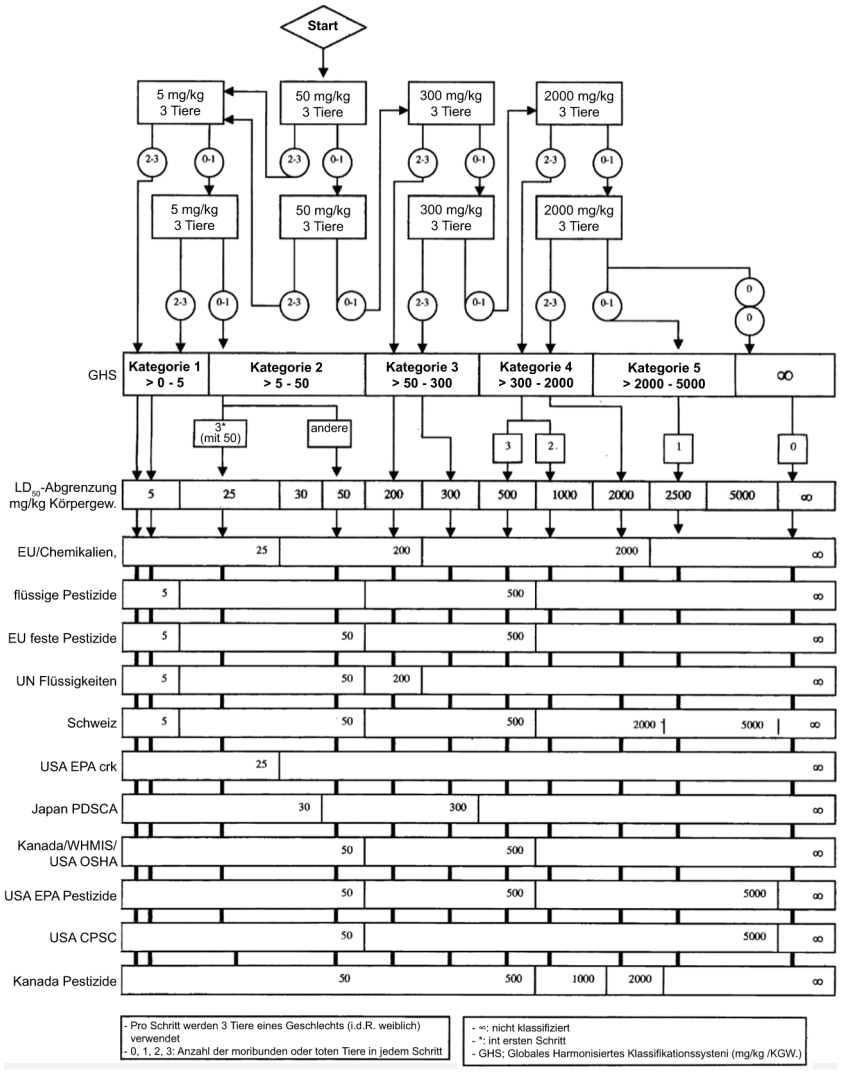
▼B

*Anlage 3*

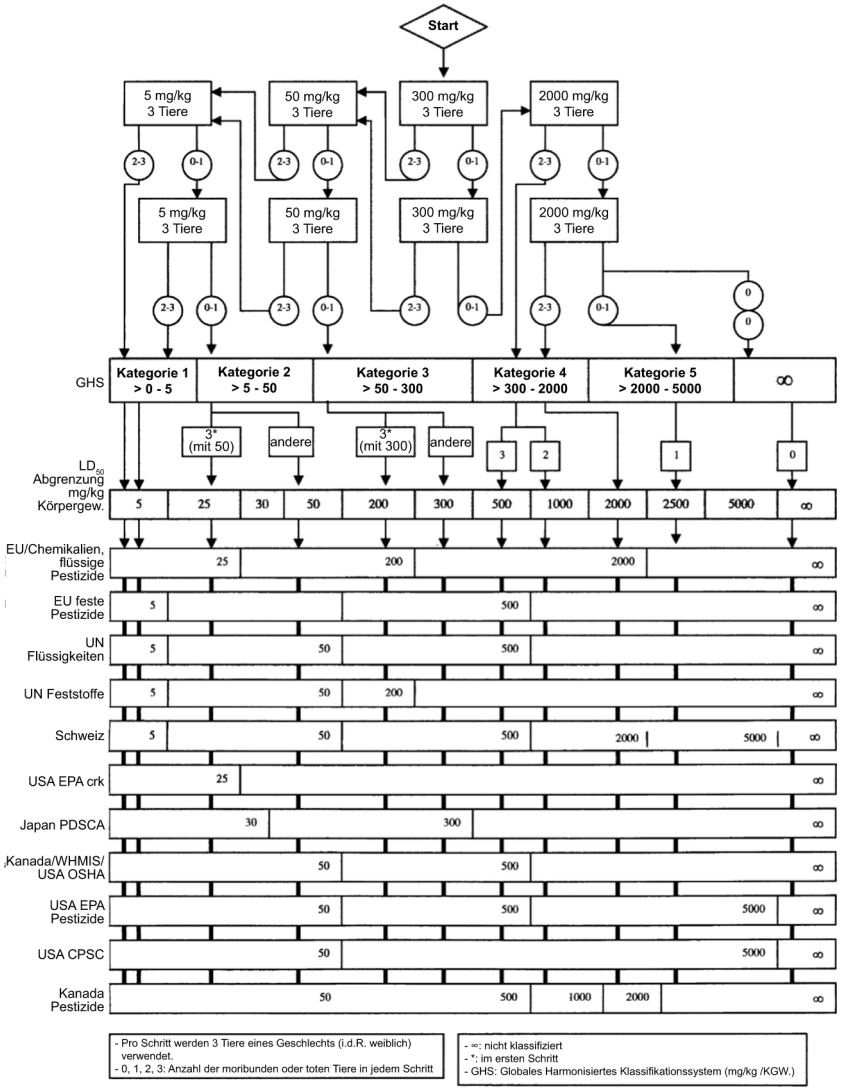
**PRÜFVERFAHREN B.l tris Anleitung für die Klassifizierung gemäß dem EU-System zur Überbrückung des Übergangszeitraums bis zur vollständigen Umsetzung des „Globalen Harmonisierten Systems“ (GHS) (Auszug aus Literaturhinweis (8))**



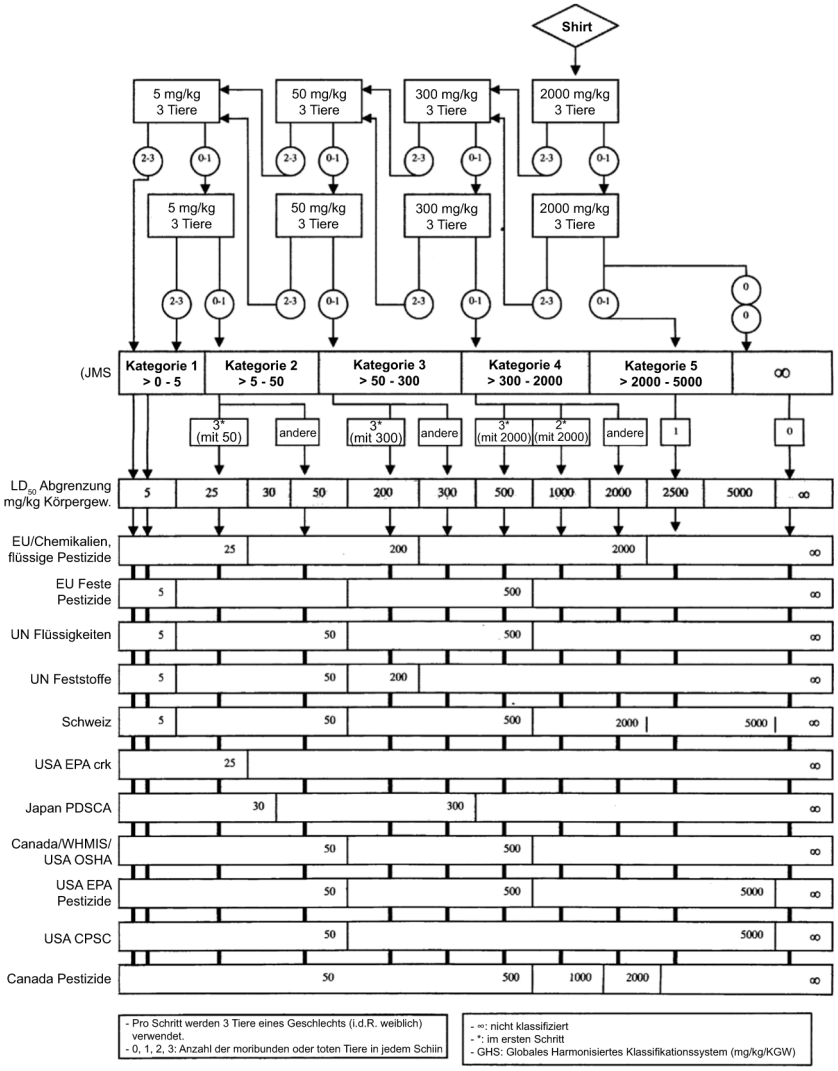
▼B


Start
5 mg/kg 3 Tiere
50 mg/kg 3 Tiere
300 mg/kg 3 Tiere
2000 mg/kg 3 Tiere
2-3
0-1
0
GHS
Kategorie 1 > 0 - 5
Kategorie 2 > 5 - 50
Kategorie 3 > 50 - 300
Kategorie 4 > 300 - 2000
Kategorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (mit 50)
andere
LD50-Abgrenzung mg/kg Körpergew.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/Chemikalien,
flüssige Pestizide
EU feste Pestizide
UN Flüssigkeiten
Schweiz
USA EPA crk
Japan PDSCA
Kanada/WHMIS/ USA OSHA
USA EPA Pestizide
USA CPSC
Kanada Pestizide
- Pro Schritt werden 3 Tiere eines Geschlechts (i.d.R. weiblich) verwendet
- 0, 1, 2, 3: Anzahl der moribunden oder toten Tiere in jedem Schritt
- ∞: nicht klassifiziert
- *: int ersten Schritt
- GHS; Globales Harmonisiertes Klassifikationssysteni (mg/kg /KGW.)

▼B


Start
5 mg/kg 3 Tiere
50 mg/kg 3 Tiere
300 mg/kg 3 Tiere
2000 mg/kg 3 Tiere
2-3
0-1
0
GHS
Kategorie 1 > 0 - 5
Kategorie 2 > 5 - 50
Kategorie 3 > 50 - 300
Kategorie 4 > 300 - 2000
Kategorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (mit 50)
andere
3* (mit 300)
andere
3
2
1
0
LD50 Abgrenzung mg/kg Körpergew.
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
∞
EU/Chemikalien, flüssige Pestizide
EU feste Pestizide
UN Flüssigkeiten
UN Feststoffe
Schweiz
USA EPA crk
Japan PDSCA
Kanada/WHMIS/ USA OSHA
USA EPA Pestizide
USA CPSC
Kanada Pestizide
- Pro Schritt werden 3 Tiere eines Geschlechts (i.d.R. weiblich) verwendet.
- 0, 1, 2, 3: Anzahl der moribunden oder toten Tiere in jedem Schritt
- ∞: nicht klassifiziert
- *: im ersten Schritt
- GHS: Globales Harmonisiertes Klassifikationssystem (mg/kg /KGW.)

▼B


Shirt
5 mg/kg 3 Tiere
50 mg/kg 3 Tiere
300 mg/kg 3 Tiere
2000 mg/kg 3 Tiere
2-3
0-1
0
(JMS
Kategorie 1 > 0 - 5
Kategorie 2 > 5 - 50
Kategorie 3 > 50 - 300
Kategorie 4 > 300 - 2000
Kategorie 5 > 2000 - 5000
∞
3* (mit 50)
andere
3* (mit 300)
3* (mit 2000)
2* (mit 2000)
1
LD50 Abgrenzung mg/kg Körpergew.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/Chemikalien, flüssige Pestizide
EU Feste Pestizide
UN Flüssigkeiten
UN Feststoffe
Schweiz
USA EPA crk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ USA OSHA
USA EPA Pestizide
USA CPSC
Canada Pestizide
- Pro Schritt werden 3 Tiere eines Geschlechts (i.d.R. weiblich) verwendet.
- 0, 1, 2, 3: Anzahl der moribunden oder toten Tiere in jedem Schiin
- ∞: nicht klassifiziert
- *: im ersten Schritt
- GHS: Globales Harmonisiertes Klassifikationssystem (mg/kg/KGW)

▼M4

## B.2 AKUTE INHALATIONSTOXIZITÄT

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 403 (2009) (1). Die ursprüngliche Prüfrichtlinie 403 (TG 403) zur akuten Inhalation wurde 1981 angenommen. Diese überarbeitete Prüfmethode B.2 (die der überarbeiteten TG 403 entspricht) ist dazu ausgelegt, mehr Flexibilität zu bieten, die Verwendung von Versuchstieren zu reduzieren und die Regulierungsanforderungen zu erfüllen. Die überarbeitete Prüfmethode umfasst zwei Arten von Versuchen: ein traditionelles $LC_{50}$-Protokoll und ein Konzentration-x-Zeit-Protokoll (c × t). Die Hauptmerkmale dieser Prüfmethode sind die Möglichkeit, eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung aufzustellen, die von nichtletalen zu letalen Ergebnissen reicht, um eine mittlere letale Konzentration ($LC_{50}$), eine nichtletale Schwellenkonzentration (z. B. $LC_{01}$) und die Steigung der Kurve zu bestimmen und eine eventuelle geschlechtsspezifische Empfindlichkeit festzustellen. Das c-x-t-Protokoll sollte angewendet werden, wenn wegen einer spezifischen Regelung oder aus wissenschaftlicher Notwendigkeit eine Prüfung von Tieren über unterschiedliche Zeiträume erforderlich ist, z. B. für Zwecke der Notfallplanung [z. B. zur Ableitung von Störfallbeurteilungswerten (Acute Exposure Guideline Levels — AEGL, Emergency Response Planning Guidelines — ERPG oder Acute Exposure Threshold Levels — AETL)] oder für die Flächennutzungsplanung.

2. Eine Anleitung für die Durchführung und Auswertung dieser Prüfmethoden ist im Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing (GD 39 (2)) enthalten.

3. Die im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe werden am Ende dieses Kapitels und im GD 39 (2) definiert.

4. Diese Prüfmethode ermöglicht die Charakterisierung von Prüfsubstanzen und eine quantitative Risikobewertung und sie erlaubt die Einstufung von Prüfsubstanzen nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (3). Das GD 39 (2) enthält Hinweise zur Auswahl der geeigneten Prüfmethode für akute Prüfungen. Wenn nur Informationen über die Einstufung und Kennzeichnung benötigt werden, wird im Allgemeinen Kapitel B.52 dieses Anhangs (4) empfohlen [siehe GD 39 (2)]. Diese Prüfmethode B.2 ist nicht speziell für die Prüfung von Spezialmaterialien wie schwer löslichen isometrischen oder Fasermaterialien oder hergestellten Nanomaterialien bestimmt.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

5. Bevor Versuche nach dieser Prüfmethode in Betracht gezogen werden, sollte das Prüflabor alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz, einschließlich bereits vorliegender Studien (z. B. Kapitel B.52 dieses Anhangs (4)), deren Ergebnisse darauf hindeuten, dass auf weitere Versuche verzichtet werden kann, auswerten, damit möglichst wenig Tiere verwendet werden. Für die Auswahl der in Bezug auf Art, Stamm und Geschlecht am besten geeigneten Tiere sowie der geeigneten Expositionsart und Prüfkonzentrationen sollten u. a. Informationen wie die Identität, die chemische Struktur und die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, Ergebnisse jeglicher In-vitro- oder In-vivo-Toxizitätsprüfungen, vorgesehene Verwendungen und die Möglichkeit der Exposition des Menschen, (Q)SAR-Daten und toxikologische Daten über strukturverwandte Substanzen herangezogen werden [siehe GD 39 (2)].

▼M4

6. Die Prüfung hautätzender und/oder reizender Prüfsubstanzen in Konzentrationen, die voraussichtlich starke Schmerzen und/oder Qualen verursachen, sollte soweit wie möglich vermieden werden. Die hautätzenden/reizenden Eigenschaften sollten von Fachleuten auf der Grundlage von Erfahrungswerten bei Mensch und Tier (z. B. Studien mit wiederholter Verabreichung in nicht hautätzenden/reizenden Konzentrationen), vorliegenden In-vitro-Daten (z. B. aus den Kapiteln B.40 (5), B.40bis (6) dieses Anhangs oder OECD TG 435 (7)), den pH-Werten sowie Informationen über ähnliche Substanzen oder anderen sachdienlichen Daten beurteilt werden, damit untersucht werden kann, ob auf weitere Versuche verzichtet werden kann. Bei spezifischen Regulierungsanforderungen (z. B. für Zwecke der Notfallplanung) kann diese Prüfmethode verwendet werden, um Tiere diesen Stoffen auszusetzen, weil die Methode dem Studienleiter oder Hauptprüfer die Kontrolle über die Auswahl der Zielkonzentrationen gibt. Die Zielkonzentrationen sollten jedoch keine schwerwiegenden reizenden/hautätzenden Wirkungen hervorrufen; sie sollten aber ausreichen, um die Konzentrations-Wirkungs-Kurve so zu erweitern, dass das regulatorische und wissenschaftliche Ziel der Prüfung erreicht wird. Diese Konzentrationen sollten von Fall zu Fall ausgewählt werden; die Wahl der Konzentration ist zu begründen [siehe GD 39 (2)].

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

7. Diese überarbeitete Prüfmethode B.2 wurde entwickelt, um ausreichende Informationen über die akute Toxizität einer Prüfsubstanz zu gewinnen, damit sie eingestuft werden kann, und um Letalitätsdaten (z. B. $LC_{50}$, $LC_{01}$ und Steigung) für eines oder beide Geschlechter zu erhalten, die für quantitative Risikobewertungen benötigt werden. Die Prüfmethode umfasst zwei Methoden. Bei der ersten Methode handelt es sich um ein traditionelles Protokoll, bei dem Gruppen von Tieren für eine im Voraus festgelegte Dauer von üblicherweise 4 Stunden einer Grenzkonzentration (Limit-Test) oder schrittweise einer Reihe von Konzentrationen ausgesetzt werden. Für spezifische Regulierungszwecke sind andere Expositionszeiten möglich. Die zweite Methode ist ein Protokoll ($c \times t$), bei dem Gruppen von Tieren über mehrere unterschiedliche Zeiträume einer Konzentration (Grenzkonzentration) oder einer Reihe unterschiedlicher Konzentrationen ausgesetzt werden.

8. Moribunde Tiere oder Tiere, die offensichtlich unter Schmerzen leiden oder Anzeichen von schwerem und anhaltendem Leiden zeigen, sollten auf humane Weise getötet werden und sind bei der Auswertung der Testergebnisse auf die gleiche Weise zu werten wie während des Tests gestorbene Tiere. Kriterien für die Entscheidung, moribunde oder schwer leidende Tiere zu töten, sowie Hinweise zur Erkennung des absehbaren oder bevorstehenden Todes sind Gegenstand des OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints (8).

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Auswahl von Versuchstierarten**

9. Es sind junge, gesunde, adulte Tiere aus üblicherweise eingesetzten Laborstämmen zu verwenden. Bevorzugtes Versuchstier ist die Ratte. Die Verwendung anderer Tierarten ist zu begründen.

**Vorbereitung der Tiere**

10. Die weiblichen Tiere dürfen weder bereits geworfen haben noch momentan trächtig sein. Am Tag der Exposition sollten die jungen, adulten Tiere 8 bis 12 Wochen alt sein; ihr Körpergewicht sollte innerhalb von ± 20 % des mittleren Gewichts für jedes Geschlecht aller zuvor exponierten Tiere desselben Alters liegen. Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zur individuellen Identifizierung markiert und vor Beginn der Prüfung für einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen gewöhnt. Die Tiere sollten auch für einen kurzen Zeitraum vor der Prüfung an die Versuchsapparatur gewöhnt werden, da dies den Stress durch die Umsetzung in eine neue Umgebung verringert.

▼M4

**Tierhaltung**

11. Die Temperatur in dem Raum, in dem die Versuchstiere gehalten werden, sollte 22 ± 3 °C betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte im Idealfall zwischen 30 und 70 % liegen; bei Verwendung von Wasser als Vehikel könnte dies jedoch unmöglich sein. Die Tiere sollten vor und nach den Expositionen im Allgemeinen nach Geschlecht und Konzentration in Käfigen gruppiert werden, wobei aber die Anzahl der Tiere pro Käfig noch eine genaue Beobachtung der einzelnen Tiere ermöglichen muss und Verluste aufgrund von Kannibalismus oder Kämpfen minimiert werden sollten. Wenn die Tiere der Prüfsubstanz nur mit der Nase ausgesetzt werden sollen, müssen sie möglicherweise an die Restrainer gewöhnt werden. Die Restrainer sollten die Tiere weder körperlich noch in Bezug auf Wärme oder Fixierung übermäßig beeinträchtigen. Die Fixierung kann physiologische Endpunkte wie Körpertemperatur (Hyperthermie) und/oder das Atemminutenvolumen beeinflussen. Wenn generische Daten zeigen, dass keine derartigen Veränderungen in nennenswertem Ausmaß vorkommen, ist eine Eingewöhnung an die Restrainer nicht erforderlich. Bei der Ganzkörperexposition gegen ein Aerosol sollten die Tiere während der Exposition einzeln untergebracht sein, damit sie die Prüfsubstanz nicht durch das Fell ihrer Käfiggenossen filtriert einatmen. Außer während der Exposition kann herkömmliches und zertifiziertes Labortierfutter verwendet werden bei uneingeschränkter Versorgung mit Trinkwasser. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln.

**Inhalationskammern**

12. Bei der Auswahl einer Inhalationskammer sind die Art der Prüfsubstanz und das Ziel der Prüfung zu berücksichtigen. Das bevorzugte Verfahren ist die „Nose-only"-Exposition (dieser Begriff umfasst „nur Kopf", „nur Nase" oder „nur Schnauze"). Für die Untersuchung von Flüssigkeits- oder Feststoffaerosolen und für Dämpfe, die zu Aerosolen kondensieren können, wird im Allgemeinen die „Nose-only"-Exposition bevorzugt. Besondere Ziele der Untersuchung können möglicherweise mit einer Ganzkörperexposition besser erreicht werden, doch dies sollte im Prüfbericht begründet werden. Um bei Verwendung einer Ganzkörperkammer die Stabilität der Atmosphäre sicherzustellen, sollte das Gesamtvolumen der Versuchstiere 5 % des Volumens der Kammer nicht übersteigen. Die Prinzipien der „Nose-only"- und der Ganzkörperexposition sowie ihre jeweiligen Vor- und Nachteile sind in GD 39 (2) beschrieben.

EXPOSITIONSBEDINGUNGEN

**Verabreichung der Konzentrationen**

13. „Nose-only"-Expositionen können bei Ratten bis zu 6 Stunden dauern. Bei Mäusen sollten „Nose-only"-Expositionen im Allgemeinen 4 Stunden nicht überschreiten. Wenn Studien mit längerer Expositionsdauer erforderlich sind, ist dies zu begründen [siehe GD 39 (2)]. Bei Ganzkörperexpositionen gegen Aerosole sollten die Tiere einzeln untergebracht sein, um eine Aufnahme der Prüfsubstanz durch das Putzen von Käfiggenossen zu verhindern. Während der Exposition sollte kein Futter verabreicht werden. Wasser kann während einer Ganzkörperexposition angeboten werden.

14. Die Tiere werden der Prüfsubstanz in Form von Gas, Dampf, Aerosol oder einer Kombination dieser Formen ausgesetzt. Der zu prüfende Aggregatzustand hängt von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, der gewählten Konzentration und/oder der physikalischen Form ab, in der die Prüfsubstanz bei der Handhabung und Verwendung am wahrscheinlichsten vorliegt. Hygroskopische und chemisch reaktive Prüfsubstanzen sollten bei geringer Luftfeuchtigkeit geprüft werden. Dabei ist darauf zu achten, dass keine explosionsfähigen Konzentrationen erzeugt werden.

▼M4

**Partikelgrößenverteilung**

15. Bei allen Aerosolen und bei Dämpfen, die zu Aerosolen kondensieren können, sollte die Partikelgröße bestimmt werden. Damit alle relevanten Regionen der Atemwege der Prüfsubstanz ausgesetzt werden, werden mittlere aerodynamische Massendurchmesser (Mass Median Aerodynamic Diameter — MMAD) von 1 bis 4 μm mit einer geometrischen Standardabweichung ($\sigma_g$) von 1,5 bis 3,0 empfohlen (2) (9) (10). Wenngleich nach Möglichkeit versucht werden sollte, diese Werte zu erreichen, ist Fachwissen erforderlich, falls sie nicht erzielt werden können. Metalldämpfe können z. B. unter diesen Werten liegen, und geladene Partikel, Fasern und hygroskopische Stoffe (die sich in der feuchten Umgebung der Atemwege ausdehnen) können diese Werte überschreiten.

**Vorbereitung der Prüfsubstanz in einem Vehikel**

16. Um die gewünschte Konzentration und Partikelgröße der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen, kann ein Vehikel verwendet werden. Hierbei ist in der Regel Wasser zu bevorzugen. Partikel können durch mechanische Prozesse auf die erforderliche Partikelgrößenverteilung gebracht werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Prüfsubstanz nicht zersetzt oder verändert wird. Wenn angenommen wird, dass die Zusammensetzung der Prüfsubstanz durch mechanische Prozesse verändert wurde (z. B. hohe Temperaturen aufgrund von Reibung durch übermäßiges Mahlen), sollte die Zusammensetzung der Prüfsubstanz analytisch überprüft werden. Es ist darauf zu achten, dass die Prüfsubstanz nicht kontaminiert wird. Nicht brüchige Granulate, die speziell so formuliert sind, dass sie nicht eingeatmet werden können, brauchen nicht geprüft zu werden. Mit einem Abriebtest sollte nachgewiesen werden, dass beim Umgang mit dem Granulat keine lungengängigen Partikel entstehen. Entstehen bei einem Abriebtest lungengängige Partikel, so sollte eine Inhalationstoxizitätsprüfung durchgeführt werden.

**Kontrolltiere**

17. Eine gleichzeitige negative (Luft-)Kontrollgruppe ist nicht erforderlich. Wenn zur Erzeugung der Prüfatmosphäre ein anderes Vehikel als Wasser verwendet wird, sollte nur dann eine Vehikelkontrollgruppe verwendet werden, wenn keine historischen Daten über Inhalationstoxizität vorliegen. Ergibt eine Toxizitätsstudie einer in einem Vehikel formulierten Prüfsubstanz, dass keine Toxizität vorliegt, ist das Vehikel folglich in der geprüften Konzentration nicht toxisch. Daher ist keine Vehikelkontrolle erforderlich.

ÜBERWACHUNG DER EXPOSITIONSBEDINGUNGEN

**Luftstrom in der Inhalationskammer**

18. Der Luftstrom durch die Kammer sollte während jeder Exposition sorgfältig geregelt, kontinuierlich überwacht und mindestens stündlich protokolliert werden. Die Überwachung der Konzentration (oder Stabilität) der Prüfatmosphäre ist eine integrale Messung aller dynamischen Parameter und gibt indirekt die Möglichkeit, alle relevanten dynamischen Parameter der Erzeugung der Prüfatmosphäre zu messen. Es sollte besonders darauf geachtet werden, das erneute Einatmen in „Nose-only"-Expositionskammern zu vermeiden, wenn die Luftströmung durch das Expositionssystem nicht ausreicht, um eine dynamische Strömung der Prüfsubstanzatmosphäre zu erreichen. Es gibt festgelegte Methoden, mit denen nachgewiesen werden kann, dass es unter den gewählten Bedingungen nicht zu erneutem Einatmen kommt (2) (11). Die Sauerstoffkonzentration sollte mindestens 19 % betragen, und die Kohlendioxidkonzentration sollte 1 % nicht überschreiten. Gibt es Grund zu der Annahme, dass diese Werte nicht eingehalten werden können, sind die Sauerstoff- und die Kohlendioxidkonzentrationen zu messen.

▼M4

**Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit in der Inhalationskammer**

19. Die Temperatur in der Inhalationskammer sollte 22 ± 3 °C betragen. Sowohl bei der „Nose-only"- als auch bei der Ganzkörperexposition sollte die relative Luftfeuchtigkeit im Atembereich der Tiere für Zeiträume von bis zu 4 Stunden mindestens dreimal und für kürzere Zeiträume stündlich überwacht und dokumentiert werden. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte im Idealfall zwischen 30 und 70 % liegen, was jedoch möglicherweise nicht erreichbar ist (z. B. bei der Prüfung von wasserbasierten Mischungen) oder wegen chemischer Interferenz mit der Prüfmethode nicht gemessen werden kann.

**Prüfsubstanz: nominale Konzentration**

20. Die nominale Konzentration in der Expositionskammer sollte möglichst berechnet und protokolliert werden. Die nominale Konzentration ist die Masse der erzeugten Prüfsubstanz dividiert durch das Gesamtvolumen der durch das Kammersystem geleiteten Luft. Sie wird nicht zur Beschreibung der Exposition der Tiere verwendet; vielmehr gibt ein Vergleich der nominalen Konzentration und der tatsächlichen Konzentration Aufschluss über die Effizienz des Prüfsystems bei der Erzeugung der Prüfkonzentration und kann daher für die Aufdeckung von Problemen bei dieser Erzeugung verwendet werden.

**Prüfsubstanz: tatsächliche Konzentration**

21. Die tatsächliche Konzentration ist die Konzentration der Prüfsubstanz im Atembereich der Tiere in einer Inhalationskammer. Die tatsächlichen Konzentrationen können durch spezifische Methoden (z. B. direkte Probenahme, adsorptive Methoden oder chemische Reaktionsverfahren mit anschließender analytischer Charakterisierung) oder durch unspezifische Methoden wie Gravimetrie bestimmt werden. Die gravimetrische Methode ist lediglich für Aerosole mit nur einem Bestandteil in Pulverform oder Aerosole von Flüssigkeiten mit geringer Flüchtigkeit akzeptabel und sollte sich auf geeignete, vor der Studie zu erstellende und für die Prüfsubstanz spezifische Beschreibungen stützen. Die Konzentration von Aerosolen mit mehreren Bestandteilen in Pulverform kann ebenfalls gravimetrisch bestimmt werden. Hierzu muss jedoch mit Analysedaten belegt werden, dass die Schwebstoffe eine ähnliche Zusammensetzung haben wie das Ausgangsmaterial. Liegen diese Angaben nicht vor, muss die Prüfsubstanz (im Idealfall im Schwebezustand) möglicherweise im Verlauf der Studie in regelmäßigen Abständen neu analysiert werden. Bei aerosolisierten Agenzien, die verdunsten oder sublimieren können, sollte gezeigt werden, dass alle Phasen von der gewählten Methode erfasst wurden. Im Prüfbericht sollten die Zielkonzentration sowie die nominale und die tatsächliche Konzentration angegeben werden, aber nur die tatsächlichen Konzentrationen werden für statistische Analysen zur Berechnung letaler Konzentrationswerte verwendet.

22. Es sollte möglichst eine Partie der Prüfsubstanz verwendet werden; die Probe sollte unter Bedingungen aufbewahrt werden, die ihre Reinheit, Homogenität und Stabilität gewährleisten. Die Prüfsubstanz sollte vor Beginn der Studie mit Angaben zur Reinheit und, falls technisch machbar, zur Identität sowie zu den Mengen identifizierter Schadstoffe und Verunreinigungen beschrieben werden. Hierzu können unter anderem die folgenden Daten verwendet werden: Retentionszeit und relative Peakfläche, durch Massenspektrometrie oder Gaschromatographie bestimmtes Molekulargewicht oder andere Werte. Das Prüflabor ist zwar nicht für die Identität der Probe verantwortlich, doch es kann ratsam sein, dass es die Beschreibung des Auftraggebers zumindest in gewissen Grenzen (z. B. Farbe, physikalische Beschaffenheit usw.) überprüft.

23. Die Expositionsatmosphäre ist so konstant wie möglich zu halten und je nach Analysemethode kontinuierlich und/oder intermittierend zu überwachen. Bei der intermittierenden Probenahme sollten in einer vierstündigen Studie mindestens zweimal Proben der Atmosphäre in der Kammer genommen werden. Ist dies wegen begrenzter Luftdurchflussraten oder niedriger Konzentrationen nicht möglich, kann während der gesamten Expositionszeit eine einzige Probe genommen werden. Weichen die einzelnen Proben stark voneinander ab, sollten bei den nächsten geprüften Konzentrationen vier

▼M4

Proben je Exposition gezogen werden. Die einzelnen Proben der Konzentration in der Kammer sollten bei Gasen und Dämpfen nicht mehr als ± 10 % und bei Flüssig- oder Feststoffaerosolen nicht mehr als ± 20 % von der mittleren Kammerkonzentration abweichen. Die Zeit bis zum Erreichen eines Gleichgewichts in der Kammer ($t_{95}$) ist zu berechnen und zu dokumentieren. Die Expositionsdauer erstreckt sich über den Zeitraum, in dem die Prüfsubstanz erzeugt wird; dazu gehört die zur Erreichung von $t_{95}$ erforderliche Zeit. GD 39 (2) enthält Hinweise zur Einschätzung von $t_{95}$.

24. Bei sehr komplexen Mischungen aus Gasen/Dämpfen und Aerosolen (z. B. Verbrennungsatmosphären und Prüfsubstanzen, die aus hierzu bestimmten Endverbraucherprodukten/-geräten gesprüht werden), kann sich jede Phase in einer Inhalationskammer anders verhalten, so dass mindestens eine Indikatorsubstanz (Analyt), normalerweise der wichtigste Wirkstoff in der Mischung, von jeder Phase (Gas/Dampf und Aerosol) ausgewählt werden sollte. Wenn die Prüfsubstanz eine Mischung ist, sollte die Analysekonzentration für die Mischung und nicht nur für den Wirkstoff oder den Bestandteil (Analyt) dokumentiert werden. Weitere Informationen zu tatsächlichen Konzentrationen sind in GD 39 (2) zu finden.

**Prüfsubstanz: Partikelgrößenverteilung**

25. Die Partikelgrößenverteilung von Aerosolen sollte während jeder 4-stündigen Exposition mindestens zweimal mit einem Kaskaden-Impaktor oder einem anderen Messgerät wie einem APS bestimmt werden. Kann nachgewiesen werden, dass die mit einem Kaskaden-Impaktor und einem alternativen Messgerät erzielten Ergebnisse gleichwertig sind, so kann das alternative Instrument während der gesamten Studie verwendet werden. Parallel zum Hauptinstrument ist ein zweites Gerät wie ein Gravimetriefilter oder eine Gaswaschflasche zu verwenden, um den Abscheidegrad des Hauptinstruments zu bestätigen. Die durch die Partikelgrößenanalyse bestimmte Massenkonzentration sollte innerhalb vertretbarer Grenzen um die durch die Filteranalyse bestimmte Massenkonzentration liegen [siehe DG 39 (2)]. Wenn die Gleichwertigkeit zu Beginn der Studie nachgewiesen werden kann, kann auf weitere bestätigende Messungen verzichtet werden. Aus Tierschutzgründen sollten Vorkehrungen getroffen werden, um unklare Daten zu minimieren, die dazu führen könnten, dass eine Exposition wiederholt werden muss. Wenn die Möglichkeit besteht, dass Dampfkondensation zur Bildung eines Aerosols führen kann, oder wenn in einer Dampfatmosphäre mit dem Potenzial für gemischte Phasen Partikel nachgewiesen werden, sollte eine Partikelgrößenbestimmung für Dämpfe vorgenommen werden (siehe Nummer 15).

VERFAHREN

26. Nachstehend werden zwei Prüfungsarten beschrieben: das traditionelle Protokoll und das C-×-t-Protokoll. Beide Protokolle können eine Vorstudie, eine Hauptstudie und/oder einen Limit-Test (traditionelles Protokoll) bzw. eine Prüfung bei einer Grenzkonzentration (c × t) umfassen. Wenn bekannt ist, dass ein Geschlecht empfindlicher reagiert, kann der Studienleiter entscheiden, diese Prüfungen nur unter Verwendung dieses Geschlechts durchzuführen. Wenn für eine „Nose-only"-Exposition andere Nagetierarten als Ratten verwendet werden, kann die maximale Expositionsdauer angepasst werden, um artenspezifisches Leiden zu minimieren. Damit möglichst wenig Tiere verwendet werden, sollten vor Beginn der Prüfung alle verfügbaren Daten ausgewertet werden. Mit Ergebnissen der Methode gemäß Kapitel B.52 dieses Anhangs (4) kann möglicherweise die Notwendigkeit einer Vorstudie ausgeräumt und gezeigt werden, ob ein Geschlecht empfindlicher reagiert als das andere [siehe GD 39 (2)].

▼M4

TRADITIONELLES PROTOKOLL

**Allgemeine Überlegungen: traditionelles Protokoll**

27. In einer traditionellen Studie werden Gruppen von Tieren einer Prüfsubstanz für einen festgelegten Zeitraum (im Allgemeinen 4 Stunden) entweder in einer „Nose-only"- oder einer Ganzkörperexpositionskammer ausgesetzt. Die Tiere werden entweder einer Grenzkonzentration (Limit-Test) oder schrittweise mindestens drei Konzentrationen (Hauptstudie) ausgesetzt. Wenn nicht bereits Informationen über die Prüfsubstanz vorliegen, wie z. B. aus einer zuvor durchgeführten Prüfung nach Kapitel B.52, kann vor der Hauptstudie eine Vorstudie durchgeführt werden [siehe GD 39 (2)].

**Vorstudie: traditionelles Protokoll**

28. Eine Vorstudie dient dazu, die Wirkstärke der Prüfsubstanz einzuschätzen, geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Empfindlichkeit festzustellen und die Festlegung der Expositionskonzentrationen für die Hauptstudie oder den Limit-Test zu erleichtern. Die Auswahl der Konzentrationen für die Vorstudie sollte sich auf alle verfügbaren Informationen, einschließlich verfügbarer (Q)SAR-Daten und Daten für ähnliche Chemikalien stützen. Jeder Konzentration der Prüfsubstanz sollten höchstens drei männliche und drei weibliche Tiere ausgesetzt werden (drei Tiere je Geschlecht können erforderlich sein, um einen geschlechtsspezifischen Unterschied festzustellen). Es ist möglich, dass in einer Vorstudie nur eine einzige Konzentration geprüft wird, erforderlichenfalls können aber auch mehr Konzentrationen geprüft werden. In einer Vorstudie sollten nicht so viele Tiere und Konzentrationen untersucht werden, dass sie quasi einer Hauptstudie gleichkommt. Statt einer Vorstudie kann auf die Ergebnisse einer zuvor durchgeführten Prüfung gemäß Kapitel B.52 (4) zurückgegriffen werden [siehe GD 39 (2)].

**Limit-Test: traditionelles Protokoll**

29. Ein Limit-Test wird verwendet, wenn bekannt oder zu erwarten ist, dass die Prüfsubstanz praktisch nicht toxisch ist, d. h. nur über der regulatorisch festgelegten Grenzkonzentration eine toxische Wirkung hervorruft. Beim Limit-Test wird eine einzige Gruppe von drei männlichen und drei weiblichen Tieren der Prüfsubstanz bei einer Grenzkonzentration ausgesetzt. Informationen über die Toxizität der Prüfsubstanz können aus Kenntnissen über ähnliche geprüfte Stoffe gewonnen werden, wobei Art und prozentualer Anteil der Komponenten zu berücksichtigen sind, deren toxikologische Relevanz bekannt ist. In den Fällen, in denen nur wenige oder keine Informationen über die Toxizität der Prüfsubstanz vorliegen oder in denen von einer Toxizität der Prüfsubstanz ausgegangen wird, sollte der Haupttest durchgeführt werden.

30. Die Wahl der Grenzkonzentrationen hängt im Allgemeinen von den Regulierungsanforderungen ab. Wird die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 zugrunde gelegt, so betragen die Grenzkonzentrationen für Gase, Dämpfe und Aerosole 20 000 ppm, 20 mg/l bzw. 5 mg/l (oder die höchste erreichbare Konzentration) (3). Bei bestimmten Prüfsubstanzen, insbesondere bei Dämpfen und Aerosolen, kann es technisch schwierig sein, Grenzkonzentrationen zu erzeugen. Bei der Prüfung von Aerosolen sollte das Hauptziel darin bestehen, eine lungengängige Partikelgröße (d. h. ein MMAD von 1-4 μm) zu erreichen. Dies ist bei den meisten Prüfsubstanzen bei einer Konzentration von 2 mg/l der Fall. Aerosole sollten nur dann bei mehr als 2 mg/l geprüft werden, wenn eine lungengängige Partikelgröße erreicht werden kann [siehe DG 39 (2)]. Die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 rät aus Tierschutzgründen von der Prüfung über einer Grenzkonzentration ab (3). Die Grenzkonzentration sollte nur in Betracht gezogen werden, wenn eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass die Ergebnisse einer solchen Prüfung von unmittelbarer Relevanz für den Schutz der menschlichen Gesundheit sind (3); dies ist im Prüfbericht zu begründen. Bei potenziell explosiven Prüfsubstanzen ist darauf zu achten, dass keine explosionsfördernden Bedingungen geschaffen werden. Um eine unnötige Verwendung von Versuchstieren zu vermeiden und sicherzustellen, dass die Kammerbedingungen für einen Limit-Test erreicht werden können, sollte vor dem Limit-Test ein Probedurchlauf ohne Tiere vorgenommen werden.

▼M4

31. Werden bei der Grenzkonzentration Mortalität oder Siechtum beobachtet, können die Ergebnisse der Prüfung bei dieser Konzentration als Vorstudie für weitere Prüfungen bei anderen Konzentrationen dienen (siehe Hauptstudie). Wenn eine Grenzkonzentration wegen der physikalischen oder chemischen Eigenschaften einer Prüfsubstanz nicht erreicht werden kann, sollte die höchste erreichbare Konzentration geprüft werden. Wenn bei der höchsten erreichbaren Konzentration eine Letalität von weniger als 50 % auftritt, sind keine weiteren Prüfungen erforderlich. Konnte die Grenzkonzentration nicht erreicht werden, sollte der Prüfbericht eine Erklärung und entsprechende Daten enthalten. Wenn die höchste erreichbare Konzentration eines Dampfs keine Toxizität hervorruft, muss die Prüfsubstanz möglicherweise als Flüssigkeitsaerosol angewendet werden.

**Hauptstudie: traditionelles Protokoll**

32. Eine Hauptstudie wird normalerweise mit fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren (oder, falls bekannt, fünf Tieren des empfindlicheren Geschlechts) je Konzentrationsstufe mit mindestens drei Konzentrationsstufen durchgeführt. Für eine robuste statistische Analyse sollten ausreichend hohe Konzentrationsstufen verwendet werden. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Expositionsgruppen richtet sich nach Einsetzen, Dauer und Schweregrad der toxischen Zeichen. Die Tiere sollten erst dann der nächsten Konzentrationsstufe ausgesetzt werden, wenn mit angemessener Gewissheit vom Überleben der zuvor getesteten Tiere ausgegangen werden kann. Dies gibt dem Studienleiter die Möglichkeit, die Zielkonzentration für die nächste Expositionsgruppe anzupassen. Wegen der Abhängigkeit von hochentwickelter Technologie ist dies in Inhalationsstudien nicht immer praktikabel. Deshalb sollte die Exposition von Tieren gegen die nächste Konzentrationsstufe auf Erfahrungswerten und wissenschaftlichem Sachverstand beruhen. Bei der Prüfung von Mischungen ist das GD 39 (2) zu konsultieren.

KONZENTRATION-×-ZEIT-PROTOKOLL (C × T)

**Allgemeine Überlegungen: C-×-t-Prokokoll**

33. Bei der Bewertung der Inhalationstoxizität kann als Alternative zu einem traditionellen Protokoll eine schrittweise C-×-t-Studie in Betracht gezogen werden (12) (13) (14). Bei dieser Methode werden die Tiere der Prüfsubstanz in unterschiedlichen Konzentrationsstufen und für unterschiedliche Zeiträume ausgesetzt. Für alle Prüfungen werden „Nose-only"-Kammern verwendet (Ganzkörperkammern sind bei diesem Protokoll nicht praktikabel). Ein Fließdiagramm in Anlage 1 veranschaulicht dieses Protokoll. Eine Simulationsanalyse hat gezeigt, dass sowohl das traditionelle Protokoll und als auch das C-×-t-Protokoll robuste $LC_{50}$-Werte ergeben können, aber das C-×-t-Protokoll bei robusten $LC_{01}$- und $LC_{10}$-Werten im Allgemeinen überlegen ist (15).

34. Einer Simulationsanalyse zufolge ist die Verwendung von zwei Tieren je C-×-t-Intervall (ein Tier je Geschlecht bei Verwendung beider Geschlechter oder zwei Tiere des empfindlicheren Geschlechts) im Allgemeinen ausreichend, wenn in einer Hauptstudie 4 Konzentrationen und 5 Expositionszeiträume geprüft werden. Unter bestimmten Umständen kann der Studienleiter beschließen, je zwei Ratten beider Geschlechter je C-×-t-Intervall zu verwenden (15). Die Verwendung von zwei Tieren je Geschlecht je Konzentration und Zeitpunkt kann Verzerrungen und Schwankungen der Schätzungen verringern, die Quote der zutreffenden Schätzungen erhöhen und die Abdeckung des Konfidenzintervalls verbessern. Wenn die Daten jedoch keine ausreichende Annäherung für eine Schätzung erlauben (bei Verwendung von je einem Tier beider Geschlechter oder von zwei Tieren des empfindlicheren Geschlechts), kann auch eine fünfte Expositionskonzentration ausreichen. Das GD 39 (2) enthält weitere Hinweise zur Zahl der Tiere und zu den Konzentrationen, die in einer C-×-t-Studie zu verwenden sind.

▼M4

**Vorstudie: C-×-t-Protokoll**

35. Eine Vorstudie dient dazu, die Wirkstärke der Prüfsubstanz einzuschätzen und die Festlegung der Expositionskonzentrationen für die Hauptstudie zu erleichtern. Um eine geeignete Ausgangskonzentration für die Hauptstudie festzulegen und möglichst wenig Tiere zu verwenden, kann eine Vorstudie mit bis zu drei Tieren/Geschlecht/Konzentration [Einzelheiten siehe Anlage III von GD 39 (2)] erforderlich sein. Zur Feststellung eines geschlechtsspezifischen Unterschieds müssen gegebenenfalls drei Tiere je Geschlecht verwendet werden. Diese Tiere sind für einen einzigen Zeitraum, im Allgemeinen 240 Minuten, zu exponieren. Die Erzeugung geeigneter Prüfatmosphären ist in technischen Vorversuchen ohne Tiere zu erproben. Wenn Mortalitätsdaten aus einer Studie nach B.52 (4) vorliegen, braucht normalerweise keine Vorstudie durchgeführt zu werden. Bei der Festlegung der anfänglichen Zielkonzentration einer Studie nach B.2 sollte der Studienleiter die in allen verfügbaren B.52-Studien (4) beobachteten Mortalitätsmuster für beide Geschlechter und für alle geprüften Konzentrationen berücksichtigen [siehe GD 39 (2)].

**Ausgangskonzentration: C-×-t-Protokoll**

36. Die Ausgangskonzentration (Exposition I) (Anlage 1) ist entweder eine Grenzkonzentration oder eine vom Studienleiter auf Basis der Vorstudie gewählte Konzentration. Gruppen von je einem Tier beider Geschlechter werden dieser Konzentration für unterschiedliche Zeiträume ausgesetzt (z. B. 15, 30, 60, 120 oder 240 Minuten), so dass insgesamt 10 Tiere verwendet werden (Exposition I) (Anlage 1).

37. Die Wahl der Grenzkonzentrationen hängt im Allgemeinen von den Regulierungsanforderungen ab. Wird die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 zugrunde gelegt, so betragen die Grenzkonzentrationen für Gase, Dämpfe und Aerosole 20 000 ppm, 20 mg/l bzw. 5 mg/l (oder die höchste erreichbare Konzentration) (3). Bei bestimmten Prüfsubstanzen, insbesondere bei Dämpfen und Aerosolen, kann es technisch schwierig sein, Grenzkonzentrationen zu erzeugen. Bei der Prüfung von Aerosolen sollte eine lungengängige Partikelgröße (d. h. ein MMAD von 1-4 μm) bei einer Grenzkonzentration von 2 mg/l erreicht werden. Dies ist bei den meisten Prüfsubstanzen möglich. Aerosole sollten nur dann bei mehr als 2 mg/l geprüft werden, wenn eine lungengängige Partikelgröße erreicht werden kann [siehe DG 39 (2)]. Die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 rät aus Tierschutzgründen von der Prüfung über einer Grenzkonzentration ab (3). Prüfungen über der Grenzkonzentration sollten nur in Betracht gezogen werden, wenn eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass die Ergebnisse einer solchen Prüfung von unmittelbarer Relevanz für den Schutz der menschlichen Gesundheit sind (3); dies ist im Prüfbericht zu begründen. Bei potenziell explosiven Prüfsubstanzen ist darauf zu achten, dass keine explosionsfördernden Bedingungen geschaffen werden. Vor der Prüfung bei der Ausgangskonzentration sollte ein Probedurchlauf ohne Tiere vorgenommen werden, um eine unnötige Verwendung von Versuchstieren zu vermeiden und sicherzustellen, dass die Kammerbedingungen für diese Konzentration erreicht werden können.

38. Werden bei der Ausgangskonzentration Mortalität oder Siechtum beobachtet, können die Ergebnisse dieser Konzentration als Ausgangspunkt für weitere Prüfungen bei anderen Konzentrationen dienen (siehe Hauptstudie). Wenn eine Grenzkonzentration wegen der physikalischen oder chemischen Eigenschaften einer Prüfsubstanz nicht erreicht werden kann, sollte die höchste erreichbare Konzentration geprüft werden. Wenn bei der höchsten erreichbaren Konzentration eine Letalität von weniger als 50 % auftritt, sind keine weiteren Prüfungen erforderlich. Konnte die Grenzkonzentration nicht erreicht werden, sollte der Prüfbericht eine Erklärung und entsprechende Daten enthalten. Wenn die höchste erreichbare Konzentration eines Dampfs keine Toxizität hervorruft, muss die Prüfsubstanz möglicherweise als Flüssigkeitsaerosol angewendet werden.

▼M4

**Hauptstudie: C-×-t-Protokoll**

39. Die in der Hauptstudie geprüfte Ausgangskonzentration (Exposition I) (Anlage 1) ist entweder eine Grenzkonzentration oder eine vom Studienleiter auf Basis der Vorstudie gewählte Konzentration. Wenn während oder nach der Exposition I Mortalität beobachtet wurde, gilt die Mindestexposition (c × t), die zu Mortalität führt, als Anhaltspunkt für die Festlegung der Expositionskonzentration und -dauer für die Exposition II. Jede folgende Exposition hängt von der vorhergehenden Exposition ab (siehe Anlage 1).

40. Bei vielen Prüfsubstanzen sind die bei der Ausgangskonzentration erzielten Ergebnisse zusammen mit drei zusätzlichen Expositionen mit einem kleineren Zeitraster (das ist der geometrische Abstand von Expositionsperioden, der angegeben wird durch den Faktor zwischen aufeinanderfolgenden Perioden, im Allgemeinen √2) ausreichend, um die C-×-t-Mortalitätsbeziehung festzulegen (15), aber es kann hilfreich sein, eine fünfte Expositionskonzentration zu verwenden [siehe Anlage 1 und GD 39 (2)]. Anlage 1 enthält Hinweise zur mathematischen Aufbereitung der Ergebnisse für das C-×-t-Protokoll.

BEOBACHTUNGEN

41. Die Tiere sollten während der Exposition häufig auf klinische Zeichen beobachtet werden. Nach der Exposition sollten klinische Beobachtungen mindestens zweimal am Tag der Exposition oder, falls es aufgrund der Reaktion der Tiere auf die Behandlung angezeigt erscheint, häufiger und danach für einen Zeitraum von insgesamt 14 Tagen mindestens einmal täglich vorgenommen werden. Die Länge des Beobachtungszeitraums ist nicht festgelegt; sie sollte nach Art und Zeitpunkt des Einsetzens klinischer Zeichen und der Länge der Erholungsphase bestimmt werden. Der Zeitpunkt, zu dem die Toxizitätszeichen auftreten und wieder abklingen, ist von Bedeutung, insbesondere dann, wenn Anzeichen für ein verzögertes Auftreten von Toxizitätszeichen erkennbar sind. Sämtliche Beobachtungen werden systematisch in Einzelprotokollen dokumentiert, die für jedes Tier geführt werden. Tiere, bei denen ein moribunder Zustand festgestellt wird, sowie Tiere, die starke Schmerzen haben oder anhaltende Anzeichen von schwerem Leiden zeigen, sollten aus Tierschutzgründen auf humane Weise getötet werden. Bei den Untersuchungen auf klinische Toxizitätszeichen ist darauf zu achten, dass ein anfänglich schlechtes Aussehen und vorübergehende Atemveränderungen, die auf das Expositionsverfahren zurückzuführen sind, nicht mit einer durch die Prüfsubstanz bedingten Toxizität verwechselt werden, die eine vorzeitige Tötung der Tiere erfordern würde. Die im Guidance Document on Humane Endpoints (GD 19) zusammengefassten Prinzipien und Kriterien sind zu berücksichtigen (7). Wenn Tiere aus humanen Gründen getötet werden oder ihr Tod festgestellt wird, sollte der Todeszeitpunkt so genau wie möglich registriert werden.

42. Bei den Beobachtungen ist auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen und Schleimhäuten sowie Atmung, Kreislauf, autonomes und zentrales Nervensystem, Somatomotorik und Verhaltensmuster zu achten. Soweit möglich, ist auf Differenzierungen zwischen lokalen und systemischen Wirkungen zu achten. Besonderes Augenmerk ist auf Tremor, Konvulsionen, Salivation, Diarrhö, Lethargie, Schlaf und Koma zu richten. Die Messung der Rektaltemperatur kann zusätzliche Belege für mit der Behandlung oder Unterbringung zusammenhängende Reflex-Bradypnoe oder Hypo-/Hyperthermie liefern.

**Körpergewicht**

43. Das Körpergewicht der einzelnen Tiere sollte einmal während der Eingewöhnungszeit, am Tag der Exposition vor der Exposition (Tag 0) und mindestens an den Tagen 1, 3 und 7 (und danach wöchentlich) sowie zum Zeitpunkt des Todes oder der Tötung, falls später als Tag 1, dokumentiert werden. Das Körpergewicht gilt als kritischer Indikator für Toxizität; Tiere, die gegenüber ihrem Gewicht vor der Prüfung eine dauerhafte Abnahme um ≥ 20 % aufweisen, sollten sorgfältig überwacht werden. Die überlebenden Tiere werden gewogen und am Ende der Post-Expositionsphase auf humane Weise getötet.

▼M4

**Pathologie**

44. Alle Versuchstiere (einschließlich der Tiere, die während des Tests sterben oder aus Tierschutzgründen getötet und aus der Studie genommen werden) sind auf makroskopische Veränderungen zu untersuchen. Kann die Nekropsie nicht unmittelbar nach Auffinden eines toten Tieres erfolgen, sollte der Körper auf eine Temperatur gekühlt (nicht eingefroren) werden, die tief genug ist, um die Autolyse zu minimieren. Die Nekropsie ist baldmöglichst, in der Regel innerhalb von einem oder zwei Tagen durchzuführen. Alle makroskopischen Veränderungen sollten für jedes Tier protokolliert werden, wobei besonders auf Veränderungen der Atemwege zu achten ist.

45. Es kann in Betracht gezogen werden, von vorneherein zusätzliche Untersuchungen in die Studienauslegung aufzunehmen, die die Aussagekraft der Studie erhöhen, z. B. die Messung des Lungengewichts überlebender Ratten und/oder den Nachweis einer Reizwirkung durch mikroskopische Untersuchung der Atemwege. Untersucht werden können auch diejenigen Organe, die bei 24 Stunden oder länger überlebenden Tieren makroskopische Befunde aufweisen, sowie Organe, die bekanntermaßen oder vermutlich betroffen sind. Eine mikroskopische Untersuchung des gesamten Atemtrakts kann nützliche Informationen über Prüfsubstanzen liefern, die mit Wasser reagieren, z. B. Säuren und hygroskopische Prüfsubstanzen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Daten**

46. Das Körpergewicht der einzelnen Tiere und Sektionsbefunde sollten angegeben werden. Die Daten der klinischen Beobachtung sollten in tabellarischer Form zusammengefasst werden. Daraus müssen für jede Prüfgruppe die Anzahl der verwendeten Tiere, die Anzahl der Tiere mit spezifischen Toxizitätszeichen, die Anzahl der Tiere, die während der Prüfung tot aufgefunden oder vorzeitig getötet wurden, der Todeszeitpunkt der einzelnen Tiere, eine Beschreibung und der zeitliche Verlauf der toxischen Wirkungen und deren Reversibilität sowie die Sektionsbefunde ersichtlich sein.

**Prüfbericht**

47. Der Prüfbericht sollte, soweit zutreffend, die folgenden Informationen enthalten:

*Versuchstiere und Tierhaltung*

— Beschreibung der Haltungsbedingungen mit Angaben zu Anzahl (oder Veränderung der Anzahl) der Tiere je Käfig, Einstreu, Umgebungstemperatur und relativer Luftfeuchtigkeit, Photoperiode und Futter,

— Art/Stamm und Begründung für die Verwendung einer anderen Art als der Ratte,

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere,

— Randomisierungsmethode,

— Angaben über Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Wasserquelle),

— Beschreibung etwaiger Vorbereitung vor der Prüfung, einschließlich Ernährung, Quarantäne und Behandlung von Krankheiten.

▼M4

*Prüfsubstanz*

— physikalische Beschaffenheit, Reinheit und, wenn maßgeblich, physikalisch-chemische Eigenschaften (einschließlich Isomerisierung),

— Angaben zur Identifikation und CAS-Nummer (Chemical Abstract Services), falls bekannt.

*Vehikel*

— Begründung für die Verwendung eines Vehikels sowie für die Wahl des Vehikels (falls nicht Wasser),

— historische oder parallel erzeugte Daten, die belegen, dass das Vehikel keinen Einfluss auf das Ergebnis der Studie hat.

*Inhalationskammer*

— Beschreibung der Inhalationskammer mit Angabe von Abmessungen und Volumen,

— Herkunft und Beschreibung der für die Exposition der Tiere sowie für die Erzeugung der Atmosphäre verwendeten Ausrüstung,

— Ausrüstung für die Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Partikelgröße und tatsächlicher Konzentration,

— Herkunft der Luft und Behandlung der eingeleiteten/entzogenen Luft sowie Klimatisierungssystem,

— für die Kalibrierung der Ausrüstung verwendete Methoden, um eine homogene Prüfatmosphäre sicherzustellen,

— Druckunterschied (positiv oder negativ),

— Expositions-Öffnungen je Kammer („Nose-only"-Exposition); Anordnung der Tiere im System (Ganzkörperexposition),

— zeitliche Homogenität/Stabilität der Prüfatmosphäre,

— Lage von Temperatur- und Feuchtigkeitssensoren und Ort der Probenahme der Prüfatmosphäre in der Kammer,

— Luftdurchflussraten, Luftdurchflussrate/Expositions-Öffnung („Nose-only"-Exposition) oder Anzahl der Tiere je Kammer (Ganzkörperexposition),

— Angaben zur Ausrüstung für die Messung des Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalts, falls zutreffend,

— bis zum Erreichen des Gleichgewichts in der Inhalationskammer benötigte Zeit ($t_{95}$),

— Zahl der Volumenänderungen pro Stunde,

— Messgeräte (falls zutreffend).

*Expositionsdaten*

— Begründung für die Wahl der Zielkonzentration in der Hauptstudie,

— nominale Konzentrationen (Gesamtmasse der in die Inhalationskammer eingeleiteten Prüfsubstanz dividiert durch das Volumen der durch die Kammer geleiteten Luft),

— im Atembereich der Tiere ermittelte tatsächliche Konzentrationen der Prüfsubstanz; bei Gemischen mit heterogenen physikalischen Formen (Gase, Dämpfe, Aerosole) kann jede Form getrennt analysiert werden,

▼M4

— alle Luftkonzentrationen sollten in Masseneinheiten angegeben werden (z. B. mg/l, mg/$m^3$ usw.), Volumeneinheiten können in Klammern ebenfalls angegeben werden (z. B. ppm, ppb usw.),

— Partikelgrößenverteilung, mittlerer aerodynamischer Massendurchmesser (MMAD) und geometrische Standardabweichung (σg), einschließlich der Berechnungsmethoden. Einzelne Partikelgrößenanalysen sind zu protokollieren.

*Prüfbedingungen*

— Angaben zur Vorbereitung der Prüfsubstanz, einschließlich Angaben zu den Verfahren zur Reduzierung der Partikelgröße von Feststoffen oder zur Herstellung von Lösungen der Prüfsubstanz. Wenn die Zusammensetzung der Prüfsubstanz durch mechanische Prozesse verändert worden sein kann, sind die Ergebnisse der Analysen zur Überprüfung der Zusammensetzung der Prüfsubstanz beizufügen,

— eine Beschreibung (möglichst mit Diagramm) der Ausrüstung, die zur Erzeugung der Prüfatmosphäre und zur Exposition der Tiere gegen die Prüfatmosphäre verwendet wurde,

— Angaben zur verwendeten chemischen Analysemethode und zur Validierung der Methode (einschließlich der Effizienz der Wiederfindung der Prüfsubstanz im Medium),

— Begründung für die Wahl der Prüfkonzentrationen.

*Ergebnisse*

— tabellarische Darstellung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftstrom in der Kammer,

— tabellarische Darstellung von Daten zur nominalen und tatsächlichen Konzentration in der Kammer,

— tabellarische Darstellung der Partikelgrößendaten einschließlich Daten zur analytischen Probenahme, Partikelgrößenverteilung und Berechnung des MMAD und der $\sigma_g$,

— tabellarische Darstellung der erhobenen Daten und der Konzentration für jedes einzelne Tier (d. h. Tiere, die Anzeichen für Toxizität zeigen, einschließlich Mortalität sowie Art, Schweregrad, Zeitpunkt des Einsetzens und Dauer der Wirkungen),

— während der Prüfung erfasstes Körpergewicht der einzelnen Tiere, Datum und Zeitpunkt des Todes, falls vor geplanter Tötung; zeitlicher Verlauf des Einsetzens von Toxizitätsanzeichen sowie Angabe, ob diese reversibel waren, für jedes einzelne Tier,

— Sektionsbefunde und histopathologische Ergebnisse für jedes einzelne Tier, falls vorhanden,

— Letalitätsschätzungen (z. B. $LC_{50}$, $LD_{01}$), einschließlich Konfidenzintervalle von 95 %, und Steigung (falls von der Bewertungsmethode vorgesehen),

— statistische Beziehung, einschließlich Schätzung des Exponenten n (c-×-t-Protokoll). Die verwendete Statistiksoftware ist anzugeben.

▼M4

*Diskussion und Auswertung der Ergebnisse*

— Besondere Aufmerksamkeit sollte der Beschreibung der Methoden gelten, die verwendet wurden, um die Kriterien dieser Prüfmethode zu erfüllen, z. B. die Grenzkonzentration oder die Partikelgröße.

— Die Lungengängigkeit von Partikeln vor dem Hintergrund der Gesamtbefunde sollte behandelt werden, insbesondere, wenn die Partikelgrößenkriterien nicht erfüllt werden konnten.

— Falls Tiere, die unter Schmerzen litten oder Zeichen für schweres und anhaltendes Leiden aufwiesen, auf humane Weise getötet werden mussten, ist eine Erklärung auf der Grundlage der Kriterien im OECD Guidance Document on Humane Endpoints (8) zu geben.

— Wenn eine Prüfung nach Kapitel B.52 dieses Anhang (4) zugunsten dieser Prüfmethode B.2 abgebrochen wurde, ist dies zu begründen.

— Die Kohärenz der Methoden zur Bestimmung der nominalen und der tatsächlichen Konzentration sowie die Beziehung der tatsächlichen Konzentration zur nominalen Konzentration sind in die Gesamtbewertung der Studie aufzunehmen.

— Die wahrscheinliche Todesursache und die vorherrschende Wirkungsweise (systemisch oder lokal) sollten behandelt werden.

*LITERATUR:*

1. OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

2. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

3. Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

4. Kapitel B.52 dieses Anhangs, Akute Inhalationstoxizität — akut toxische Klassenmethode.

5. Kapitel B.40 dieses Anhangs, In-vitro-Prüfung auf hautätzende Wirkung: TER-Test (transcutaneous electrical resistance test)

6. Kapitel B.40bis dieses Anhangs, In-vitro-Prüfung auf hautätzende Wirkung: Test mit menschlichem Hautmodell)

7. OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9. SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

10. Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

11. Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

12. Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

13. Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

14. Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

15. OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

16. Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINITION

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

▼M4

*Anlage 1*

**C-×-t-Protokoll**

1. Bei der Bewertung der Inhalationstoxizität kann als Alternative zu einem traditionellen Protokoll eine schrittweise Konzentrations-×-Zeit-Studie (c × t) in Betracht gezogen werden (12) (13) (14). Sie sollte vorzugsweise dann angewendet werden, wenn wegen einer spezifischen Regelung oder aus wissenschaftlicher Notwendigkeit eine Prüfung von Tieren über unterschiedliche Zeiträume erforderlich ist, z. B. für Zwecke der Notfallplanung oder für die Flächennutzungsplanung. Diese Methode beginnt normalerweise mit der Prüfung der Prüfsubstanz in einer Grenzkonzentration (Exposition I), bei der die Tiere der Prüfsubstanz für fünf Zeiträume ausgesetzt werden (z. B. 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten), so dass innerhalb einer Exposition Ergebnisse für mehrere Zeiträume erzielt werden (siehe Abbildung 1). Wird die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 zugrunde gelegt, so betragen die Grenzkonzentrationen für Gase, Dämpfe und Aerosole 20 000 ppm, 20 mg/l bzw. 5 mg/l. Diese Werte dürfen nur überschritten werden, wenn eine regulatorische oder wissenschaftliche Notwendigkeit für die Prüfung mit diesen höheren Werten besteht (siehe Nummer 37 im Haupttext von Kapitel B.2).

2. Liegen nur wenig oder keine Informationen über die Toxizität einer Prüfsubstanz vor, sollte eine Vorstudie durchgeführt werden, bei der Gruppen von höchstens drei Tieren beider Geschlechter den vom Studienleiter festgelegten Zielkonzentrationen im Allgemeinen für 240 Minuten ausgesetzt werden.

3. Wenn bei der Exposition I eine Grenzkonzentration geprüft wird und die Mortalität bei unter 50 % liegt, sind keine weiteren Prüfungen erforderlich. Besteht eine regulatorische oder wissenschaftliche Notwendigkeit zur Festlegung der Konzentrations-/Zeit-/Wirkungs-Beziehung bei höheren Werten als der angegebenen Grenzkonzentration, sollte die nächste Exposition auf einem höheren Niveau, z. B. dem Doppelten der Grenzkonzentration, durchgeführt werden (d. h. 2L in Abbildung 1).

4. Wenn bei der Grenzkonzentration Toxizität beobachtet wird, sind zusätzliche Prüfungen (Hauptstudie) erforderlich. Diese zusätzlichen Expositionen werden entweder bei niedrigeren Konzentrationen (in Abbildung 1: Expositionen II, III oder IV‘) oder bei höheren Konzentrationen von kürzerer Dauer (in Abbildung 1: Exposition IV) durchgeführt, wobei angepasste Zeiträume mit geringerem Abstand verwendet werden.

5. Die Prüfung (Ausgangskonzentration und zusätzliche Konzentrationen) wird mit je einem Tier beider Geschlechter je Konzentration/Zeitpunkt oder zwei Tieren des empfindlicheren Geschlechts je Konzentration/Zeitpunkt durchgeführt. Unter bestimmten Umständen kann der Studienleiter entscheiden, je zwei Ratten beider Geschlechter je Konzentration/Zeitpunkt (oder vier Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Konzentration/Zeitpunkt) zu verwenden (15). Die Verwendung von zwei Tieren je Geschlecht je Konzentration/Zeitpunkt verringert im Allgemeinen Verzerrungen und Schwankungen der Schätzungen, erhöht die Quote der zutreffenden Schätzungen und verbessert die Abdeckung des Konfidenzintervalls gegenüber dem hier beschriebenen Protokoll. GD 39 (2) enthält nähere Hinweise.

6. Im Idealfall wird jede Exposition innerhalb eines Tages durchgeführt. Bei dieser Vorgehensweise kann die nächste Exposition auf einen Zeitpunkt gelegt werden, an dem mit angemessener Gewissheit vom Überleben der Tiere ausgegangen werden kann. Außerdem kann der Studienleiter die Zielkonzentration und Dauer der nächsten Exposition anpassen. Es empfiehlt sich, jede Exposition mit der Gruppe zu beginnen, die am längsten exponiert sein wird, z. B. die 240-Minuten-Gruppe, gefolgt von der 120-Minuten-Gruppe usw. Wenn beispielsweise Tiere in der 240-Minuten-Gruppe nach 90 Minuten sterben oder deutliche Toxizitätszeichen aufweisen (wie extreme Veränderungen der Atmung, z. B. Atemnot), wäre es nicht sinnvoll, eine Gruppe für 120 Minuten der Prüfsubstanz auszusetzen, da die Mortalität wahrscheinlich 100 % betragen würde. Der Studienleiter sollte dann für diese Konzentration eine kürzere Expositionsdauer festlegen (z. B. 90, 65, 45, 33 und 25 Minuten).

▼M4

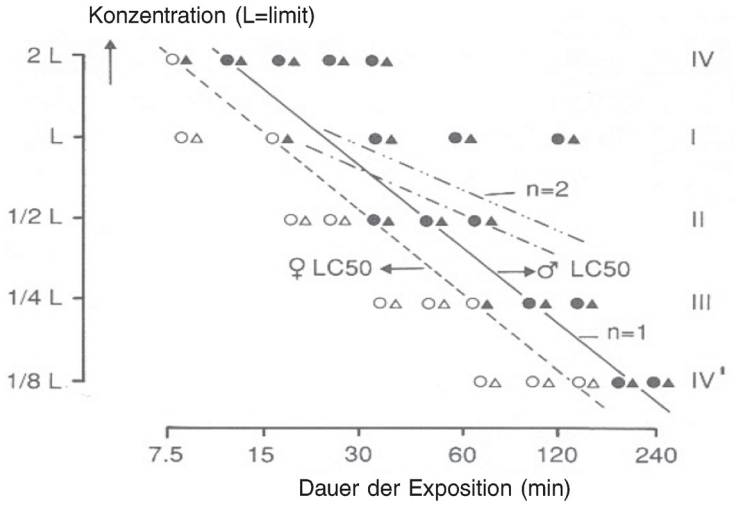
7. Die Konzentration in der Kammer sollte häufig gemessen werden, um für jede Expositionsdauer die zeitgewichtete Durchschnittskonzentration zu bestimmen. Soweit möglich, sollte bei jedem Tier der Todeszeitpunkt (nicht die Expositionsdauer) für die statistische Analyse verwendet werden.

8. Die Ergebnisse der ersten vier Expositionen sollten auf Datenlücken in der Konzentrations-Zeit-Kurve geprüft werden (siehe Abbildung 1). Wenn eine unzureichende Annäherung gegeben ist, kann eine zusätzliche Exposition (fünfte Konzentration) durchgeführt werden. Konzentration und Expositionsdauer der fünften Exposition sollten so gewählt werden, dass diese Lücke geschlossen wird.

9. Die Konzentrations-Zeit-Wirkungsbeziehung wird durch statistische Analyse unter Einbeziehung aller Expositionen (einschließlich der Exposition I) berechnet (16). Soweit möglich, sollten für jedes c-×-t-Intervall die zeitgewichtete Durchschnittskonzentration und die Expositionsdauer bis zum Tod (falls der Tod während der Exposition eintritt) verwendet werden.

*Abbildung 1*

**Hypothetische Darstellung einer Konzentrations-Zeit-Mortalitäts-Beziehung bei Ratten**




Offene Symbole = überlebende Tiere; geschlossene Symbole = tote Tiere

Dreiecke = Weibchen; Kreise = Männchen

Durchgezogene Linie = $LC_{50}$-Werte (Bereich 7,5-240 min) für männliche Tiere mit n = 1

Gestrichelte Linie = $LC_{50}$-Werte (Bereich 7,5-240 min) für weibliche Tiere mit n = 1

Gestrichelt-gepunktete Linien = hypothetische $LC_{50}$-Werte für männliche und weibliche Tiere, falls n = 2 war (12).

Glossar

Konzentration:

Dauer der Exposition:

▼M4

10. Beispiel für das schrittweise Verfahren:

**Exposition I — Prüfung bei der Grenzkonzentration (siehe Abbildung 1)**

— 1 Tier/Geschlecht je Konzentration/Zeitpunkt; 10Tiere insgesamt ([a])

— Zielkonzentration ([b]) = Grenzkonzentration

— Exposition von fünf Gruppen von Tieren bei dieser Zielkonzentration für eine Dauer von 15, 30, 60, 120 bzw. 240 Minuten

↓

**Exposition II** ([c])**— Hauptstudie**

— 1 Tier/Geschlecht je Konzentration/Zeitpunkt; 10 Tiere insgesamt

— Exposition von fünf Gruppen von Tieren bei niedrigerer Konzentration ([d]) (1/2L) mit etwas längerer Expositionsdauer (Abstand Faktor √2; siehe Abbildung 1).

↓

**Exposition III — Hauptstudie**

— 1 Tier/Geschlecht je Konzentration/Zeitpunkt; 10 Tiere insgesamt

— Exposition von fünf Gruppen von Tieren bei niedrigerer Konzentration ([d]) (1/4L) mit etwas längerer Expositionsdauer (Abstand Faktor √2; siehe Abbildung 1).

↓

**Exposition IV' — Hauptstudie**

— 1 Tier/Geschlecht je Konzentration/Zeitpunkt; 10 Tiere insgesamt

— Exposition von fünf Gruppen von Tieren bei niedrigerer Konzentration ([d]) (1/8L) mit etwas längerer Expositionsdauer (Abstand Faktor √2; siehe Abbildung 1).

**↓ oder**

([a]) Liegen keine Informationen über geschlechtsspezifische Empfindlichkeit vor, sind Ratten beider Geschlechter zu verwenden, d. h. 1 Tier/Geschlecht je Konzentration. Auf der Grundlage der vorhandenen Informationen, oder falls sich im Laufe der Exposition zeigt, dass ein Geschlecht empfindlicher ist, werden während der weiteren Prüfung auf jeder Konzentrationsstufe 10 Tiere des empfindlichen Geschlechts (2 Tiere je Konzentration/Zeitpunkt) verwendet.

([b]) Wird die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 zugrunde gelegt, so betragen die Grenzkonzentrationen für Gase, Dämpfe und Aerosole 20 000 ppm, 20 mg/l bzw. 5 mg/l. Wenn mit Toxizität gerechnet wird oder die Ergebnisse der Vorstudie darauf hindeuten, sollten niedrigere Ausgangskonzentrationen gewählt werden. Bei regulatorischer oder wissenschaftlicher Notwendigkeit können höhere Konzentrationen verwendet werden.

([c]) Im Idealfall sollten die Tiere erst dann der nächsten Konzentrationsstufe ausgesetzt werden, wenn mit angemessener Gewissheit vom Überleben der zuvor getesteten Tiere ausgegangen werden kann. Dies gibt dem Studienleiter die Möglichkeit, Zielkonzentration und Dauer für die nächste Exposition anzupassen.

([d]) Die kleinste Dosis (Konzentration × Zeit), die während der Prüfung bei der Ausgangskonzentration (Exposition I) zu einem Todesfall geführt hat, dient als Anhaltspunkt für die Festlegung der nächsten Kombination von Konzentration und Expositionsdauer. Normalerweise wird die Konzentration halbiert (1/2L), und die Tiere werden für eine neue, feiner unterteilte Zeitspanne exponiert, wobei die Expositionszeiten eine geometrische Folge mit dem Faktor 1,4 (√2, siehe Literaturangabe 11) bilden, in deren Mitte diejenige Zeitdauer liegt, die der kleinsten letalen Dosisstufe (Zeit × Konzentration) entspricht, die bei der ersten Exposition beobachtet wurde. In dieser Abbildung 1 wurde bei der Exposition I nach 15 Minuten der erste Todesfall beobachtet. Die Zeiträume der Exposition II liegen daher um 30 Minuten und betragen 15, 21, 30, 42 und 60 Minuten. Es wird dringend empfohlen, die Daten nach den ersten beiden Expositionen wie in der obigen Abbildung grafisch darzustellen und zu prüfen, ob die Beziehung zwischen Konzentration und Zeit einen Winkel von 45° (n = 1) aufweist oder ob die Konzentrations-Zeit-Wirkungsbeziehung weniger steil (z. B. n = 2) oder steiler (z. B. n = 0,8) ist. In den letztgenannten Fällen wird dringend empfohlen, die nächsten Konzentrationen und Expositionszeiträume entsprechend anzupassen.

▼M4

**Exposition IV — Hauptstudie**

— 1 Tier/Geschlecht je Konzentration/Zeitpunkt; 10 Tiere insgesamt

— Exposition von fünf Gruppen von Tieren bei höherer Konzentration (e) (2L) mit etwas kürzerer Expositionsdauer (Abstand Faktor √2; siehe Abbildung 1).

**Mathematische Aufbereitung der Ergebnisse für das c-×-t-Protokoll**

11. Ein c-×-t-Verfahren mit 4 oder 5 Expositionskonzentrationen und fünf Expositionszeiträumen ergibt 20 bzw. 25 Datenpunkte. Anhand dieser Datenpunkte kann die c-×-t-Beziehung durch statistische Analyse berechnet werden (16):

*Gleichung 1*

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

dabei ist: C = Konzentration; t = Expositionsdauer oder

*Gleichung 2*

$$Response = f(C^n t)$$

dabei ist: $n = b_1/b_2$.

Mit der Gleichung 1 kann der $LC_{50}$-Wert für einen bestimmten Zeitraum (z. B. 4 Stunden, 1 Stunde, 30 Minuten oder jeden Zeitraum innerhalb des geprüften Zeitbereichs) unter Verwendung von P = 5 (50 % Response) berechnet werden. Die Habersche Regel gilt nur, wenn n = 1. Der $LC_{01}$-Wert kann unter Verwendung von P = 2,67 berechnet werden.

(e) In bestimmten Fällen muss möglicherweise die Konzentration erhöht (2L) und eine neue, noch feiner unterteilte Zeitspanne festgelegt werden, wobei die Expositionszeiten eine geometrische Folge mit dem Faktor 1,4 (√2) bilden, in deren Mitte diejenige Zeitdauer liegt, die der kleinsten letalen Dosis entspricht, die bei der ersten Exposition beobachtet wurde. Die Mindestexpositionsdauer sollte möglichst mehr als 5 Minuten betragen; die Höchstexpositionsdauer sollte 8 Stunden nicht überschreiten.

▼B

B.3. **AKUTE TOXIZITÄT (DERMAL)**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B (Punkt A).

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B (Punkt B).

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird in abgestuften Dosierungen mehreren Versuchstiergruppen auf die Haut aufgetragen, und zwar eine Dosierung je Gruppe. Anschließend werden die beobachteten Vergiftungserscheinungen und Todesfälle registriert. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden seziert.

Tiere mit starken und anhaltenden Anzeichen von Leiden und Schmerzen können vorzeitig getötet werden; Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie auf diesem Wege aufgrund ihrer ätzenden oder reizenden Wirkungen ausgeprägte Schmerzen und Leiden verursachen, brauchen nicht geprüft zu werden.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1. **Vorbereitung**

Vor der Untersuchung werden die Tiere für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen in geeigneten Käfigen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde, junge erwachsene Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungsgruppen zugeordnet. Etwa 24 Stunden vor Versuchsbeginn wird das Fell der Versuchstiere auf dem Rücken durch Scheren oder Rasieren entfernt. Beim Scheren oder Abrasieren des Fells ist darauf zu achten, dass die Haut nicht verletzt wird, da dies zu einer Veränderung der Durchlässigkeit führen könnte. Mindestens 10 % der Körperoberfläche wird für die Applikation der Prüfsubstanz vorbereitet. Werden feste Stoffe verwendet, die gegebenenfalls pulverisiert werden können, sollte die Prüfsubstanz ausreichend mit Wasser oder ggf. einem geeigneten Vehikel angefeuchtet werden, um einen guten Kontakt mit der Haut sicherzustellen. Bei der Verwendung eines Vehikels ist dessen Einfluss auf das Eindringen der Prüfsubstanz in die Haut zu berücksichtigen. Flüssige Prüfsubstanzen werden im Allgemeinen unverdünnt angewendet.

1.6.2. **Prüfbedingungen**

1.6.2.1. *Versuchstiere*

Es können erwachsene Ratten oder Kaninchen verwendet werden. Auch andere Tierarten können verwendet werden, jedoch muss ihre Verwendung begründet werden. Es sollen bekannte Versuchstierstämme verwendet werden. Für jedes Geschlecht sollte die Schwankung des Körpergewichts der Tiere des jeweiligen Versuchs bei Versuchsbeginn nicht mehr als ± 20 % vom entsprechenden Mittelwert betragen.

▼B

1.6.2.2. *Anzahl und Geschlecht*

Mindestens 5 Tiere sind für jede Konzentration zu verwenden. Sie sollten alle vom gleichen Geschlecht sein. Wenn weibliche Tiere benutzt werden, dürfen diese weder geworfen haben noch trächtig sein. Wenn es Hinweise darauf gibt, dass ein Geschlecht deutlich empfindlicher reagiert, sollten Tiere dieses Geschlechts verwendet werden.

*Anmerkung:* Bei Prüfungen der akuten Toxizität an Tieren, die einer höheren Ordnung angehören als Nagetiere, sollte die Verwendung einer geringeren Anzahl an Tieren in Betracht gezogen werden. Die Dosierungen sollten sorgfältig ausgewählt und großer Wert darauf gelegt werden, mäßig toxische Dosierungen nicht zu überschreiten. Bei solchen Versuchen sollte die Verabreichung der Prüfsubstanz in letalen Dosen vermieden werden.

1.6.2.3. *Dosierungen*

Die Dosisgruppen (mindestens 3) sollten ausreichen, um nach entsprechenden Abstufungen Versuchsgruppen mit unterschiedlichen toxischen Wirkungen und Mortalitätsraten zu erhalten. Bei der Festlegung der Dosierungen sollte eine mögliche reizende oder ätzende Wirkung berücksichtigt werden. Die erhaltenen Daten sollten ausreichen, um eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufzuzeigen und — soweit möglich — eine annehmbare Bestimmung der $LD_{50}$ erlauben.

1.6.2.4. *Limit-Test*

Es kann ein Limit-Test mit einer einzigen Dosierung von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht an einer Gruppe von 5 männlichen und 5 weiblichen Tieren unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren durchgeführt werden. Wenn substanzbedingte Todesfälle festgestellt werden, sollte ein vollständiger Test erwogen werden.

1.6.2.5. *Beobachtungszeitraum*

Der Beobachtungszeitraum sollte mindestens 14 Tage betragen. Die Dauer der Beobachtung soll jedoch nicht starr festgelegt werden. Sie soll von der Art des Vergiftungsbildes, dem zeitlichen Auftreten der Symptome und der Dauer der Erholungsphase abhängig gemacht werden. Die Beobachtungszeit ist zu verlängern, falls es sich als notwendig erweist. Der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungserscheinungen auftreten und wieder abklingen, ihre Dauer sowie der Zeitpunkt des Todes sind von Bedeutung, vor allem dann, wenn Anzeichen für eine verzögerte Mortalität erkennbar sind.

1.6.3. **Versuchsdurchführung**

Die Tiere sollen einzeln in Käfigen gehalten werden. Die Prüfsubstanz ist einheitlich auf einen Bereich aufzutragen, der etwa 10 % der Körperoberfläche entspricht. Bei hochtoxischen Substanzen kann die behandelte Oberfläche kleiner sein; es sollte jedoch ein möglichst großer Bereich mit einer möglichst dünnen und einheitlichen Schicht behandelt werden.

Die Prüfsubstanz muss während einer Expositionszeit von 24 Stunden mittels eines porösen Mullverbandes und eines nicht reizenden Pflasters Kontakt mit der Haut haben. Die Versuchsfläche ist außerdem auf geeignete Art abzudecken, um den Mullverband und die Prüfsubstanz zu fixieren und sicherzustellen, dass die Tiere die Prüfsubstanz nicht oral aufnehmen können. Es können auch Mittel zur Einschränkung der Bewegungsfreiheit angewendet werden, damit die Tiere die Prüfsubstanz nicht oral aufnehmen können; eine vollständige Immobilisierung ist jedoch nicht zu empfehlen.

▼B

Nach Ablauf der Expositionszeit werden die Reste der Prüfsubstanz entfernt, soweit möglich unter Verwendung von Wasser oder mit einem anderen geeigneten Hautreinigungsverfahren.

Die Beobachtungen sind systematisch aufzuzeichnen. Für jedes Tier sind individuelle Aufzeichnungen anzufertigen. Am ersten Tag sind die Tiere häufig zu beobachten. Mindestens einmal pro Werktag sollte eine sorgfältige klinische Untersuchung erfolgen. Andere tägliche Beobachtungen und entsprechende Vorkehrungen sollen dem Ziel dienen, den Verlust an Tieren für die Studie weitestgehend einzuschränken, z. B. durch Autopsie oder Kühlung tot aufgefundener Tiere und durch Isolierung oder Tötung schwacher oder sterbender Tiere.

Die Beobachtungen beinhalten Veränderungen von Fell, behandelter Haut, Augen, Schleimhäuten, Atmung und Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie an der Somatomotorik und am Verhaltensmuster. Besonderes Augenmerk ist auf Tremor, Konvulsionen, Salivation, Diarrhö, Lethargie, Schlaf und Koma zu richten. Der Zeitpunkt des Todes ist so genau wie möglich festzuhalten. Die während des Versuchs gestorbenen und die bis zum Abschluss des Versuchs überlebenden Tiere werden seziert. Alle pathologischen Veränderungen sind zu protokollieren. Falls erforderlich, sollten Gewebe für eine histopathologische Untersuchung entnommen werden.

*Bewertung der Toxizität beim jeweils anderen Geschlecht*

Nach Beendigung des Versuchs mit Tieren eines bestimmten Geschlechts wird die Prüfsubstanz mindestens einer Gruppe von 5 Tieren des jeweils anderen Geschlechts verabreicht, um festzustellen, ob Tiere dieses Geschlechts nicht deutlich empfindlicher auf die Substanz reagieren. Unter bestimmten Bedingungen kann die Verwendung einer geringeren Anzahl von Tieren gerechtfertigt sein. Wenn ausreichend Hinweise dafür vorliegen, dass die Tiere des geprüften Geschlechts deutlich empfindlicher reagieren, kann auf eine Prüfung der Tiere des jeweils anderen Geschlechts verzichtet werden.

2. **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, der Zeitpunkt des Todes der einzelnen Tiere, die Zahl der Tiere mit weiteren Anzeichen der Giftwirkung, die Beschreibung der toxischen Wirkungen und die Sektionsbefunde hervorgehen. Die Bestimmung des Gewichts der einzelnen Tiere erfolgt unmittelbar vor Verabreichung der Prüfsubstanz, danach in wöchentlichen Abständen und zum Zeitpunkt des Todes. Gewichtsveränderungen sind zu bestimmen und aufzuzeichnen, sofern die Tiere länger als einen Tag überleben. Tiere, die aufgrund substanzbedingter Leiden und Schmerzen vorzeitig getötet werden, werden als substanzbedingte Todesfälle registriert. Die $LD_{50}$ ist mit einer anerkannten Methode zu berechnen.

Die Auswertung sollte auch — soweit vorhanden — die Beziehung zwischen Verabreichungsdosis sowie Auftreten und Schweregrad aller Abnormitäten einschließlich Verhaltensänderungen, klinischer Symptome, schwerer Schäden, Körpergewichtsveränderungen, Mortalität und sonstiger toxikologischer Wirkungen umfassen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

▼B

— Tierart, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter, usw.;

— Versuchsbedingungen (einschließlich des Hautreinigungsverfahrens und der Art des Verbandes: okklusiv oder semi-okklusiv);

— Dosierungen (ggf. mit Vehikel, falls verwendet, und Konzentrationen);

— Geschlecht der behandelten Tiere;

— Auflistung der Daten nach Geschlecht und Dosierung (Zahl der während des Versuchs gestorbenen oder getöteten Tiere, Zahl der Tiere mit Vergiftungserscheinungen, Zahl der exponierten Tiere);

— Zeitpunkt des Todes nach Auftragen der Prüfsubstanz, Gründe und Kriterien für das vorzeitige Töten der Tiere;

— sämtliche Beobachtungen;

— $LD_{50}$-Wert für das Geschlecht, das einem vollständigen Versuch unterzogen wurde, Bestimmung nach 14 Tagen (unter Angabe der Berechnungsmethode);

— 95 %-Vertrauensbereich für die $LD_{50}$ (soweit möglich);

— Dosis/Mortalitätskurve und Slope-Faktor (falls durch die Bestimmungsmethode möglich);

— Sektionsbefunde;

— ggf. histopathologische Befunde;

— ggf. Ergebnisse aus Versuchen mit Tieren des jeweils anderen Geschlechts;

— Diskussion der Ergebnisse (besondere Beachtung sollte dem Einfluss geschenkt werden, der das vorzeitige Töten von Tieren während des Versuchs auf den errechneten $LD_{50}$-Wert haben kann);

— Interpretation der Ergebnisse.

3.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B (Punkt D).

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B (Punkt E).

▼B

B.4. **AKUTE TOXIZITÄT: HAUTREIZUNG/-VERÄTZUNG**

1. **METHODE**

Diese Prüfmethode entspricht der OECD TG 404 (2002).

1.1. EINLEITUNG

Bei der Erarbeitung dieser aktualisierten Methode wurde besonderes Augenmerk auf mögliche Verbesserungen im Hinblick auf Belange des Tierschutzes und auf die Auswertung aller bereits vorhandenen Angaben über den Stoff gelegt, um unnötige Prüfungen an Labortieren zu vermeiden. Die vorliegende Methode beinhaltet die Empfehlung, vor der Durchführung des beschriebenen In-vivo-Tests zur Ermittlung des Verätzungs-/Reizungspotenzials des Stoffs eine kritische Analyse der vorhandenen einschlägigen Daten vorzunehmen. Sofern dazu nicht genügend Daten zur Verfügung stehen, können diese mit Hilfe sequenzieller Tests erzeugt werden (1). Die empfohlene Prüfstrategie enthält die Durchführung validierter und anerkannter In-vitro-Tests und wird in der Anlage zu dieser Methode ausführlich dargestellt. Zudem wird empfohlen, beim In-vivo-Vorversuch nach Möglichkeit die drei Mullläppchen, mit denen die Prüfsubstanz aufgetragen wird, nacheinander und nicht gleichzeitig am Körper des Tieres zu fixieren.

Im Interesse wissenschaftlicher Verlässlichkeit und des Tierschutzes sollen In-vivo-Tests erst dann durchgeführt werden, wenn alle für das Hautverätzungs-/-reizungspotenzial des Stoffs zur Verfügung stehenden einschlägigen Daten im Rahmen einer kritischen Analyse ausgewertet worden sind. Zu diesen Daten gehören unter anderem Erkenntnisse aus bereits durchgeführten Untersuchungen am Menschen und/oder an Labortieren; Hinweise auf Verätzungen/Reizungen durch strukturell verwandte Substanzen bzw. Gemische aus diesen Substanzen; Daten, die eine starke Azidität oder Alkalinität der Substanz belegen (2) (3), und die Ergebnisse validierter und anerkannter In-vitro- und Ex-vivo-Tests (4) (5) (5a). Diese Analyse soll dazu führen, dass weniger In-vivo-Untersuchungen zum Hautverätzungs-/-reizungspotenzial von Stoffen durchgeführt werden, wenn bereits andere Studien zu diesen beiden Endpunkten ausreichende Belege geliefert haben.

In der Anlage zu dieser Methode wird eine bevorzugte sequenzielle Prüfstrategie vorgestellt, welche die Durchführung validierter und anerkannter In-vitro- und Ex-vivo-Tests auf Verätzungs-/-Reizungswirkungen einbezieht. Diese Strategie wurde während eines OECD-Workshops (6) entwickelt und von den Teilnehmern einmütig empfohlen. Sie wurde als empfohlene Prüfstrategie für das Globale Harmonisierte System der Einstufung und Kennzeichnung Chemischer Stoffe (Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances = GHS) (7) angenommen. Es wird empfohlen, dass diese Prüfstrategie vor einem In-vivo-Test durchgeführt wird. Bei neuen Substanzen wird sie als stufenweiser Prüfansatz empfohlen, mit dessen Hilfe verlässliche wissenschaftliche Daten über die durch die Prüfsubstanz hervorgerufene Verätzung/Reizung erzielt werden können. Bei bereits bekannten Stoffen, für die nicht genügend Daten zum Hautverätzungs-/-reizungspotenzial vorliegen, soll die Strategie genutzt werden, um Datenlücken zu schließen. Der Einsatz einer anderen Prüfstrategie bzw. eines anderen Prüfverfahrens oder die Entscheidung gegen einen stufenweisen Prüfansatz soll gerechtfertigt werden.

Falls das Verätzungs-/Reizungspotenzial anhand einer gewichteten Analyse nicht ermittelt werden kann, die den Anforderungen der sequentiellen Prüfstrategie gerecht wird, soll ein In-vivo-Test ins Auge gefasst werden (siehe Anlage).

▼B

1.2. DEFINITIONEN

**Hautreizung:** Das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung nach Applikation einer Prüfsubstanz für die Dauer von bis zu 4 Stunden.

**Hautverätzung:** Das Auslösen einer irreversiblen Hautschädigung, d. h. einer sichtbaren, bis in das Corium reichenden Nekrose der Epidermis nach Applikation einer Prüfsubstanz für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Verätzungsreaktionen sind gekennzeichnet durch Geschwüre, Blutungen, blutige Verschorfungen und am Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen durch eine auf ein Ausbleichen der Haut zurückzuführende Verfärbung, komplett haarlose Bereiche und Narben. Bei unklaren Schädigungen sollen histopathologische Untersuchungen in Erwägung gezogen werden.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Prüfsubstanz wird in einer einmaligen Dosierung auf die Haut eines Versuchstiers aufgetragen; nicht behandelte Hautareale dienen als Kontrolle. Der Grad der Reizung/Verätzung wird in zuvor festgelegten Zeitabständen bestimmt und bewertet und anschließend beschrieben, um eine umfassende Beurteilung der Wirkung vornehmen zu können. Die Beobachtungsdauer soll ausreichend sein, um die Reversibilität bzw. Irreversibilität der Wirkungen vollständig zu erfassen,

Tiere mit starken und anhaltenden Anzeichen von Leiden und/oder Schmerzen können jederzeit wahrend des Versuchs human getötet werden, wobei die Substanz entsprechend einzustufen ist. Kriterien für die humane Tötung moribunder Tiere mit starken Anzeichen von Leiden sind dem Literaturhinweis (8) zu entnehmen.

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Vorbereitung des In-vivo-Tests**

1.4.1.1. *Auswahl der Tierspezies*

Das bevorzugte Labortier ist das Albino-Kaninchen, wobei für den Test gesunde junge erwachsene Kaninchen verwendet werden. Die Verwendung anderer Spezies ist zu begründen.

1.4.1.2. *Vorbereitung der Versuchstiere*

Etwa 24 Stunden vor dem Versuch wird das Fell auf dem Rücken der Versuchstiere gründlich geschoren. Dabei ist darauf zu achten, dass die Haut nicht verletzt wird. Es sind nur Tiere mit einer gesunden, unverletzten Haut zu verwenden.

Einige Kaninchenrassen haben Stellen mit dichtem Fellbewuchs, die zu bestimmten Zeiten im Jahr deutlicher hervortreten. An diesen Stellen soll keine Prüfung durchgeführt werden.

1.4.1.3. *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Die Tiere sollen einzeln gehalten werden. Die Temperatur im Versuchstierraum soll für Kaninchen 20 ºC (± 3 ºC) betragen. Obwohl die relative Luftfeuchtigkeit mindestens 30 % betragen und zu anderen Zeiten als wahrend der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen sollte, ist ein Wert von 50-60 % anzustreben. Der Raum soll künstlich beleuchtet sein, wobei die Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus ein- und ausgeschaltet werden soll. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist.

▼B

1.4.2. **Prüfverfahren**

1.4.2.1. *Applikation der Prüfsubstanz*

Die Prüfsubstanz soll auf eine kleine Hautfläche (etwa 6 $cm^2$) aufgetragen und mit einem Mullläppchen abgedeckt werden, das mit einem nicht reizenden Pflaster fixiert wird. Sofern eine direkte Applikation nicht möglich ist (z. B. bei Flüssigkeiten oder bestimmten Pasten), soll die Prüfsubstanz zunächst auf das Mullläppchen gegeben werden, das anschließend auf der Haut fixiert wird. Für die Dauer der Exposition soll das Läppchen mit einem geeigneten Okklusiv- oder Semi-Okklusiv-Verband lose auf der Haut gehalten werden. Wird die Prüfsubstanz auf ein Läppchen aufgebracht, so ist dieses so auf der Haut zu fixieren, dass ein guter Hautkontakt und die gleichmäßige Verteilung der Substanz auf der Haut gewährleistet sind. Es ist zu vermeiden, dass das Tier an das Mullläppchen gelangt und die Prüfsubstanz oral aufnehmen bzw. inhalieren kann.

Flüssige Prüfsubstanzen werden im Allgemeinen unverdünnt angewendet. Wird der Versuch mit Feststoffen durchgeführt (die im Bedarfsfall pulverisiert werden können), dann soll die Prüfsubstanz mit gerade so viel Wasser (bzw. gegebenenfalls mit einem anderen geeigneten Vehikel) angefeuchtet werden, dass ein guter Kontakt mit der Haut sichergestellt ist. Bei Verwendung eines anderen Vehikels als Wasser soll dessen möglicher Einfluss auf eine Reizung der Haut minimal sein.

Nach Ablauf der Expositionszeit, die in der Regel 4 Stunden beträgt, wird die restliche Prüfsubstanz möglichst mit Wasser oder einem geeigneten Lösungsmittel entfernt, ohne dass die bestehende Reaktion oder die Integrität der Epidermis beeinträchtigt wird.

1.4.2.2. *Dosierungen*

Im Falle von Flüssigkeiten werden 0,5 ml und im Falle von Feststoffen oder Pasten 0,5 g auf die vorbereitete Hautstelle aufgetragen.

1.4.2.3. *Vorversuch (In-vivo-Test auf Hautreizung/-verätzung an einem Tier)*

Es empfiehlt sich dringend, den In-vivo-Test zunächst nur an einem Tier durchzuführen. Dies gilt insbesondere, wenn der Verdacht besteht, dass der Stoff ein Verätzungspotenzial hat. Damit wird den Anforderungen der sequenziellen Prüfstrategie entsprochen (siehe Anlage 1).

Sofern ein Stoff anhand einer kritischen Analyse vorhandener Daten als ätzend eingestuft wurde, brauchen keine weiteren Tierversuche durchgeführt zu werden. Bei den meisten Stoffen mit einer vermuteten Ätzungswirkung erübrigen sich in der Regel In-vivo-Tests. Allerdings können in den Fällen, in denen angesichts einer unzureichenden Datenlage die Ermittlung zusätzlicher Daten gerechtfertigt scheint, in begrenztem Umfang Tierversuche durchgeführt werden, wobei folgendermaßen vorzugehen ist: Bis zu drei Läppchen werden nacheinander appliziert. Das erste Läppchen wird nach drei Minuten entfernt. Wird keine schwere Hautreaktion festgestellt, erfolgt die Applikation eines zweiten Läppchens, das nach einer Stunde entfernt wird. Lassen die Beobachtungen zu diesem Zeitpunkt den Schluss zu, dass eine Exposition für die Dauer von vier Stunden ethisch verantwortbar ist, wird ein drittes Läppchen appliziert und nach vier Stunden entfernt. Anschließend wird die Reaktion bewertet.

Der Versuch wird sofort abgebrochen, falls nach einer der drei sequenziellen Expositionen eine ätzende Wirkung beobachtet wird. Ist nach der Entfernung des letzten Läppchens keine Verätzung feststellbar, wird das Tier 14 Tage lang beobachtet, sofern nicht vor Ablauf dieser Zeit Verätzungen auftreten.

▼B

Geht man davon aus, dass die Prüfsubstanz zwar keine ätzende Wirkung hat, aber Hautreizungen hervorrufen kann, sollte nur ein Tier verwendet werden, dem ein einziges Läppchen für die Dauer von vier Stunden appliziert wird.

1.4.2.4. *Bestätigungstest (In-vivo-Test auf hautreizende Wirkungen an zusätzlichen Tieren)*

Wird im Vorversuch keine ätzende Wirkung beobachtet, dann soll die Reizungsreaktion bzw. die negative Reaktion an bis zu zwei weiteren Tieren mit jeweils einem Läppchen bei einer Expositionsdauer von vier Stunden bestätigt werden. Ergibt der Vorversuch eine Reizungswirkung, kann der Bestätigungstest als sequenzieller Versuch bzw. durch gleichzeitige Exposition von zwei weiteren Tieren durchgeführt werden. Findet ausnahmsweise kein Vorversuch statt, können zwei bzw. drei Tiere mit einem Läppchen behandelt werden, das nach vier Stunden entfernt wird. Bei Verwendung von zwei Versuchstieren, die beide die gleiche Reaktion zeigen, erübrigen sich weitere Untersuchungen. Andernfalls wird auch das dritte Tier getestet. Unklare Reaktionen könnten möglicherweise bewertet werden, indem Versuche mit weiteren Tieren durchgeführt werden.

1.4.2.5. *Beobachtungszeitraum*

Die Beobachtungszeit soll so bemessen sein, dass die Reversibilität der festgestellten Wirkungen vollständig bewertet werden kann. Allerdings sollte der Versuch abgebrochen werden, sobald das Tier starke und anhaltende Anzeichen von Leiden und Schmerzen zeigt. Um feststellen zu können, ob die Wirkungen reversibel sind, sollen die Tiere für die Dauer von bis zu 14 Tagen nach Entfernung der Läppchen beobachtet werden. Bilden sich die Schäden vor Ablauf dieser 14 Tage zurück, soll der Versuch zu dem betreffenden Zeitpunkt beendet werden.

1.4.2.6. *Klinische Beobachtungen und Bewertung von Hautreaktionen*

Die Tiere sind auf Anzeichen von Hautrötungen und Ödemen zu untersuchen, wobei die Reaktion 60 Minuten sowie 24, 48 und 72 Stunden nach Entfernen des Läppchens bewertet wird. Beim Vorversuch an einem Tier wird die behandelte Stelle auch unmittelbar nach Entfernen des Läppchens untersucht. Die Hautreaktionen werden bewertet und anhand der Punkteskala in der unten stehenden Tabelle dokumentiert. Im Falle von Hautschädigungen, die nach 72 Stunden weder als Reizung noch als Verätzung eingestuft werden können, ist unter Umständen die Beobachtung bis zum 14. Tag erforderlich, um Aussagen zur Reversibilität der Wirkungen treffen zu können. Neben Hautreizungen sollen alle örtlich begrenzten toxischen Wirkungen (z. B. Entfettung der Haut) und alle negativen systemischen Wirkungen (z. B. klinische Anzeichen für Toxizität und Veränderungen des Körpergewichts) vollständig beschrieben und dokumentiert werden. Unklare Reaktionen sollen gegebenenfalls durch eine histopathologische Untersuchung abgeklärt werden.

Die Bewertung von Hautreaktionen ist zwangsläufig subjektiv. Um die Einstufung von Hautreaktionen stärker zu vereinheitlichen und den Prüflabors und allen an den Versuchen und an der Interpretation der Versuchsergebnisse Beteiligten die Arbeit zu erleichtern, müssen die Prüfer im Umgang mit der Bewertungsskala (siehe unten stehende Tabelle) entsprechend geschult werden. Dabei könnte sich ein Leitfaden mit Abbildungen zur Bewertung von Hautreizungen und anderen Schädigungen als hilfreich erweisen (9).

2. **DATEN**

2.1. ERGEBNISDARSTELLUNG

Die Untersuchungsergebnisse sollen im Abschlussbericht in Tabellenform dargestellt werden und alle in Abschnitt 3.1 genannten Punkte umfassen.

▼B

2.2. ERGEBNISBEWERTUNG

Die Bewertung der Hautreizung soll anhand der Art und des Schweregrads der Schädigung und deren Reversibilität bzw. Irreversibilität vorgenommen werden. Die einzelnen ermittelten Schweregrade stellen keinen allein gültigen Maßstab für die hautreizenden Eigenschaften eines Stoffs dar, denn es werden auch andere Effekte der Prüfsubstanz beurteilt. Vielmehr sollten diese einzelnen Graduierungswerte als Referenzwerte betrachtet werden, die zusammen mit allen anderen Ergebnissen der Studie zu beurteilen sind.

Bei der Bewertung von hautreizenden Reaktionen spielt auch die Reversibilität der Hautschädigung eine Rolle. Bestehen Reaktionen wie (begrenzter) Haarausfall, Hyperkeratose, Hyperplasie und Schuppung bis zum Ende des 14-tägigen Beobachtungszeitraums, soll die Prüfsubstanz als hautreizender Stoff betrachtet werden.

3. **BERICHTERSTATTUNG**

3.1. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

Begründung für den In-vivo-Test: Kritische Analyse von Daten aus früheren Versuchen unter Einbeziehung von Ergebnissen aus der sequenziellen Prüfstrategie:

— Beschreibung aller einschlägigen Daten aus früheren Versuchen;

— Daten, die in den einzelnen Stufen der Prüfstrategie erhoben wurden;

— Beschreibung der durchgeführten In-vitro-Tests mit Einzelheiten zu angewandten Verfahren sowie zu den Ergebnissen für Prüf-/Referenzsubstanzen;

— Gewichtungsanalyse als Grundlage für die Durchführung einer In-vivo-Studie.

Prüfsubstanz:

— Angaben zur Identität (z. B. CAS-Nummer, Bezugsquelle, Reinheit, bekannte Verunreinigungen; Chargennummer);

— physikalische Beschaffenheit und physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. pH-Wert, Flüchtigkeit, Löslichkeit, Stabilität);

— bei Gemischen Zusammensetzung und relative Anteile der Bestandteile in Prozent,

Vehikel:

— Angaben zur Identität, (gegebenenfalls) Konzentration; Einsatzvolumen;

— Begründung der Auswahl des Vehikels.

Versuchstiere:

— verwendete Spezies/Rasse, Begründung für den Verzicht auf die Verwendung von Albino-Kaninchen und die Nutzung anderer Tiere;

— Anzahl der Versuchstiere pro Geschlecht;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn und -ende;

— Alter der Tiere bei Beginn der Studie;

— Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.

▼B

Prüfbedingungen:

— Methode der Vorbereitung des Hautareals, auf das die Mullläppchen appliziert werden;

— Angaben zu dem für die Läppchen verwendeten Material und zur Abdeckmethode;

— Angaben zur Herstellung, Applikation und Entfernung der Prüfsubstanz,

Ergebnisse:

— tabellarische Erfassung der Bewertung des Schweregrades von Hautreizungs-/-verätzungsreaktionen zu allen Messzeitpunkten für jedes einzelne Versuchstier;

— Beschreibung aller beobachteten Schädigungen;

— ausführliche Beschreibung von Art und Schwere der festgestellten Hautreizung bzw. -verätzung sowie Angaben zu eventuellen histopathologischen Befunden;

— Beschreibung anderer örtlich begrenzter negativer (z, B. Entfettung der Haut) und systemischer Wirkungen neben den Hautreizungen bzw. -verätzungen.

— Diskussion der Ergebnisse

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Banatt, M.D., Castell, J.V., Chamberiain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Genier, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.

(2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances Without Testing on Animals. Toxicol. In Vitro, 2, 19 -26.

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) ECETOC (1990) Monographie Nr. 15, „Skin Irritation“ (Hautreizung), Umwelt- und Technologiezentrum der Europäischen Chemischen Industrie, Brüssel.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G., und Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, S. 483-524.

(5a) Prüfmethode B.40: Hautverätzung.

(6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Solna, Schweden, 22.-24. Januar 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, bestätigt auf der 28. Gemeinsamen Tagung des Chemikalien-Ausschusses und der Arbeitsgruppe Chemikalien, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

(auf Anfrage beim OECD-Sekretariat erhältlich).

▼B

*Tabelle I*

**BEWERTUNG VON HAUTREAKTIONEN**

**Bildung von Erythemen und Schorf**

| | |
|---|---|
| Kein Erythem | 0 |
| Sehr leichtes Erythem (kaum wahrnehmbar) | 1 |
| Klar abgegrenztes Erythem | 2 |
| Mäßiges bis ausgeprägtes Erythem | 3 |
| Ausgeprägtes Erythem (dunkelrot) bis hin zur Schorfbildung, so dass eine Bewertung nicht möglich ist | 4 |

Höchstmögliche Punktzahl: 4

**Bildung von Ödemen**

| | |
|---|---|
| Kein Ödem | 0 |
| Sehr leichtes Ödem (kaum wahrnehmbar) | 1 |
| Leichtes Ödem (Ränder des betroffenen Areals durch deutliche Schwellung klar abgegrenzt) | 2 |
| Mäßiges Ödem (Schwellung etwa 1 mm) | 3 |
| Ausgeprägtes Ödem (Schwellung mehr als 1 mm und über den Expositionsbereich hinaus) | 4 |

Höchstmögliche Punktzahl: 4

Zur Klärung unklarer Reaktionen kann eine histopathologische Untersuchung erfolgen.

▼B

*Anlage*

**Sequenzielle Prüfstrategie für Hautreizungen und -Verätzungen**

**ALLGEMEINE ÜBERLEGUNGEN**

Im Interesse wissenschaftlicher Verlässlichkeit und des Tierschutzes muss die unnötige Verwendung von Versuchstieren verhindert und die Durchführung von Versuchen, die bei den Tieren wahrscheinlich schwere Reaktionen hervorrufen, auf ein Mindestmaß beschränkt werden. Bevor ein In-vivo-Test ins Auge gefasst wird, sollen zunächst alle einschlägigen Informationen über die potenziell hautätzenden/-reizenden Wirkungen eines Stoffs bewertet werden. Möglicherweise liegen bereits genügend Kriterien für die Einstufung einer Prüfsubstanz anhand ihres Hautätzungs-/-reizungspotenzials vor, so dass sich Versuche an Labortieren erübrigen. Folglich schränkt die Durchführung einer kritischen Analyse bereits vorliegender Daten und die Anwendung einer sequenziellen Prüfstrategie die Notwendigkeit von In-vivo-Tests deutlich ein. Dies gilt umso mehr, wenn davon auszugehen ist, dass der Stoff schwere Reaktionen hervorruft.

Zur Beurteilung bereits vorhandener Informationen über die hautreizenden/-ätzenden Wirkungen von Substanzen soll das Instrument der Gewichtungsanalyse herangezogen werden. Ausgehend davon ist zu entscheiden, ob zusätzliche Studien, bei denen es sich nicht um In-vivo-Hautuntersuchungen handelt, als Beitrag zur Charakterisierung dieses Potenzials erfolgen sollen. Sofern weitere Studien durchgeführt werden müssen, empfiehlt es sich, zur Erzeugung der sachdienlichen Versuchsdaten die sequenzielle Prüfstrategie zu nutzen. Bei noch nicht geprüften Stoffen soll die sequenzielle Prüfstrategie herangezogen werden, um die Datensätze zu erzeugen, die für die Beurteilung des hautätzenden/-reizenden Potenzials benötigt werden. Die in dieser Anlage beschriebene Prüfstrategie wurde während eines OECD-Workshops (1) entwickelt. Sie wurde im Rahmen des „Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances“ bestätigt und weiter ausgebaut, das im November 1998 von den Teilnehmern der 28. Gemeinsamen Tagung des Chemikalien-Ausschusses und der Arbeitsgruppe Chemikalien gebilligt wurde (2).

Diese sequenzielle Prüfstrategie gehört zwar nicht zu den integralen Bestandteilen von Prüfmethode B.4, sie stellt aber den empfohlenen Ansatz zur Ermittlung von hautreizenden/-ätzenden Merkmalen dar. In diesem Ansatz spiegelt sich zum einen die beste Praxis wider. Zum anderen ist er ein ethischer Richtwert für In-vivo-Tests auf hautreizende/-ätzende Wirkungen. Die Prüfmethode bietet nicht nur eine Anleitung zur Durchführung des In-vivo-Tests, sondern auch eine Übersicht über die Faktoren, die vor der Durchführung eines solchen Versuchs überprüft werden sollen. Die Strategie liefert einen Ansatz für die Bewertung bereits vorhandener Daten über die hautreizenden/-ätzenden Eigenschaften von Prüfsubstanzen und einen stufenweisen Ansatz für die Erzeugung sachdienlicher Daten über Stoffe, die im Rahmen zusätzlicher Studien untersucht werden müssen bzw. noch gar nicht untersucht wurden. Zudem wird empfohlen, in bestimmten Fällen validierte und anerkannte In-vitro- und Ex-vivo-Tests auf hautreizende/-ätzende Wirkungen durchzuführen.

**BESCHREIBUNG DER BEWERTUNGS- UND PRÜFSTRATEGIE**

Vor der Durchführung von Versuchen im Rahmen der sequenziellen Prüfstrategie (Fließbild) sollen sämtliche vorhandenen Informationen ausgewertet werden, um die Notwendigkeit von In-vivo-Hauttests zu klären. Auch wenn wichtige Informationen aus der Beurteilung einzelner Parameter (z. B. extreme pH-Werte) gewonnen werden können, sollten die bereits vorliegenden Angaben in ihrer Gesamtheit betrachtet werden. Alle relevanten Daten über die Wirkungen des betreffenden Stoffs oder seiner Analoge sollen mit Hilfe einer Gewichtungsanalyse bewertet werden, und diese Entscheidung soll begründet werden. Dabei sollten bereits vorliegende Angaben zur Wirkung der Substanz auf Mensch und Tier im Vordergrund stehen, gefolgt von den Ergebnissen von In-vitro- und Ex-vivo-Tests. In-vivo-Studien mit hautätzenden Substanzen sollten nach Möglichkeit immer vermieden werden. Folgende Faktoren werden in der Prüfstrategie erörtert:

▼B

*Beurteilung bereits vorliegender Angaben zur Wirkung der Substanz auf Mensch und Tier (Stufe 1).* Zunächst sollen bereits vorhandene Informationen über die Wirkung auf den Menschen, z. B. klinische Studien oder Studien zur Exposition am Arbeitsplatz, sowie Fallberichte und/oder Ergebnisse von Tierversuchen, beispielsweise von Untersuchungen zur Toxizität nach einmaliger oder mehrmaliger Hautexposition, bewertet werden, denn sie liefern Hinweise, die unmittelbar die Hautwirkungen betreffen. Bei Stoffen mit bekannter hautätzender/reizender Wirkung und Substanzen, die nachweislich weder Hautreizungen noch -Verätzungen hervorrufen, brauchen keine In-vivo-Studien durchgeführt zu werden.

*Analyse der Zusammenhänge zwischen Struktur und Aktivität (SAR) (Stufe 2*). Die gegebenenfalls vorhandenen Ergebnisse von Untersuchungen an strukturell verwandten Substanzen sollen berücksichtigt werden. Liegen genügend Daten über das hautätzende/-reizende Potenzial von strukturell verwandten Substanzen oder Gemischen aus diesen Substanzen bei Mensch und/oder Tier vor, kann davon ausgegangen werden, dass die zu beurteilende Prüfsubstanz die gleichen Reaktionen hervorrufen wird. In diesen Fällen braucht die Prüfsubstanz möglicherweise nicht getestet zu werden. Für die Zwecke der sequenziellen Prüfstrategie reichen negative Daten aus Untersuchungen an strukturell verwandten Substanzen oder Gemischen als Nachweis für ein Nichtvorhandensein hautätzender/-reizender Wirkungen nicht aus. Zur Ermittlung des hautätzenden und -reizenden Potenzials sollen validierte und anerkannte SAR-Verfahren herangezogen werden

*Physikalisch-chemische Eigenschaften und chemische Reaktivität (Stufe 3).* Stoffe mit extremen pH-Werten ($\leq$ 2,0 bzw. $\geq$ 11,5) können starke lokale Reaktionen induzieren. Gilt ein extremer pH-Wert als Anhaltspunkt für die ätzende Wirkung eines Stoffs, so kann dessen Potenzial zur Veränderung der Azidität/Alkalinität (bzw. das Pufferungsvermögen) ebenfalls berücksichtigt werden (3) (4), Lässt das Pufferungsvermögen darauf schließen, dass eine Substanz möglicherweise keine hautätzende Wirkung hat, sollen weitere Prüfungen zur Bestätigung dieser Vermutung durchgeführt worden. Dafür sollten wenn möglich validierte und anerkannte In-vitro- oder Ex-vivo-Tests genutzt werden (siehe Stufen 5 und 6).

*Dermale Toxizität (Stufe 4).* Hat sich ein chemischer Stoff als sehr giftig bei Hautkontakt erwiesen, ist eine In-vivo-Studie zur Hautreizung/-Verätzung unter Umständen nicht angezeigt, weil bei Applikation der Prüfsubstanz in der üblichen Menge die sehr toxische Dosis überschritten wird, was letztlich dazu führt, dass die Tiere sterben oder ihnen schwere Leiden zugefügt werden. Wenn darüber hinaus bereits Studien zur dermalen Toxizität mit Dosierungen von bis zu 2 000 mg/kg Körpergewicht oder darüber an Albino-Kaninchen durchgeführt wurden, ohne dass Hautreizungen oder -Verätzungen feststellbar waren, sind zusätzliche Prüfungen auf hautreizende/-ätzende Wirkungen möglicherweise nicht vonnöten. In die Bewertung der akuten dermalen Toxizität anhand der Ergebnisse früherer Studien sollen mehrere Überlegungen einbezogen werden, So können die Angaben über Hautschädigungen unvollständig sein. Die Prüfungen und Beobachtungen können an anderen Tierarten erfolgt sein, und die Reaktionen der verschiedenen Arten weisen eventuell große Unterschiede auf. Überdies war die applizierte Prüfsubstanz für eine Bewertung der Hautreizung/-verätzung unter Umständen nicht geeignet (z. B. Verdünnung der Substanzen zur Untersuchung der dermalen Toxizität) (5). Wurden jedoch sorgfältig geplante Studien zur dermalen Toxizität an Kaninchen durchgeführt, die negative Ergebnisse erbrachten, reicht dies gegebenenfalls als Nachweis für das Nichtvorhandensein eines hautreizenden/-ätzenden Potenzials aus.

*Ergebnisse von In-vitro- und Ex-vivo-Tests (Stufen 5 und 6).* Substanzen, deren ätzende oder schwer hautreizende Eigenschaften in validierten und anerkannten, auf die Ermittlung dieser bestimmten Wirkungen ausgerichteten In-vitro- oder Ex-vivo-Tests (6) (7) nachgewiesen wurden, brauchen nicht an Tieren geprüft zu werden. Man kann davon ausgehen, dass diese Substanzen *in vivo* vergleichbare schwere Wirkungen hervorrufen.

▼B

*In-vivo-Tests an Kaninchen (Stufen 7 und 8).* Beruht die Entscheidung, einen In-vivo-Test durchzuführen, auf einer Gewichtungsanalyse, sollte zunächst ein Vorversuch an nur einem Tier stattfinden. Es sollen keine weiteren Tests erfolgen, wenn der Vorversuch ergibt, dass die Substanz ätzend auf die Haut wirkt. Liefen der Vorversuch keine Anhaltspunkte für eine ätzende Wirkung, soll die reizende oder negative Reaktion durch Tests an bis zu zwei weiteren Tieren bei einer Expositionsdauer von vier Stunden bestätigt werden. Wenn im Vorversuch eine hautreizende Wirkung beobachtet wird, kann der Bestätigungstest entweder sequenziell oder durch gleichzeitige Exposition von zwei weiteren Tieren erfolgen.

**LITERATURHINWEISE**

(1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Solna, Schweden, 22.-24. Januar 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/tests/background.htm).

(2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, bestätigt auf der 28. Gemeinsamen Tagung des Chemikalien-Ausschusses und der Arbeitsgruppe Chemikalien, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCLfi.htm).

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) Young, J.R., How, M.I., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic *In Vitro*, 2 (1) 19-26.

(5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and *In Vitro* Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli und Howard I. Maibach (Herausgeber): Dermatotoxicology. 5. Auflage, ISBN 1-56032-356-6, Kapitel 31, 411-436.

(6) Prüfmethode B.40.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G., und Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in Vitro* 12, 483-524.

▼B

*Fliessbild*

**PRÜF- UND BEWERTUNGSSTRATEGIE: HAUTREIZUNG/-VERÄTZUNG**

| | Activity | Finding | Conclusion |
|---|---|---|---|
| 1 | Existing human and/or animal data showing effects on skin or mucous membranes | Corrosive | Apical endpoint; considered corrosive. No testing is needed. |
| | | Irritating | Apical endpoint; considered to be an irritant. No testing is needed. |
| | | Not corrosive/not irritating | Apical endpoint; considered not corrosive or irritating. No testing required. |
| | ↓ *No information available, or available information is not conclusive* ↓ | | |
| 2 | Perform SAR evaluation for skin corrosion/irritation | Predict severe damage to skin | Considered corrosive. No testing is needed. |
| | | Predict irritation to skin | Considered an irritant. No testing is needed. |
| | ↓ *No predictions can be made, or predictions are not conclusive or negative* ↓ | | |
| 3 | Measure pH (consider buffering capacity, if relevant) | pH ≤ 2 or ≥ 11.5 (with high buffering capacity, if relevant) | Assume corrosivity. No testing is needed. |
| | ↓ *2 < pH < 11.5, or pH ≤ 2.0 or ≥ 11.5 with low/no buffering capacity, if relevant* ↓ | | |
| 4 | Evaluate systemic toxicity data via dermal route (1) | Very toxic | No further testing is needed. |
| | | Not corrosive or irritating when tested to limit dose of 2000 mg/kg body weight or higher, using rabbits | Assume not corrosive or irritating. No further testing is needed. |
| | ↓ *Such information is not available or is non-conclusive* ↓ | | |
| 5 | Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin corrosion | Corrosive response | Assume corrosivity *in vivo*. No further testing is needed. |
| | ↓ *Substance is not corrosive* ↓ | | |
| 6 | Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin irritation | Irritant response | Assume irritancy *in vivo*. No further testing is needed. |
| | ↓ *Validated in vitro or ex vivo testing methods for skin irritation are not yet available or substance is not an irritant* ↓ | | |
| 7 | Perform initial *in vivo* rabbit test using one animal | Severe damage to skin | Considered corrosive. No further testing is needed. |
| | ↓ *No severe damage* ↓ | | |
| 8 | Perform confirmatory test using one or two additional animals | Corrosive or irritating | Considered corrosive or irritating. No further testing is needed |
| | | Not corrosive or irritating | Considered not corrosive or irritating. No further testing needed |

(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼B

B.5. **AKUTE TOXIZITÄT: AUGENREIZUNG/-VERÄTZUNG**

1. **METHODE**

Diese Prüfmethode entspricht der OECD TG 405 (2002).

1.1. EINLEITUNG

Bei der Erarbeitung dieser aktualisierten Methode wurde besonderes Augenmerk auf mögliche Verbesserungen durch die Auswertung aller bereits vorhandenen Angaben über den Stoff gelegt, um unnötige Prüfungen an Labortieren zu vermeiden und somit auch Belange des Tierschutzes zu berücksichtigen. Die vorliegende Methode beinhaltet die Empfehlung, vor der Durchführung des beschriebenen In-vivo-Tests zur Ermittlung der akuten Reiz-/Ätzwirkung des Stoffs für die Augen eine kritische Analyse (1) der bereits vorhandenen einschlägigen Daten vorzunehmen. Sofern nicht genügend Daten zur Verfügung stehen, können diese mit Hilfe sequentieller Tests erzielt werden (2) (3). Die empfohlene Prüfstrategie, die in der Anlage zur Prüfmethode dargelegt wird, enthalt die Durchführung validierter und anerkannter In-vitro-Tests. Zudem wird empfohlen, einen In-vivo-Test auf Hautreizung/-verätzung durchzuführen, ehe die Möglichkeit eines In-vivo-Augentests in Betracht gezogen wird.

Im Interesse wissenschaftlicher Verlässlichkeit und des Tierschutzes sollen In-vivo-Tests erst dann in Erwägung gezogen werden, wenn alle für das Augenverätzungs-/-reizungspotenzial des Stoffs zur Verfügung stehenden einschlägigen Daten im Rahmen einer kritischen Analyse ausgewertet worden sind Zu diesen Daten gehören unter anderem Erkenntnisse aus bereits durchgeführten Untersuchungen am Menschen und/oder an Labortieren; Hinweise auf Verätzungen/Reizungen durch eine oder mehrere strukturell verwandte Substanzen bzw. Gemische aus diesen Substanzen; Daten, die eine starke Azidität oder Alkalinität der Substanz belegen (4) (5), und Ergebnisse validierter und anerkannter In-vitro- und Ex-vivo-Tests auf Hautverätzungen und -reizungen (6) (6a). Diese Studien können sowohl bereits vorgelegen haben als auch auf Grand einer kritischen Analyse der vorhandenen Daten erstellt worden sein.

Im Hinblick auf bestimmte Substanzen ergibt eine solche Analyse möglicherweise, dass deren Augenverätzungs-/-reizungspotenzial im Rahmen von In-vivo-Studien untersucht werden muss. In all diesen Fällen sollen vorzugsweise zunächst die dermalen Wirkungen der Substanz in einem In-vivo-Test untersucht und in Übereinstimmung mit der Prüfmethode B.4 (7) bewertet werden, bevor ein In-vivo-Augentest in Erwägung gezogen wird. Die kritische Analyse und die sequenzielle Prüfstrategie sollen dazu führen, dass weniger In-vivo-Untersuchungen zum Augenverätzungs-/-reizungspotenzial von Stoffen durchgeführt werden, wenn bereits andere Studien ausreichende Belege geliefert haben. Kann die augenätzende oder -reizende Wirkung auch nach einer In-vivo-Studie der Hautverätzung und -reizung nicht mit Hilfe der sequenziellen Prüfstrategie ermittelt werden, besteht die Möglichkeit, einen In-vivo-Test auf Augenverätzung/-reizung durchzuführen.

▼B

In der Anlage zu dieser Methode wird eine bevorzugte sequenzielle Prüfstrategie vorgestellt, welche die Durchführung validierter und anerkannter In-vitro- und Ex-vivo-Tests auf Verätzungs-/Reizungswirkungen einbezieht. Diese Strategie wurde während eines OECD-Workshops (8) entwickelt und von den Teilnehmern einmütig empfohlen. Sie wurde als empfohlene Prüfstrategie für das Globale Harmonisierte System der Einstufung und Kennzeichnung Chemischer Stoffe (Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances = GHS) (9) angenommen. Es wird empfohlen, dass diese sequenzielle Prüfstrategie vor einem In-vivo-Test durchgeführt wird. Bei neuen Substanzen wird sie als stufenweiser Prüfansatz empfohlen, mit dessen Hilfe verlässliche wissenschaftliche Daten über die durch die Prüfsubstanz hervorgerufene Verätzung/Reizung erzielt werden können. Bei bereits bekannten Stoffen, für die nicht genügend Daten zum Hautverätzungs-/-reizungspotenzial bzw. Augenverätzungs-/-reizungspotenzial vorliegen, soll die Strategie genutzt werden, um Datenlücken zu schließen. Der Einsatz einer anderen Prüfstrategie bzw. eines anderen Prüfverfahrens oder die Entscheidung gegen einen stufenweisen Prüfansatz soll gerechtfertigt werden.

1.2. DEFINITIONEN

**Augenreizung:** ist das Auslösen von Veränderungen am Auge nach Applikation einer Prüfsubstanz auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation vollständig reversibel sind.

**Augenverätzung:** ist das Auslösen einer irreversiblen Gewebeschädigung im Auge oder einer massiven Verschlechterung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfsubstanz auf die Oberfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach Applikation nicht vollständig reversibel sind.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Prüfsubstanz wird in einer einmaligen Dosierung in ein Auge jedes Versuchstiers eingebracht; das unbehandelte Auge dient als Kontrolle. Der Grad der Reizung/Verätzung wird bestimmt, indem in zuvor festgelegten Zeitabständen Schädigungen der Bindehaut, der Hornhaut und der Iris anhand einer Punkteskala bewertet werden. Darüber hinaus werden auch andere Reaktionen des Auges und systemische Schäden beschrieben, um die Wirkungen vollständig beurteilen zu können. Die Beobachtungsdauer soll ausreichend sein, um die Reversibilität bzw. Irreversibilität der Wirkungen vollständig zu erfassen.

Tiere mit starken und anhaltenden Anzeichen von Leiden und/oder Schmerzen können jederzeit während des Versuchs human getötet werden, wobei die Substanz entsprechend einzustufen ist. Kriterien für die humane Tötung moribunder Tiere mit starken Anzeichen von Leiden sind dem Literaturhinweis (10) zu entnehmen.

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Vorbereitung des In-vivo-Tests**

1.4.1.1. *Auswahl der Tierspezies*

Das bevorzugte Labortier ist das Albino-Kaninchen, wobei für den Test gesunde junge erwachsene Kaninchen verwendet werden. Die Verwendung anderer Rassen oder Spezies soll begründet werden.

1.4.1.2. *Vorbereitung der Versuchstiere*

24 Stunden vor dem Versuch werden bei jedem der ausgewählten Versuchstiere beide Augen untersucht. Tiere, bei denen bereits eine Augenreizung, okulare Defekte oder eine Schädigung der Cornea vorliegen, sollen nicht verwendet werden.

▼B

1.4.1.3. *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Die Tiere sollen einzeln gehalten werden. Die Temperatur im Versuchstierraum soll 20 °C (±3 °C) betragen. Obwohl die relative Luftfeuchtigkeit mindestens 30 % betragen und zu anderen Zeiten als während der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen sollte, ist ein Wert von 50-60 % anzustreben. Der Raum soll künstlich beleuchtet sein, wobei die Beleuchtung im 12-Stunden-Rhythmus ein- und ausgeschaltet werden soll. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist.

1.4.2. **Prüfverfahren**

1.4.2.1. *Applikation der Prüfsubstanz*

Die Prüfsubstanz wird bei jedem Tier in den Bindehautsack eines Auges appliziert, indem man das untere Lid leicht vom Augapfel wegzieht. Die Lider werden dann etwa eine Sekunde lang leicht zusammengedrückt, damit keine Substanz verloren geht. Das andere, unbehandelte Auge dient als Kontrolle.

1.4.2.2. *Ausspülen*

Die Augen der Versuchstiere sollen frühestens 24 Stunden nach Applikation der Prüfsubstanz ausgewaschen werden; Ausnahmen gelten für Feststoffe (siehe Abschnitt 1.4.2.3.2) und bei sofortigem Eintritt von ätzenden oder reizenden Wirkungen. Nach 24 Stunden kann gegebenenfalls eine Augenspülung erfolgen.

Der Einsatz einer zusätzlichen Versuchstiergruppe, an der der Einfluss des Ausspülens untersucht wird, wird nicht empfohlen außer in wissenschaftlich begründeten Fällen. Sollte eine zusätzliche Versuchstiergruppe tatsächlich benötigt werden, so sollen zwei Kaninchen verwendet werden. Die Bedingungen, unter denen die Augenspülung erfolgte, sollen sorgfältig dokumentiert werden, z. B. Zeitpunkt, Zusammensetzung und Temperatur der Spüllösung, Dauer, Volumen und Geschwindigkeit der Applikation.

1.4.2.3. *Dosierungen*

1.4.2.3.1. *Prüfung von Flüssigkeiten*

Bei der Prüfung von Flüssigkeiten wird eine Dosis von 0,1 ml verwendet. Liegt die Prüfsubstanz in Form eines Pumpsprays vor, soll sie nicht direkt ins Auge eingebracht werden, sondern mittels Sprühstoß entnommen und in einem Behälter aufgefangen werden. Anschließend werden 0,1 ml in das Auge eingebracht.

1.4.2.3.2. *Prüfung von Feststoffen*

Bei Feststoffen, Pasten und partikelförmigen Substanzen soll die Prüfmenge ein Volumen von 0,1 ml oder ein Gewicht von höchstens 100 mg haben. Das Prüfmaterial soll zu einem feinen Pulver zermahlen werden. Das Volumen von Feststoffen soll erst nach vorsichtigem Kompaktieren, z. B. durch Klopfen des Messbehälters, bestimmt werden, ist die in Form eines Feststoffs vorliegende Prüfsubstanz bis zum ersten Beobachtungszeitpunkt, d. h. 1 Stunde nach der Applikation, nicht aufgrund physiologischer Vorgänge aus dem Auge entfernt worden, kann das Auge mit Kochsalzlösung oder destilliertem Wasser ausgespült werden.

▼B

1.4.2.3.3. *Prüfung von Aerosolen*

Es wird empfohlen, alle als Pumpspray oder Aerosol vorliegenden Prüfsubstanzen mittels Sprühstoß zu entnehmen, in einem Behälter aufzufangen und anschließend zu applizieren. Die einzige Ausnahme sind Substanzen in Aerosol-Druckbehältern, die aufgrund der Vaporisierung nicht aufgefangen werden können. In diesen Fällen soll das Auge offen gehalten werden und die Prüfsubstanz mit einem einzigen Sprühstoß etwa eine Sekunde lang aus 10 cm Entfernung vom Auge verabreicht werden. In Abhängigkeit vom Druck und vom Behälterinhalt kann dieser Abstand variieren. Es ist darauf zu achten, dass das Auge durch den Sprühdruck nicht verletzt wird, unter Umständen muss das Risiko „mechanischer" Augenschäden, die auf den Sprühdruck zurückzuführen sind, beurteilt werden.

Bei Aerosolen kann die Dosis anhand einer Schätzung ermittelt werden, indem der Test folgendermaßen simuliert wird: Die Substanz wird durch eine Öffnung in der Größe eines Kaninchenauges auf Wägepapier gesprüht, wobei sich die Öffnung unmittelbar vor dem Papier befindet. Anhand des Gewichtsanstiegs des Papiers wird ein Näherungswert für die ins Auge gesprühte Menge ermittelt. Bei flüchtigen Stoffen kann ein Schätzwert für die Dosierung ermittelt werden, indem man einen Auffangbehälter vor und nach Entnahme des Prüfmaterials wiegt.

1.4.2.4. *Vorversuch (In-vivo-Test auf Augenreizung/-Verätzung an einem Tier)*

Es empfiehlt sich dringend, den In-vivo-Test zunächst nur an einem Tier durchzuführen. Dies entspricht den Anforderungen der sequenziellen Prüfstrategie (siehe Anlage 1).

Sofern das beschriebene Verfahren ergibt, dass der Stoff ätzend auf das Auge wirkt oder schwere Augenreizungen auslöst, sollen keine weiteren Prüfungen auf Augenreizung durchgeführt werden.

1.4.2.5. *Lokale Anästhetika*

Im Einzelfall können lokale Anästhetika eingesetzt werden. Ergibt die kritische Analyse aller bereits vorliegenden Daten, dass die Substanz Schmerzen auslösen kann, oder zeigt der Vorversuch, dass eine Schmerzreaktion auftreten wird, kann vor dem Einträufeln der Prüfsubstanz ein lokales Anästhetikum verabreicht werden. Die Entscheidung über Art, Konzentration und Dosis des lokalen Anästhetikums soll sorgfältig abgewogen werden, um zu gewährleisten, dass keine Abweichungen in der Reaktion auf die Prüfsubstanz auftreten. Das als Kontrolle dienende Auge soll ebenfalls mit dem Anästhetikum behandelt werden.

1.4.2.6. *Bestätigungstest (In-vivo-Test auf augenreizende Wirkungen an zusätzlichen Tieren)*

Wird im Vorversuch keine ätzende Wirkung beobachtet, soll die Reizungsreaktion bzw. die negative Reaktion an bis zu zwei weiteren Tieren bestätigt werden. Ergibt der Vorversuch eine schwere Reizungswirkung, was auf eine möglicherweise schwere (irreversible) Wirkung im Bestätigungstest schließen lässt, soll der Bestätigungstest nach Möglichkeit als sequenzieller Versuch an jeweils einem Tier zu einem bestimmten Zeitpunkt und nicht durch gleichzeitige Exposition der zwei weiteren Tiere erfolgen. Der Test ist abzubrechen, wenn beim zweiten Tier Anzeichen einer Verätzung oder einer schweren Reizung festgestellt werden. Zur Bestätigung schwacher oder mäßiger Reizungsreaktionen werden unter Umständen zusätzliche Tiere gebraucht.

▼B

1.4.2.7. *Beobachtungszeitraum*

Die Beobachtungszeit soll so bemessen sein, dass das Ausmaß und die Reversibilität der festgestellten Wirkungen vollständig bewertet werden kann. Allerdings soll der Versuch abgebrochen werden, sobald das Tier starke und anhaltende Anzeichen von Leiden und Schmerzen zeigt (9). Um feststellen zu können, ob die Wirkungen reversibel sind, sollen die Tiere in der Regel für die Dauer von 21 Tagen nach Applikation der Prüfsubstanz beobachtet werden. Bilden sich die Schäden vor Ablauf dieser 21 Tage zurück, soll der Versuch zu dem betreffenden Zeitpunkt beendet werden.

1.4.2.7.1. *Klinische Beobachtungen und Bewertung von Augenreaktionen*

Die Augen sollen 1, 24, 48 und 72 Stunden nach Aufbringen der Prüfsubstanz untersucht werden. Sobald aussagekräftige Informationen gewonnen worden sind, soll der Versuch nicht länger als nötig fortgesetzt werden. Tiere mit starken und anhaltenden Anzeichen von Schmerzen oder Leiden sollen unverzüglich human getötet werden, wobei die Substanz entsprechend einzustufen ist. Bei Tieren mit folgenden Augenschädigungen nach Applikation der Prüfsubstanz ist eine humane Tötung angezeigt: Hornhautperforation oder signifikante Hornhautulzeration mit Staphylom; Blut in der vorderen Augenkammer; Hornhauttrübung Grad 4, die 48 Stunden bestehen bleibt; fehlender Pupillenreflex (Irisreaktion Grad 2) für die Dauer von 72 Stunden; Ulzeration der Bindehaut; Nekrose der Bindehaut oder der Nickhaut; oder Gewebsdemarkierung. Diese Schäden sind im Allgemeinen irreversibel.

Tiere, bei denen keine Augenschädigungen auftreten, dürfen frühestens 3 Tage nach der Behandlung getötet werden. Bei leichten bis mäßigen Schädigungen sollen die Tiere bis zum Abklingen bzw. für die Dauer von 21 Tagen beobachtet werden. Danach wird die Studie abgeschlossen. Untersuchungen sollen am 7., 14. und 21. Tag erfolgen, um den Status der Schädigungen zu ermitteln und um zu klären, ob sie reversibel oder irreversibel sind.

Der jeweilige Grad der Augenreaktion (Bindehaut, Hornhaut und Iris) soll bei jeder Untersuchung dokumentiert werden (Tabelle I). Auch alle anderen Augenschädigungen (z. B. Pannus, Verfärbungen) oder systemischen Folgen sollen protokolliert werden.

Als Hilfsmittel können bei den Untersuchungen Binokularlupen, Handspaltlampen, Biomikroskope und andere geeignete Geräte benutzt werden. Nach Aufzeichnung der Beobachtungen nach 24 Stunden können die Augen einiger bzw. aller Kaninchen außerdem mit Fluorescein untersucht werden.

Die Bewertung von Augenreaktionen ist zwangsläufig subjektiv. Um die Einstufung von Augenreaktionen stärker zu vereinheitlichen und den Prüflabors und allen an den Versuchen und an der Interpretation der Versuchsergebnisse Beteiligten die Arbeit zu erleichtern, müssen die Prüfer im Umgang mit der Bewertungsskala entsprechend geschult werden.

2. **DATEN**

2.2. ERGEBNISBEWERTUNG

Die Bewertung der Augenreizung sollte anhand der Art und des Schweregrads der Schädigung und deren Reversibilität bzw. Irreversibilität vorgenommen werden. Die einzelnen ermittelten Schweregrade stellen keinen allein gültigen Maßstab für die reizenden Eigenschaften eines Stoffs dar, denn es werden auch andere Effekte der Prüfsubstanz beurteilt. Vielmehr sollten die einzelnen Graduierungswerte als Referenzwerte betrachtet weiden, die nur dann sinnvoll sind, wenn sämtliche Beobachtungen vollständig beschrieben und beurteilt werden.

▼B

3. **BERICHTERSTATTUNG**

3.1. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten;

Begründung für den In-vivo-Test: Kritische Analyse von Daten aus früheren Versuchen unter Einbeziehung von Ergebnissen aus der sequenziellen Prüfstrategie:

— Beschreibung aller einschlägigen Daten aus früheren Versuchen;

— Daten, die in den einzelnen Stufen der Prüfstrategie erhoben wurden;

— Beschreibung der durchgeführten In-vitro-Tests mit Einzelheiten zu den angewendeten Verfahren sowie zu den Ergebnissen für Prüf-/Referenzsubstanzen;

— Beschreibung der durchgeführten In-vivo-Tests auf Hautreizung/-verätzung mit Einzelheiten zu den Ergebnissen;

— Gewichtungsanalyse als Grundlage für die Durchführung einer In-vivo-Studie.

Prüfsubstanz:

— Angaben zur Identität (z. B. CAS-Nummer, Bezugsquelle, Reinheit, bekannte Verunreinigungen; Chargennummer):

— physikalische Beschaffenheit und physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. pH-Wert, Flüchtigkeit, Löslichkeit, Stabilität, Reaktionsvermögen mit Wasser);

— bei Gemischen Zusammensetzung und relative Anteile der Bestandteile in Prozent;

— bei lokalen Anästhetika Identität, Reinheit, Art, Dosis und potenzielle Interaktion mit der Prüfsubstanz.

Vehikel:

— Angaben zur Identität, (gegebenenfalls) Konzentration; Einsatzvolumen;

— Begründung der Auswahl des Vehikels.

Versuchstiere:

— verwendete Spezies/Rasse, Begründung für den Verzicht auf die Verwendung von Albino- Kaninchen und die Nutzung anderer Tiere;

— Alter der Tiere bei Beginn der Studie;

— Anzahl der Versuchstiere pro Geschlecht in den Prüf- und Kontrollgruppen (falls erforderlich);

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn und -ende;

— Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.

Ergebnisse:

— Beschreibung der Methode zur Bewertung von Reizungen zu den jeweiligen Beobachtungszeiten (z. B. Handspaltlampe, Biomikroskop, Fluorescein);

▼B

— tabellarische Erfassung der Bewertung von Reizungs-/Verätzungsreaktionen zu allen Messzeitpunkten für jedes einzelne Versuchstier bis hin zum Ausscheiden des Tiers aus dem Versuch;

— ausführliche Beschreibung von Art und Schweregrad der festgestellten Reizung bzw. Verätzung;

— Beschreibung aller anderen im Auge festgestellten Schädigungen (z. B. Vaskularisierung, Pannus, Verklebungen, Verfärbungen);

— Beschreibung sonstiger lokaler und systemischer Folgen außerhalb des Auges und ggf. vorliegender histopathologischer Befunde.

Diskussion der Ergebnisse

3.2. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Eine Extrapolation der Ergebnisse von Untersuchungen zur Augenreizung an Labortieren auf den Menschen ist nur bedingt möglich. Oftmals reagiert das Albino-Kaninchen empfindlicher als der Mensch auf Stoffe mit augenreizenden oder -verätzenden Eigenschaften.

Bei der Interpretation von Daten ist darauf zu achten, dass Reizungen aufgrund einer sekundären Infektion nicht berücksichtigt werden.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, L., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.

(2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C, Dossou, K.G., Gerner, I., Schiede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159-164.

(3) Worth, A.P., und Fentem, J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro, 2,* 19-26.

(5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G., und Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, 483-524.

(6a) Prüfmethode B.40 Hautverätzung.

(7) Prüfmethode B.4. Akute Toxizität: Hautreizung/-verätzung.

(8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Solna, Schweden, 22.-24. Januar 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼B

(9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, bestätigt auf der 28. Gemeinsamen Tagung des Chemikalien-Ausschusses und der Arbeitsgruppe Chemikalien, November 1998 (http:/www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

*Tabelle I*

**BEWERTUNG VON AUGENSCHÄDIGUNGEN**

**Cornea**

Trübung: Trübungsgrad (für die Auswertung wird der am stärksten betroffene Bereich genommen) (*)

| | |
|---|---|
| Keine Ulzeration oder Trübung | 0 |
| Punktförmige oder diffuse Trübungsbereiche (ohne leichte Trübung des normalen Glanzes); Einzelheiten der Iris deutlich erkennbar ..... | 1 |
| Leicht erkennbarer durchlässiger Bereich, Einzelheiten der Iris etwas verschattet ..... | 2 |
| Perlmuttartige Bereiche, keine Einzelheiten der Iris sichtbar, Größe der Pupille kaum erkennbar ..... | 3 |
| Trübe Hornhaut; Iris aufgrund der Trübung nicht erkennbar ..... | 4 |

Höchstmögliche Punktzahl: 4

ANMERKUNGEN

(*) Die Größe des von der Hornhauttrübung betroffenen Areals soll dokumentiert werden.

**Iris**

| | |
|---|---|
| Normal ..... | 0 |
| Deutlich vertiefte Rugae, Kongestion, Schwellung, mäßige circumcorneale Hyperämie oder Injektion; Iris reagiert auf Licht (träge Reaktion ist positiv) ..... | 1 |
| Blutungen, großflächige Zerstörung, keine Reaktion auf Licht ..... | 2 |

Höchstmögliche Punktzahl: 2

**Conjunctivae**

Rötung (der Augenlidbindehaut und der Augapfelbindehaut; ohne Hornhaut und Iris)

| | |
|---|---|
| normal ..... | 0 |
| Einige Blutgefäße zeigen Hyperämie (Injektion) ..... | 1 |
| Diffuse karmesinrote Farbe; einzelne Gefäße nur schwer erkennbar .. | 2 |
| Diffuse dunkelrote Verfärbung ..... | 3 |

Höchstmögliche Punktzahl: 3

**Chemosis**

Schwellung (der Augenlider und/oder Nickhäute)

| | |
|---|---|
| Normal ..... | 0 |
| Über dem Normalen liegende Schwellung ..... | 1 |
| Deutliche Schwellung mit partieller Auswärtskehrung der Lider ..... | 2 |
| Schwellung mit etwa halbgeschlossenen Lidern ..... | 3 |
| Schwellung mit mehr als halbgeschlossenen Lidern ..... | 4 |

Höchstmögliche Punktzahl: 4

▼B

*Anlage*

**Sequenzielle Prüfstrategie für Augenreizungen und -Verätzungen**

**ALLGEMEINE ÜBERLEGUNGEN**

Im Interesse wissenschaftlicher Verlässlichkeit und des Tierschutzes muss die unnötige Verwendung von Versuchstieren verhindert und die Durchführung von Versuchen, die bei den Tieren wahrscheinlich schwere Reaktionen hervorrufen, auf ein Mindestmaß beschränkt werden. Bevor ein *In-vivo*-Test ins Auge gefasst wird, sollen zunächst alle einschlägigen Informationen über die potenziell augenreizenden/-verätzenden Wirkungen eines Stoffs ausgewertet werden, Möglicherweise liegen bereits genügend Kriterien für die Einstufung einer Prüfsubstanz anhand ihres Augenreizungs-/-verätzungspotenzials vor, so dass sich Versuche an Labortieren erübrigen. Folglich schränkt die Durchführung einer kritischen Analyse bereits vorliegender Daten und die Anwendung einer sequenziellen Prüfstrategie die Notwendigkeit von *In-vivo*-Tests deutlich ein. Dies gilt umso mehr, wenn davon auszugehen ist, dass der Stoff schwere Reaktionen hervorruft.

Zur Beurteilung bereits vorhandener Informationen über die augenreizenden/-verätzenden Wirkungen von Substanzen soll das Instrument der Gewichtungsanalyse herangezogen werden. Ausgehend davon ist zu entscheiden, ob zusätzliche Studien, bei denen es sich nicht um *In-vivo*-Augenuntersuchungen handelt, als Beitrag zur Beurteilung dieses Potenzials erfolgen sollen. Sofern weitere Studien durchgeführt werden müssen, empfiehlt es sich, zur Erzeugung der sachdienlichen Versuchsdaten die sequenzielle Prüfstrategie zu nutzen. Bei noch nicht geprüften Stoffen soll die sequenzielle Prüfstrategie herangezogen weiden, um die Daten zu erzeugen, die für die Beurteilung des augenverätzenden/-reizenden Potenzials benötigt werden. Die in dieser Anlage beschriebene Prüfstrategie wurde während eines OECD-Workshops (1) entwickelt Sie wurde im Rahmen des „Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances“ bestätigt und weiter ausgebaut, das im November 1998 von den Teilnehmern der 28. Gemeinsamen Tagung des Chemikalien-Ausschusses und der Arbeitsgruppe Chemikalien gebilligt wurde (2).

Diese sequenzielle Prüfstrategie gehört zwar nicht zu den integralen Bestandteilen von Prüfmethode B.5, stellt aber gleichwohl den empfohlenen Ansatz zur Ermittlung von augenreizenden/-verätzenden Merkmalen dar. In diesem Ansatz spiegelt sich zum einen die beste Praxis wider. Zum anderen ist er ein ethischer Richtwert für *In-vivo*-Tests auf augenreizende/-verätzende Wirkungen. Die Prüfmethode bietet nicht nur eine Anleitung zur Durchführung des *In-vivo*-Tests, sondern auch eine Übersicht über die Faktoren, die vor der Durchführung eines solchen Versuchs überprüft werden sollen. Die sequenzielle Prüfstrategie liefert einen auf einer Gewichtungsanalyse basierenden Ansatz für die Bewertung bereits vorhandener Daten über die augenreizenden/-verätzenden Eigenschaften von Prüfsubstanzen und einen stufenweisen Ansatz für die Erzeugung sachdienlicher Daten über Stoffe, die im Rahmen zusätzlicher Studien untersucht werden müssen bzw. noch gar nicht untersucht wurden. Die Strategie umfasst die Durchführung validierter und anerkannter *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Tests, in bestimmten Fällen gefolgt von Untersuchungen zur hautreizenden/-verätzenden Wirkung von Stoffen nach Prüfmethode B.4 (Hautreizung/-verätzung) (3) (4).

**BESCHREIBUNG DER STUFENWEISEN PRÜFSTRATEGIE**

Sämtliche vorhandenen Informationen sollen vor der Durchführung von Versuchen im Rahmen der sequenziellen Prüfstrategie (Fließbild) bewertet werden, um die Notwendigkeit von *In-vivo*-Augentests zu klären. Auch wenn wichtige Informationen aus der Beurteilung einzelner Parameter (z. B. extreme pH-Werte) gewonnen werden können, sollen die bereits vorliegenden Angaben in ihrer Gesamtheit betrachtet werden. Alle relevanten Daten über die Wirkungen des betreffenden Stoffs und Struktur verwandter Verbindungen sollen mit Hilfe einer Gewichtungsanalyse bewertet werden, und die Entscheidung soll begründet werden. Dabei sollen bereits vorliegende Angaben zur Wirkung der Substanz auf Mensch und Tier im Vordergrund stehen, gefolgt von den Ergebnissen von *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Tests. *In-vivo*-Untersuchungen mit Stoffen mit ätzenden Eigenschaften sollten nach Möglichkeit immer vermieden werden. Folgende Faktoren werden in der Prüfstrategie erörtert:

▼B

*Beurteilung bereite vorliegender Angaben zur Wirkung der Substanz auf Mensch und Tier (Stufe 1).* Zunächst sollen vorhandene Informationen über die Wirkung auf den Menschen, z. B. klinische Studien oder Studien zur Exposition am Arbeitsplatz sowie Fallberichte und/oder Ergebnisse von Tierversuchen (Untersuchungen am Auge) bewertet werden, denn sie liefern Hinweise, die unmittelbar die Wirkungen auf das Auge betreffen. Danach sollen vorhandene Daten aus Untersuchungen an Menschen und/oder Tieren zu Hautverätzungen/-reizungen bewertet werden. Stoffe mit bekannter augenätzender oder schwer augenreizender Wirkung sollen nicht in die Augen von Tieren geträufelt werden. Dies gilt ebenso für Substanzen, die Hautreizungen oder -Verätzungen hervorrufen. Alle diese Substanzen sollen auch als augenverätzende und/oder -reizende Stoffe betrachtet werden. Auch mit Substanzen, von denen in früheren Augenuntersuchungen hinreichend nachgewiesen wurde, dass sie weder Verätzungen noch Reizungen hervorrufen, sollen keine *In-vivo*-Studien durchgeführt werden.

*Analyse der Zusammenhänge zwischen Struktur und Aktivität (SAR) (Stufe 2).* Die gegebenenfalls vorhandenen Ergebnisse von Untersuchungen an strukturell verwandten Substanzen sollen berücksichtigt werden. Liegen genügend Daten über das augenverätzende/-reizende Potenzial von strukturell verwandten Substanzen oder Gemischen aus diesen Substanzen aus Untersuchungen an Menschen und/oder Tieren vor, kann davon ausgegangen werden, dass die zu beurteilende Prüfsubstanz die gleichen Reaktionen hervorrufen wird. In diesen Fällen braucht die Prüfsubstanz nicht getestet zu werden. Für die Zwecke der sequenziellen Prüfstrategie reichen negative Daten aus Untersuchungen an strukturell verwandten Substanzen oder Gemischen als Nachweis für ein Nichtvorhandensein augenverätzender/-reizender Wirkungen nicht aus. Zur Ermittlung des Verätzungs- und Reizungspotenzials in Bezug auf die Haut und die Augen sollten validierte und anerkannte SAR-Verfahren herangezogen werden.

*Physikalisch-Chemische Eigenschaften und chemische Reaktivität (Stufe 3).* Stoffe mit extremen pH-Werten ($\leq$ 2,0 bzw. $\geq$ 11,5) können starke lokale Reaktionen induzieren. Gilt ein extremer pH-Wert als Anhaltspunkt für die augenverätzende oder -reizende Wirkung eines Stoffs, so kann dessen Potenzial zur Veränderung der Azidität/Alkalinität (bzw. das Pufferungsvermögen) ebenfalls berücksichtigt werden (5) (6). Lässt das Pufferungsvermögen darauf schließen, dass eine Substanz möglicherweise keine augenverätzende Wirkung hat, sollen weitere Prüfungen zur Bestätigung dieser Vermutung durchgeführt werden. Dafür sollen validierte und anerkannte *In-vitro*- oder *Ex-vivo*-Tests genutzt werden (siehe Stufen 5 und 6).

*Einbeziehung weiterer wichtiger Informationen (Stufe 4).* In dieser Phase sollen alle verfügbaren Informationen über die systemische Toxizität bei Applikation auf die Haut bewertet werden. Die akute dermale Toxizität der Prüfsubstanz soll ebenfalls beurteilt werden. Hat sich die Prüfsubstanz als sehr giftig bei Hautkontakt erwiesen, braucht sie nicht am Auge getestet zu werden. Auch wenn nicht unbedingt ein Zusammenhang zwischen akuter dermaler Toxizität und Augenreizung/-verätzung besteht, kann man davon ausgehen, dass ein Stoff, der bei Hautapplikation sehr giftig ist, auch beim Einträufeln in das Auge eine starke Toxizität aufweist. Diese Daten können auch zwischen den Stufen 2 und 3 bewertet werden.

*Ergebnisse von In-vitro- und Ex-vivo-Tests (Stufen 5 und 6).* Substanzen, deren ätzende oder stark reizende Eigenschaften in validierten und anerkannten, auf die Ermittlung der Augen- oder Hautverätzung/-reizung ausgerichteten *In-vitro*- oder *Ex-vivo*-Tests (7) (8) nachgewiesen wurden, brauchen nicht an Tieren geprüft zu werden. Man kann davon ausgehen, dass diese Substanzen in vivo vergleichbare schwere Wirkungen hervorrufen. Stehen validierte und anerkannte *In-vitro*-/*Ex-vivo*-Tests nicht zur Verfügung, können die Stufen 5 und 6 übersprungen und die Auswertungen direkt auf Stufe 7 fortgesetzt werden.

*Bewertung der hautreizenden oder -verätzenden Wirkung der Substanz in vivo (Stufe 7).* Reichen die aus den vorstehend genannten Studien gewonnenen Erkenntnisse nicht aus, um eine schlüssige Gewichtungsanalyse des Augenreizungs-/-verätzungspotenzials eines Stoffs vornehmen zu können, soll zunächst das *In-vivo*-Hautreizungs-/-verätzungspotenzial anhand von Prüfmethode B.4 (4) und der dazugehörigen Anlage (9) bewertet werden. Wird der Nachweis erbracht, dass die Substanz Verätzungen oder schwere Hautreizungen verursacht, soll sie so lange als Stoff mit augenverätzenden/-reizenden Eigenschaften betrachtet werden, bis weitere Erkenntnisse einen anderen Schluss zulassen. Folglich braucht ein *In-vivo*-Augentest nicht durchgeführt zu werden. Verursacht die Substanz keine Verätzung oder starke Reizung der Haut, soll ein *In-vivo*-Augentest erfolgen.

▼B

*In-vivo-Test an Kaninchen (Stufen 8 und 9)*. Vor dem eigentlichen In-vivo-Augentest soll zunächst ein Vorversuch an nur einem Tier stattfinden. Es sollen keine weiteren Tests erfolgen, wenn der Vorversuch ergibt, dass die Substanz schwere Augenreizungen oder -Verätzungen hervorruft. Liefert der Vorversuch keine Anhaltspunkte für eine ätzende Wirkung oder schwere Reizungen, wird ein Bestätigungstest an zwei weiteren Tieren durchgeführt.

**LITERATURHINWEISE**

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Solna, Schweden, 22.-24. Januar 1996 (http://www.oecd.org/ehs/testAjackground.htin).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, bestätigt auf der 28. Gemeinsamen Tagung des Chemikalien-Ausschusses und der Arbeitsgruppe Chemikalien, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P., und Fentem, J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

(4) Prüfmethode B.4. Akute Toxizität: Hautreizung/-verätzung.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19-26.

(6) Neun, D.J. (t993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G., und Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, 483-524.

(8) Prüfmethode B.40 Hautverätzung.

(9) Anlage zur Prüfmethode B.4: Sequenzielle Prüfstrategie für Hautreizungen und -Verätzungen.

▼B

*Fliessbild*

**Prüf- und bewertungsstrategie: augenreizung/-verätzung**

| | Stufe | Ergebnis | Schlussfolgerung |
|---|---|---|---|
| 1 | Bereits vorliegende Daten aus Untersuchungen am Menschen und/oder an Tieren belegen Wirkungen auf das Auge | Schwere Augenschäden | Apikaler Endpunkt; gilt als ätzend. Keine Prüfung erforderlich. |
| | | Augenreizend | Apikaler Endpunkt; gilt als reizend. Keine Prüfung erforderlich. |
| | | Nicht augenverätzend/nicht augenreizend | Apikaler Endpunkt; gilt als nicht ätzend oder reizend. Keine Prüfung erforderlich. |
| | Bereits vorliegende Daten aus Untersuchungen am Menschen und/oder an Tieren belegen ätzende Wirkungen auf die Haut | Hautverätzend | Vermutlich augenverätzend. Keine Prüfung erforderlich. |
| | Bereits vorliegende Daten aus Untersuchungen am Menschen und/oder an Tieren belegen schwere hautreizende Wirkungen | Stark hautreizend | Vermutlich augenreizend. Keine Prüfung erforderlich. |
| | *Keine Informationen vorhanden bzw. vorhandene Informationen sind nicht schlüssig* | | |
| 2 | Durchführung einer SAR-Analyse auf augenverätzende/-reizende Wirkung | Vorhersage schwere Augenschädigung | Vermutlich augenverätzend. Keine Prüfung erforderlich. |
| | | Vorhersage Augenreizung | Vermutlich augenreizend. Keine Prüfung erforderlich. |
| | Durchführung einer SAR-Analyse auf haulätzende Wirkung | Vorhersage Hautverätzung | Vermutlich augenverätzend. Keine Prüfung erforderlich. |
| | *Vorhersagen nicht möglich bzw. Vorhersagen nicht schlüssig oder negativ* | | |
| 3 | Messung pH-Wert (ggfs. unter Berücksichtigung des Pufferungsvermögens) | pH ≤ 2 bzw. ≥ 11,5 (ggfs. mit hohem Pufferungsvermögen) | Vermutlich augenverätzend. Keine Prüfung erforderlich. |
| | *2< pH < 11,5 oder ggfs pH ≤2,0 oder ≥ 11,5 mit geringem/ohne Pufferungsvermögen* | | |
| 4 | Bewertung der systemischen Toxizität nach Applikation auf die Haut | Sehr toxisch bei Konzentrationen, die für Augentests genutzt werden. | Kein Test, weil Substanz zu giftig. Keine Prüfung erforderlich. |
| | *Keine entsprechenden Angaben vorhanden bzw. Substanz ist nicht sehr giftig* | | |

▼B

| | | | |
|---|---|---|---|
| **5** | Durchführung validierter und anerkannter *In-vitro-* oder *Ex-vivo*-Tests auf augenverätzende Wirkungen | Verätzung | Vermutlich augenverätzend. Keine weitere Prüfung erforderlich. |
| | ↓ | | |
| | *Substanz ist nicht ätzend oder validierter* In- vitro-/Ex-vivo-*Methoden für die Prüfung auf Augenverätzung liegen noch nicht vor* | | |
| | ↓ | | |
| **6** | Durchführung validierter und anerkannter *In-vitro-* oder *Ex-vivo*-Tests auf augenreizende Wirkungen | Reizung | Vermutlich augenreizend. Keine weitere Prüfung erforderlich. |
| | ↓ | | |
| | *Substanz ist nicht reizend oder validierter* In- vitro-/Ex-vivo-*Methoden für die Prüfung auf Augenreizung liegen noch nicht vor* | | |
| | ↓ | | |
| **7** | Versuch zur Bewertung des *In-vivo-* Hautreizungs-/verätzungspotenzials (siehe Prüfmethode B.4 mit Anhang) | Verätzung bzw. schwere Reizung | Vermutlich augenverätzend. Keine weitere Prüfung erforderlich. |
| | ↓ | | |
| | *Substanz ruft keine Hautverätzung oder schwere Hautreizung hervor* | | |
| | ↓ | | |
| **8** | Durchführung des *In-vivo-* Vorversuchs an einem Kaninchen | Schwere Augenschäden | Vermutlich augenverätzend. Keine weitere Prüfung erforderlich. |
| | ↓ | | |
| | *Keine schwere Schädigung bzw. keine Reaktion* | | |
| | ↓ | | |
| **9** | Durchführung des Bestätigungstests an ein oder zwei weiteren Tieren | Ätzend oder reizend | Vermutlich augenverätzend oder -reizend. Keine weitere Prüfung erforderlich. |
| | | Nicht ätzend oder reizend | Vermutlich nicht augenreizend oder -verätzend Keine weitere Prüfung erforderlich. |

▼B

B.6. **SENSIBILISIERUNG DER HAUT**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

*Bemerkungen*

Die Empfindlichkeit und Fähigkeit von Tests, potenzielle Sensibilisatoren der menschlichen Haut zu ermitteln, sind von besonderer Bedeutung für ein Klassifizierungssystem der Toxizität im Bereich des öffentlichen Gesundheitswesens.

Es gibt kein alleiniges Prüfverfahren, das geeignet ist, alle Substanzen mit einer potenziellen Sensibilisierungswirkung auf die menschliche Haut hinreichend zu ermitteln, und das zudem für alle Substanzen relevant ist.

Bei der Auswahl eines Tests sind Faktoren wie die physikalischen Eigenschaften einer Substanz, einschließlich ihrer Fähigkeit, die Haut zu durchdringen, zu berücksichtigen.

Es wurden zwei Arten von Tests mit Meerschweinchen entwickelt: die Adjuvans-Tests, bei denen ein allergischer Zustand durch Auflösung oder Suspension der Prüfsubstanz im kompletten Freundschen Adjuvans (FCA) potenziert wird, und die Tests ohne Adjuvans.

Die Adjuvans-Tests haben bei der Bestimmung einer wahrscheinlichen Hautsensibilisierungswirkung einer Substanz beim Menschen voraussichtlich eine größere Vorhersagewahrscheinlichkeit als Methoden ohne das komplette Freundsche Adjuvans. Sie sind daher die bevorzugten Tests.

Bei dem Maximierungstest am Meerschweinchen (GPMT) handelt es sich um ein weit verbreitetes Adjuvans-Verfahren. Obwohl es noch zahlreiche andere Verfahren gibt, mit deren Hilfe sich feststellen lässt, ob eine Substanz eine Sensibilisierungsreaktion der Haut hervorzurufen vermag, gilt der GPMT als der bevorzugte Adjuvans-Test.

Bei zahlreichen chemischen Substanzklassen gelten die Tests ohne Adjuvans (von denen der Bühler-Test der bevorzugte ist) als weniger empfindlich.

In bestimmten Fällen kann es gute Gründe für die Wahl des Bühler-Tests geben, bei dem die äußerliche Applikation Anwendung findet, anstelle der intradermalen Injektion beim Maximierungstest am Meerschweinchen. Die Anwendung des Bühler-Tests sollte wissenschaftlich begründet werden.

In der vorliegenden Methode werden der Meerschweinchen-Maximierungstest (GPMT) und der Bühler-Test beschrieben. Andere Tests können verwendet werden, sofern sie gut validiert sind und eine wissenschaftliche Begründung gegeben wird.

Wenn ein positives Ergebnis mit einem anerkannten Screening-Test erhalten wird, kann eine Testsubstanz als potenziell sensibilisierend bewertet werden. Somit kann ein weiterer Test mit Meerschweinchen nicht notwendig sein. Wird aber ein negatives Ergebnis mit einem Screening-Test erhalten, ist ein Test mit Meerschweinchen entsprechend dem hier beschriebenen Verfahren durchzuführen.

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

1.2. DEFINITIONEN

Hautsensibilisierung: (allergische Kontaktdermatitis) immunologisch vermittelte Hautreaktion auf eine Substanz. Beim Menschen kann die Reaktion gekennzeichnet sein durch Pruritus, Erytheme, Ödeme, Papula, Vesiculae, Bullae oder eine Kombination dieser Erscheinungen. Bei anderen Spezies können die Reaktionen anderer Art sein und nur aus Erythemen und Ödemen bestehen.

Induktionsexposition: experimentelle Exposition eines Probanden gegenüber einer Prüfsubstanz mit der Absicht, eine Überempfindlichkeit zu induzieren.

Induktionsphase: Zeitraum von mindestens einer Woche nach einer Induktionsexposition, während dem sich eine Überempfindlichkeit entwickeln kann.

Provokationsexposition: experimentelle Exposition eines zuvor behandelten Tieres gegenüber einer Prüfsubstanz nach einer Induktionsphase, um zu bestimmen, ob das Tier überempfindlich reagiert.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit des verwendeten Testverfahrens sollte alle sechs Monate unter Verwendung von Substanzen mit bekannten leichten bis mittelgradigen hautsensibilisierenden Eigenschaften überprüft werden.

In einem ordnungsgemäß durchgeführten Test ist bei leichten/mittelgradigen Sensibilisatoren eine Reaktion von mindestens 30 % (Adjuvans-Test) bzw. mindestens 15 % (Test ohne Adjuvans) zu erwarten.

Die folgenden Substanzen werden bevorzugt:

| CAS-Nummer | EINECS-Nummer | EINECS-Bezeichnungen | Freinamen |
|---|---|---|---|
| 101-86-0 | 202-983-3 | α -Hexylcinnam-aldehyd | α-Hexyl-cinnamaldehyd |
| 149-30-4 | 205-736-8 | Benzothiazol-2-thiol (Mercaptobenzothiazol) | Kaptax |
| 94-09-7 | 202-303-5 | Benzocain | Norcain |

Unter bestimmten Umständen können bei entsprechender Begründung andere Kontrollsubstanzen, die die obigen Kriterien erfüllen, verwendet werden.

1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Versuchstiere werden zunächst durch intradermale Injektion und/oder epidermale Applikation der Prüfsubstanz ausgesetzt (Induktionsexposition). Nach einer Ruhephase von 10 bis 14 Tagen (Induktionsphase), in deren Verlauf sich eine Immunreaktion entwickeln kann, werden die Tiere einer Provokationsdosis ausgesetzt. Ausmaß und Grad der Hautreaktion auf die Provokationsexposition bei den Versuchstieren wird mit der Reaktion bei Kontrolltieren verglichen, die einer Scheininduktion unterzogen wurden und die Provokationsexposition erhalten.

1.5. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODEN

Wenn die Entfernung der Prüfsubstanz für notwendig erachtet wird, sollte dies mit Hilfe von Wasser oder einem geeigneten Lösungsmittel geschehen, ohne dass die vorhandene Reaktion bzw. die Unversehrtheit der Epidermis beeinträchtigt wird.

▼B

1.5.1. *Meerschweinchen-Maximierungstest (GPMT)*

1.5.1.1. Vorbereitungen

Gesunde junge erwachsene Albino-Meerschweinchen werden vor dem Test für die Dauer von mindestens 5 Tagen an die Laborbedingungen akklimatisiert. Vor Testbeginn werden die Tiere randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Behaarung wird je nach Prüfmethode durch Scheren, Rasieren oder, falls möglich, chemische Enthaarung entfernt. Dabei ist darauf zu achten, dass es nicht zu Hautabschürfungen kommt. Die Tiere werden vor Testbeginn und nach Abschluss des Tests gewogen.

1.5.1.2. Versuchsbedingungen

1.5.1.2.1. Versuchstiere

Es werden gängige Laborstämme des Albino-Meerschweinchens verwendet.

1.5.1.2.2. Anzahl und Geschlecht

Es können männliche und/oder weibliche Tiere verwendet werden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein.

Die behandelte Gruppe besteht aus mindestens 10 Tieren, die Kontrollgruppe aus mindestens 5 Tieren. Wenn weniger als 20 Tiere in der Prüfgruppe und 10 Tiere in der Kontrollgruppe verwendet wurden und es nicht möglich ist, zu entscheiden, ob die Prüfsubstanz sensibilisierend wirkt, sind Prüfungen an weiteren Tieren unbedingt zu empfehlen, bis insgesamt mindestens 20 Tiere in der Prüfgruppe und 10 Kontrolltiere getestet sind.

1.5.1.2.3. Dosierungen

Die für jede Induktionsexposition verwendete Konzentration der Prüfsubstanz sollte systemisch gut verträglich sein, und es sollte sich um die höchste Dosis handeln, die noch eine leichte bis mittelgradige Hautreizung hervorruft. Die für die Provokationsexposition verwendete Konzentration sollte die höchste nicht reizende Dosis sein. Wenn notwendig, können die entsprechenden Konzentrationen mit einer Pilotstudie unter Verwendung von zwei bis drei Tieren ermittelt werden. Für diesen Zweck kommt die Verwendung von FCA-behandelten Tieren in Betracht.

1.5.1.3. Versuchsdurchführung

1.5.1.3.1. Induktion

Tag 0 — behandelte Gruppe

Drei paarweise Injektionen von 0,1 ml werden jeweils rechts und links von der Mittellinie intradermal in die enthaarte Schulterregion injiziert.

Injektion 1: 1:1-Mischung (v/v) aus FCA/Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung;

Injektion 2: Prüfsubstanz in geeignetem Vehikel in der gewählten Konzentration;

Injektion 3: Prüfsubstanz in der gewählten Konzentration in einer 1:1-Mischung (v/v) aus FCA/Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung.

Bei der Injektion 3 werden die wasserlöslichen Substanzen vor der Mischung mit FCA in der wässrigen Phase gelöst. Fettlösliche oder unlösliche Substanzen werden vor der Zugabe der wässrigen Phase in FCA suspendiert. Die Endkonzentration der Prüfsubstanz entspricht der der Injektion 2.

▼B

Die Injektionen 1 und 2 werden nahe beieinander im kranialen Teil, die Injektion 3 im kaudalen Teil des Applikationsbereichs gesetzt.

Tag 0 — Kontrollgruppe

Drei paarweise Injektionen von 0,1 ml werden an denselben Stellen wie bei den behandelten Tieren injiziert.

Injektion 1: 1:1-Mischung (v/v) aus FCA/Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung;

Injektion 2: unverdünntes Vehikel;

Injektion 3: 50 %ige Zubereitung (w/v) des Vehikels in einer 1:1-Mischung (v/v) aus FCA/Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung.

Tag 5-7 — behandelte und Kontrollgruppe

Etwa 24 Stunden vor der topischen Induktionsapplikation wird, wenn die Substanz nicht hautreizend ist, der kurzgeschorene oder rasierte Applikationsbereich mit 0,5 ml Natriumlaurylsulfat 10 % in Vaseline bestrichen, um eine örtliche Reizung hervorzurufen.

Tag 6-8 — behandelte Gruppe

Der Applikationsbereich wird erneut enthaart. Ein Filterpapier (2 × 4 cm) wird vollständig mit der Prüfsubstanz in einem geeigneten Vehikel beladen, auf den Applikationsbereich aufgetragen und mit einem Okklusivverband für 48 Stunden fixiert. Die Wahl des Vehikels ist zu begründen. Feststoffe werden fein pulverisiert und in ein geeignetes Vehikel eingebracht. Flüssigkeiten können ggf. unverdünnt appliziert werden.

Tag 6-8 — Kontrollgruppe

Der Applikationsbereich wird erneut enthaart. Das Vehikel allein wird in entsprechender Weise auf den Applikationsbereich aufgebracht und mit einem Okklusivverband für 48 Stunden fixiert.

1.5.1.3.2. Provokation

Tag 20-22 — behandelte und Kontrollgruppe

Die Flanken der behandelten Tiere und der Kontrolltiere werden enthaart. Ein Läppchen oder eine Kammer mit der Prüfsubstanz wird auf eine Flanke der Tiere aufgebracht, und ein Läppchen oder eine Kammer mit dem Vehikel allein kann ggf. auf die andere Flanke aufgetragen werden. Die Läppchen werden mit einem Okklusivverband für 24 Stunden in Kontakt mit der Haut gehalten.

1.5.1.3.3. Beobachtung und Bewertung: behandelte Gruppe und Kontrollgruppe

— etwa 21 Stunden nach Entfernung des Läppchens wird der Provokationsbereich gereinigt und kurzgeschoren und/oder rasiert und bei Bedarf depiliert;

— etwa 3 Stunden später (etwa 48 Stunden nach Beginn der Provokationsexposition) wird die Hautreaktion bewertet und gemäß den in der Anlage aufgeführten Schweregraden dokumentiert;

— etwa 24 Stunden nach dieser Beobachtung erfolgt eine zweite Beobachtung (72 Stunden nach Beginn), die ebenfalls dokumentiert wird.

Es empfiehlt sich eine Blindablesung der behandelten Tiere und der Kontrolltiere.

Falls eine Klärung der Ergebnisse der ersten Provokation erforderlich ist, sollte eine zweite Provokation (d. h. eine Reprovokation), ggf. mit einer neuen Kontrollgruppe, etwa eine Woche nach der ersten in Betracht gezogen werden. Eine Reprovokation kann auch mit der ursprünglichen Kontrollgruppe durchgeführt werden.

▼B

Alle Hautreaktionen und auffälligen Befunde, einschließlich systemischer Reaktionen, infolge der Induktion und der Provokation sollten beobachtet und entsprechend der Bewertungsskala nach Magnusson/-Kligman (siehe Anlage) dokumentiert werden. Weitere Verfahren, wie z. B. die histopathologische Untersuchung oder die Messung der Hautfaltendicke, können verwendet werden, um zweifelhafte Reaktionen zu klären.

1.5.2. *Bühler-Test*

1.5.2.1. Vorbereitungen

Gesunde junge erwachsene Albino-Meerschweinchen werden vor dem Test für die Dauer von mindestens 5 Tagen an die Laborbedingungen akklimatisiert. Vor Testbeginn werden die Tiere randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeteilt Die Behaarung wird je nach Prüfmethode durch Scheren, Rasieren oder, falls möglich, chemische Enthaarung, entfernt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Haut nicht verletzt wird. Die Tiere werden vor Testbeginn und nach Abschluss des Tests gewogen.

1.5.2.2. Versuchsbedingungen

1.5.2.2.1. Versuchstiere

Es werden gängige Laborstämme des Albino-Meerschweinchens verwendet.

1.5.2.2.2. Anzahl und Geschlecht

Es können männliche und/oder weibliche Tiere verwendet werden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein.

Die behandelte Gruppe besteht aus mindestens 20 Tieren, die Kontrollgruppe aus mindestens 10 Tieren.

1.5.2.2.3. Dosierungen

Die für jede Induktionsexposition verwendete Konzentration der Prüfsubstanz sollte die höchstmögliche Dosis sein, die noch eine leichte, aber nicht zu starke Hautreizung hervorruft. Die für die Provokationsexposition verwendete Konzentration sollte die höchste nicht reizende Dosis sein. Wenn notwendig, können die entsprechenden Konzentrationen mit einer Pilotstudie unter Verwendung von zwei bis drei Tieren ermittelt werden.

Bei wasserlöslichen Prüfsubstanzen ist es zweckmäßig, Wasser oder eine verdünnte, nicht reizende Surfactant-Lösung als Vehikel zu verwenden. Bei sonstigen Prüfsubstanzen wird 80 % Ethanol/Wasser für die Induktion und Azeton für die Provokation bevorzugt.

1.5.2.3. Versuchsdurchführung

1.5.2.3.1. Induktion

Tag 0 — behandelte Gruppe

Eine Flanke wird enthaart (kurzgeschoren). Das Testläppchensystem sollte vollständig mit der Prüfsubstanz in einem geeigneten Vehikel beladen sein (die Auswahl des Vehikels muss begründet sein; flüssige Prüfsubstanzen können ggf. unverdünnt aufgetragen werden).

Das Testläppchen wird auf den Applikationsbereich aufgetragen und durch ein Okklusivpflaster oder eine Okklusivkammer und einen geeigneten Verband für 6 Stunden in Kontakt mit der Haut gehalten.

▼B

Das Testläppchensystem muss okklusiv sein. Eine runde oder quadratische Wattekompresse ist geeignet, sollte aber mindestens 4-6 $cm^2$ groß sein. Die Fixierung der Tiere mit einem geeigneten Fixator wird jedoch zur Okklusion bevorzugt. Bei Verwendung einer Umhüllung sind unter Umständen weitere Expositionen erforderlich.

Tag 0 — Kontrollgruppe

Eine Flanke wird enthaart (kurzgeschoren). Das Vehikel allein wird auf die gleiche Weise wie bei der behandelten Gruppe aufgebracht. Das Testläppchensystem wird durch ein Okklusivpflaster bzw. eine Okklusivkammer und einen geeigneten Verband für 6 Stunden in Kontakt mit der Haut gehalten. Wenn nachweisbar ist, dass eine scheinbehandelte Kontrollgruppe nicht erforderlich ist, kann eine unbehandelte Kontrollgruppe verwendet werden.

Tage 6-8 und 13-15 — behandelte Gruppe und Kontrollgruppe

Dieselbe Applikation wie am Tag 0 erfolgt am Tag 6-8 sowie erneut am Tag 13-15 auf demselben Applikationsbereich (bei Bedarf enthaart) derselben Flanke.

1.5.2.3.2. Provokation

Tag 27-29 — behandelte Gruppe und Kontrollgruppe

Die unbehandelte Flanke der behandelten Tiere und der Kontrolltiere wird enthaart (kurz geschoren). Ein Okklusivpflaster bzw. eine Okklusivkammer mit der entsprechenden Menge an Prüfsubstanz wird in der maximalen nicht hautreizenden Konzentration auf die hintere unbehandelte Flanke der behandelten Tiere und der Kontrolltiere aufgetragen.

Gegebenenfalls kann ein Okklusivpflaster bzw. eine Okklusivkammer mit dem Vehikel allein auf die vordere unbehandelte Flanke der behandelten Tiere und der Kontrolltiere aufgetragen werden. Die Läppchen bzw. Kammern werden mit einem geeigneten Verband für 6 Stunden in Kontakt mit der Haut gehalten.

1.5.2.3.3. Beobachtung und Bewertung

— etwa 21 Stunden nach Entfernung des Läppchens wird der Provokationsbereich enthaart;

— etwa 3 Stunden später (etwa 30 Stunden nach Applikation des Provokationspflasters) werden die Hautreaktionen bewertet und gemäß den in der Anlage aufgeführten Schweregraden dokumentiert;

— etwa 24 Stunden nach dieser ersten Beobachtung (d. h. 54 Stunden nach Applikation des Provokationspflasters) werden die Hautreaktionen erneut bewertet und dokumentiert.

Es empfiehlt sich eine Blindablesung der behandelten Tiere und der Kontrolltiere.

Falls eine Klärung der Ergebnisse der ersten Provokation erforderlich ist, sollte eine zweite Provokation (d. h. eine Reprovokation), ggf. mit einer neuen Kontrollgruppe, etwa eine Woche nach der ersten in Betracht gezogen werden. Eine Reprovokation kann auch mit der ursprünglichen Kontrollgruppe durchgeführt werden.

▼B

Alle Hautreaktionen und auffälligen Befunde, einschließlich systemischer Reaktionen, infolge der Induktion und der Provokation sollten beobachtet und entsprechend der Bewertungsskala nach Magnusson/-Kligman (siehe Anlage) dokumentiert werden. Weitere Verfahren, wie z. B. die histopathologische Untersuchung oder die Messung der Hautfaltendicke, können verwendet werden, um zweifelhafte Reaktionen zu klären.

2. **DATEN (GPMT und Bühler-test)**

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Aus den Daten müssen für jedes Versuchstier die Hautreaktionen zu jedem Beobachtungszeitpunkt hervorgehen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT (GPMT und Bühler-test)**

Wenn ein Screening-Test (z. B. Lokaler Lymphknotentest [LLNA], Maus-Ohrschwellungstest [MEST]) vor dem Meerschweinchentest durchgeführt wird, muss die Beschreibung oder Literaturstelle des Tests mit Angaben zum Verfahren neben den mit den Prüf- und Referenzsubstanzen gewonnenen Ergebnissen angegeben werden.

**Prüfbericht (GPMT und Bühler-Test)**

Der Prüfbericht soll nach Möglichkeit folgende Angaben enthalten:

Versuchstiere:

— verwendeter Meerschweinchenstamm;

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Beginn der Prüfung.

Prüfbedingungen:

— Methode der Vorbereitung der Applikationsstelle;

— Angaben zur Art der verwendeten Läppchen sowie zur Patching-Technik;

— Ergebnis der Pilotstudie mit den für den eigentlichen Test ermittelten Induktions- und Provokationskonzentrationen,

— Angaben zur Vorbereitung, Applikation und Entfernung der Prüfsubstanz;

— Begründung der Auswahl des Vehikels;

— Konzentrationen des Vehikels und der Prüfsubstanz für die Induktions- und die Provokationsexposition sowie applizierte Gesamtmenge an Substanz zur Induktion und Provokation.

Ergebnisse:

— Zusammenfassung der Ergebnisse der letzten Überprüfung der Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit des Tests (siehe 1.3) mit Angaben über verwendete Substanzen, Konzentrationen und Vehikel;

▼B

— Beobachtungen der einzelnen Tiere mit Angabe des Bewertungssystems;

— ausführliche Beschreibung der Art und des Schweregrades der beobachteten Wirkungen;

— eventuelle histopathologische Befunde.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATUR**

Diese Methode entspricht der OECD TG 406.

▼B

*Anlage*

*TABELLE*

**Bewertungsskala nach Magnusson/Kligman für Reaktionen auf Provokations-Läppentests**

0 = keine sichtbare Veränderung

1 = leichtes oder fleckiges Erythem

2 = mittelgradiges und konfluierendes Erythem

3 = starkes Erythem und Schwellung

▼M4

## B.7 28-TAGE-TOXIZITÄTSSTUDIE MIT WIEDERHOLTER ORALER VERABREICHUNG AN NAGETIEREN

### EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 407 (2008). Die ursprüngliche Prüfrichtlinie 407 wurde 1981 angenommen. 1995 wurde eine überarbeitete Fassung angenommen mit dem Ziel, insbesondere in Bezug auf Neurotoxizität und Immunotoxizität zusätzliche Informationen von den in der Studie verwendeten Tieren zu gewinnen.

2. Die OECD leitete 1998 mit hoher Priorität eine Überarbeitung der bestehenden Prüfrichtlinien und die Ausarbeitung neuer Prüfrichtlinien für Screening und Prüfung potenzieller endokriner Disruptoren ein (8). Ein Aspekt dieser Maßnahme war die Aktualisierung der bestehenden OECD-Prüfrichtlinie für eine „28-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter oraler Verabreichung an Nagetieren“ (TG 407) durch Parameter, mit denen eine endokrine Wirkung von Prüfsubstanzen festgestellt werden kann. Dieses Verfahren wurde in einem umfangreichen internationalen Programm auf Relevanz und Praktikabilität der zusätzlichen Parameter, ihre Leistungsfähigkeit in Bezug auf chemische Stoffe mit (anti)östrogener, (anti)androgener und (anti)thyroider Wirkung, die Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit und die Interferenz der neuen Parameter mit den zuvor nach der TG 407 vorgesehenen Parametern geprüft. Die dabei gewonnene umfangreiche Datenmenge wurde in einem umfassenden OECD-Bericht zusammengestellt und ausführlich bewertet (9). Diese aktualisierte Prüfmethode B.7 (die der TG 407 entspricht) ist das Ergebnis der im internationalen Prüfprogramm gesammelten Erfahrungen und Erkenntnisse. Mithilfe dieser Prüfmethode können bestimmte endokrin vermittelte Wirkungen in einen Gesamtzusammenhang mit anderen toxikologischen Wirkungen gestellt werden.

### AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

3. Bei der Beurteilung und Bewertung der toxischen Merkmale eines chemischen Stoffs kann die orale Toxizität nach wiederholter Verabreichung des Stoffs bestimmt werden, nachdem zunächst durch Prüfungen auf akute Toxizität erste Toxizitätsdaten gewonnen wurden. Diese Prüfmethode ist dazu bestimmt, die Wirkungen auf ein sehr breites Spektrum potenzieller Toxizitätsziele zu untersuchen. Sie gibt Aufschluss über die möglichen Gesundheitsgefahren, einschließlich der Wirkungen auf das Nervensystem, das Immunsystem und das endokrine System, die durch wiederholte Exposition über einen relativ begrenzten Zeitraum auftreten können. In Bezug auf diese speziellen Endpunkte sollte die Methode es ermöglichen, chemische Stoffe mit neurotoxischem Potenzial, die in dieser Hinsicht eingehender untersucht werden sollten, und chemische Stoffe, die die Physiologie der Schilddrüse beeinflussen, zu identifizieren. Sie kann auch Daten über Stoffe liefern, die die Fortpflanzungsorgane männlicher und/oder weiblicher junger, adulter Tiere beeinträchtigen, und Hinweise auf immunologische Wirkungen geben.

4. Die Ergebnisse dieser Prüfmethode B.7 sollten für die Identifizierung von Gefahren und zur Risikobewertung verwendet werden. Die Ergebnisse in Bezug auf die endokrinen Parameter sind im Kontext des „OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ (11) zu interpretieren. Die Methode umfasst die Basisstudie zur Prüfung auf Toxizität bei wiederholter Verabreichung, die für chemische Stoffe, bei denen eine 90-Tage-Studie nicht gerechtfertigt ist (z. B. wenn das Produktionsvolumen bestimmte Grenzen nicht überschreitet), oder als Vorstudie zu einer Langzeitstudie verwendet werden kann. Die Expositionsdauer sollte 28 Tage betragen.

▼M4

5. Das internationale Programm für die Validierung der Parameter, die geeignet sind, möglicherweise eine endokrine Wirkung einer Prüfsubstanz nachzuweisen, hat gezeigt, dass die Qualität der mit dieser Prüfmethode B.7 gewonnenen Daten weitgehend von der Erfahrung des Prüflabors abhängt. Dies gilt insbesondere für die histopathologische Bestimmung von zyklischen Veränderungen der weiblichen Fortpflanzungsorgane und für die Gewichtsbestimmung bei den kleinen hormonabhängigen Organen, die schwierig zu sezieren sind. Es wurde ein Leitfaden zur Histopathologie entwickelt (19), der auf der öffentlichen OECD-Website für Prüfrichtlinien abrufbar ist. Er soll Pathologen bei Untersuchungen helfen und die Empfindlichkeit der Prüfungen verbessern. Es wurde festgestellt, dass verschiedene Parameter auf endokrine Toxizität hindeuten; diese wurden in die Prüfrichtlinie aufgenommen. Andere Parameter, deren Nutzen wegen unzureichender Daten nicht erwiesen ist oder deren Fähigkeit zur Feststellung endokriner Disruptoren im Validierungsprogramm nur unzureichend belegt wurde, werden als fakultative Endpunkte vorgeschlagen (siehe Anlage 2).

6. Die Ergebnisse des Validierungsprozesses deuten darauf hin, dass diese Prüfung nicht empfindlich genug ist, um alle Stoffe mit (anti)androgener oder (anti)östrogener Wirkungsweise zu identifizieren (9). Diese Prüfmethode wird nicht in einer für endokrine Störungen sehr empfindlichen Lebensphase durchgeführt. Während des Validierungsprozesses konnten zwar Substanzen mit schwacher oder starker Wirkung auf die Schilddrüsenfunktion und solche, die das endokrine System über östrogene oder androgene Rezeptoren mehr oder weniger stark beeinflussen, identifiziert werden; in den meisten Fällen konnten Stoffe mit endokriner Wirkung, die diese Rezeptoren nur geringfügig beeinträchtigen, mit der Methode aber nicht erkannt werden. Aus diesem Grund kann sie nicht als Screening-Test für endokrine Aktivität bezeichnet werden.

7. Die Tatsache, dass keine mit diesen Wirkungsweisen verbundenen Effekte festgestellt werden, ist daher kein Nachweis dafür, dass es keine Wirkungen auf das endokrine System gibt. Die Charakterisierung der Substanz in Bezug auf endokrin vermittelte Wirkungen darf sich deshalb nicht allein auf die Ergebnisse dieser Prüfmethode stützen; es ist vielmehr ein WoE-Ansatz anzuwenden, der alle vorhandenen Daten über einen chemischen Stoff zur Bestimmung seiner potenziellen endokrinen Aktivität einbezieht. Aus diesem Grund dürfen sich Regulierungsentscheidungen über endokrine Aktivität (Charakterisierung von Substanzen) nicht allein auf die Ergebnisse aus der Anwendung dieser Prüfmethode stützen, sondern müssen auf einer breiten Grundlage basieren.

8. Bei allen Verfahren, bei denen Tiere verwendet werden, sind die örtlichen Standards der Versuchstierpflege einzuhalten. Die nachstehenden Beschreibungen der Tierpflege und -behandlung sind Mindeststandards; wenn örtliche Bestimmungen strenger sind, gehen diese vor. Die OECD hat einen Leitfaden über die humane Behandlung von Versuchstieren herausgegeben (14).

9. Die verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

10. Die Prüfsubstanz wird mehreren Gruppen von Versuchstieren über einen Zeitraum von 28 Tagen täglich in abgestuften Dosen oral verabreicht, und zwar eine Dosisstufe je Gruppe. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich sorgfältig auf Toxizitätszeichen beobachtet. Tiere, die im Verlauf der Prüfung sterben, und vorzeitig getötete Tiere werden seziert; die nach Abschluss des Tests überlebenden Tiere werden getötet und ebenfalls seziert. Eine 28-Tage-Studie gibt Aufschluss über die Wirkungen einer wiederholten oralen Exposition und kann Aufschluss darüber geben, ob weitere Studien über längere Zeiträume erforderlich sind. Sie kann

▼M4

auch Informationen über die Wahl der Konzentrationen für Langzeitstudien liefern. Die mit dieser Prüfmethode gewonnenen Daten sollten es ermöglichen, die Toxizität der Prüfsubstanz zu beschreiben, Aufschluss über die Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erhalten und den NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) zu bestimmen.

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Auswahl von Versuchstierarten**

11. Die bevorzugte Nagetierart ist die Ratte, aber auch andere Nagetierarten sind geeignet. Wenn die in dieser Prüfmethode B.7 genannten Parameter an einer anderen Nagetierart untersucht werden, ist dies ausführlich zu begründen. Es ist zwar biologisch plausibel, dass andere Arten ähnlich auf toxische Stoffe reagieren dürften wie die Ratte, aber die Verwendung kleinerer Arten kann wegen der technisch schwierigeren Sektion kleinerer Organe zu größeren Schwankungen bei den Ergebnissen führen. Im internationalen Validierungsprogramm für den Nachweis von endokrinen Disruptoren wurde nur die Ratte als Versuchstier verwendet. Es sind junge, gesunde, adulte Tiere aus üblicherweise eingesetzten Laborstämmen zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder bereits geworfen haben noch momentan trächtig sein. Mit der Dosierung sollte möglichst bald nach dem Absetzen begonnen werden, auf jeden Fall jedoch, bevor die Tiere 9 Wochen alt sind. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede der Tiere möglichst gering sein und ± 20 % des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts nicht überschreiten. Wenn eine Studie mit wiederholter oraler Gabe als Vorstudie zu einer Langzeitstudie durchgeführt wird, sollten in beiden Studien vorzugsweise Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden.

**Haltung und Fütterung**

12. Bei allen Verfahren sind die örtlichen Standards der Versuchstierpflege einzuhalten. Die Temperatur im Tierversuchsraum sollte 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte mindestens 30 % betragen und — außer beim Reinigen des Raums — 70 % nicht überschreiten. Angestrebt werden sollte eine Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, und eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung ist zu gewährleisten. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung der Prüfsubstanz sichergestellt werden muss, wenn die Prüfsubstanz auf diese Art verabreicht werden soll. Die Tiere sollten in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen untergebracht werden; sie können auch einzeln gehalten werden, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Bei Gruppenhaltung sollten maximal fünf Tiere in einem Käfig untergebracht sein.

13. Das Futter ist regelmäßig auf Schadstoffe zu analysieren. Eine Probe des Futters ist bis zur Fertigstellung des Abschlussberichts aufzubewahren.

**Vorbereitung der Tiere**

14. Gesunde, junge, adulte Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sollten so angeordnet werden, dass etwaige Einflüsse der Käfigplatzierung minimiert werden. Die Tiere werden eindeutig gekennzeichnet und vor Beginn der Behandlungsstudie in ihren Käfigen über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

**Herstellung der Dosen**

15. Die Prüfsubstanz wird über eine Schlundsonde, mit der Nahrung oder dem Trinkwasser verabreicht. Die Methode der oralen Verabreichung hängt vom Zweck der Studie und von den physikalischen/chemischen/toxikokinetischen Eigenschaften der Prüfsubstanz ab.

▼M4

16. Bei Bedarf wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension, dann eine Lösung/Suspension in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in einem anderen Vehikel in Betracht zu ziehen. Bei anderen Vehikeln als Wasser müssen seine toxischen Merkmale bekannt sein. Die Stabilität der Prüfsubstanz im Vehikel sollte bestimmt werden.

VERFAHREN

**Zahl und Geschlecht der Versuchstiere**

17. Für jede Dosisstufe sind mindestens zehn Tiere (fünf weibliche und fünf männliche) zu verwenden. Sollen im Verlauf der Prüfung Tiere getötet werden, ist die Zahl der Tiere um die Zahl zu erhöhen, die vor Abschluss der Studie getötet werden sollen. Zur Beobachtung der Reversibilität, der Persistenz oder des verzögerten Auftretens toxischer Wirkungen für mindestens 14 Tage nach der Behandlung ist die Einbeziehung einer zusätzlichen Satellitengruppe von zehn Tieren (fünf je Geschlecht) in der Kontrollgruppe und in der Gruppe mit der höchsten Dosis in Betracht zu ziehen.

**Dosierung**

18. Im Allgemeinen sind mindestens drei Prüfgruppen und eine Kontrollgruppe zu verwenden; wenn aber angesichts der Beurteilung anderer Daten bei einer Dosis von 1 000 mg pro kg Körpergewicht und Tag keine Wirkungen zu erwarten sind, kann ein Limit-Test durchgeführt werden. Liegen keine entsprechenden Daten vor, kann eine Dosisfindungsstudie (Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft) durchgeführt werden, um die zu verwendenden Dosen zu bestimmen. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfsubstanz sollen die Tiere in der Kontrollgruppe unter identischen Bedingungen behandelt werden wie die Versuchstiere in der Prüfgruppe. Wird die Prüfsubstanz mit einem Vehikel verabreicht, muss die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten verwendeten Volumen erhalten.

19. Bei der Wahl der Dosisstufen sind sämtliche für die Prüfsubstanz oder verwandte Stoffe vorliegenden Daten zur Toxizität und (Toxiko-)Kinetik zu berücksichtigen. Die höchste Dosisstufe ist so zu wählen, dass zwar toxische Wirkungen, aber keine Todesfälle oder schweres Leiden hervorgerufen werden. Anschließend ist eine absteigende Folge von Dosisstufen zu wählen, um dosisabhängige Wirkungen und die niedrigste Dosisstufe ohne zu beobachtende unerwünschte Wirkungen (NOAEL) nachzuweisen. Zwei- bis vierfache Abstände erweisen sich häufig als optimale Dosisabstufungen, und meist ist eine zusätzliche vierte Prüfgruppe der Verwendung von sehr großen Dosisabständen (z. B. um mehr als den Faktor 10) vorzuziehen.

20. Bei allgemeiner Toxizität (z. B. vermindertes Körpergewicht, Wirkungen auf Leber, Herz, Lungen oder Nieren usw.) oder anderen Veränderungen, die möglicherweise keine toxischen Reaktionen sind (z. B. verminderte Futteraufnahme, Lebervergrößerung) sind die beobachteten Wirkungen auf immunologische, neurologische oder endokrine Endpunkte mit Vorsicht zu interpretieren.

**Limit-Test**

21. Verursacht die Prüfung bei einer Dosisstufe von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht pro Tag bzw. eine entsprechende Konzentration im Futter oder Trinkwasser (in Abhängigkeit vom jeweiligen Körpergewicht) unter Verwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen gegebenenfalls verzichtet werden. Der Limit-Test findet allerdings keine Anwendung, wenn die Exposition des Menschen die Prüfung in einer höheren Dosisstufe angezeigt erscheinen lassen.

▼M4

**Verabreichung der Dosen**

22. Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz an sieben Tagen in der Woche über einen Zeitraum von 28 Tagen. Wird die Prüfsubstanz über eine Sonde verabreicht, so sollte dies in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Schlundsonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, außer bei wässrigen Lösungen, von denen 2 ml/100 g Körpergewicht gegeben werden können. Abgesehen von reizenden oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfvolumens dadurch auf ein Mindestmaß zu reduzieren, dass eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

23. Bei mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichten Stoffen ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfsubstanz die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfsubstanz im Futter verabreicht wird, kann entweder eine konstante Konzentration im Futter (ppm) oder eine konstante Dosis, bezogen auf das Körpergewicht des Tieres, verwendet werden; die jeweils gewählte Verfahrensweise muss angegeben werden. Eine mit einer Schlundsonde verabreichte Dosis sollte jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und so angepasst werden, dass eine konstante Dosis in Relation zum Körpergewicht aufrechterhalten wird. Wenn eine Studie mit wiederholter Gabe als Vorstudie zu einer Langzeitstudie durchgeführt wird, sollten die beiden Studien bezüglich des Futters der Tiere vergleichbar sein.

**Beobachtungen**

24. Die Tiere sollten 28 Tage beobachtet werden. Tiere in einer Satellitengruppe, bei denen Nachfolgebeobachtungen vorgesehen sind, sollten für mindestens weitere 14 Tage ohne Behandlung gehalten werden, um ein verzögertes Auftreten, die Persistenz oder die Reversibilität von toxischen Wirkungen festzustellen.

25. Allgemeine klinische Beobachtungen sollten mindestens einmal täglich erfolgen, vorzugsweise jeweils zur gleichen Zeit und unter Berücksichtigung des Zeitraums nach der Verabreichung, in dem voraussichtlich der Wirkungsgipfel zu erwarten ist. Der Gesundheitszustand der Tiere ist zu dokumentieren. Mindestens zweimal täglich werden alle Tiere auf Erkrankungen oder Todesfälle überprüft.

26. Alle Tiere sollten einmal vor der ersten Exposition (um intraindividuelle Vergleiche zu ermöglichen) und danach mindestens einmal wöchentlich eingehend klinisch untersucht werden. Die Beobachtungen sind außerhalb des Käfigs, in dem die Tiere gehalten werden, in stets gleicher Umgebung und vorzugsweise stets zur gleichen Tageszeit vorzunehmen. Sie sind sorgfältig zu dokumentieren, am besten nach einer speziell vom Prüflabor entwickelten Bewertungsskala. Durch geeignete Maßnahmen ist sicherzustellen, dass die Prüfbedingungen möglichst konstant bleiben und dass die Beobachtungen vorzugsweise von Personen vorgenommen werden, denen die Behandlung der Tiere nicht bekannt ist. Zu achten ist insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, auf Sekrete und Exkrete sowie autonome Aktivitäten (z. B. Tränensekretion, Piloerektion, Pupillengröße, ungewöhnliche Atemmuster). Gang- und Haltungsstörungen, ferner Reaktionen auf den Umgang mit den Tieren sowie etwaige klonische oder tonische Bewegungen, Stereotypien (z. B. übermäßiges Putzen, wiederholte Kreisbewegungen) oder abnormes Verhalten (z. B. Selbstverstümmelung, Rückwärtsgehen) sollten auch dokumentiert werden (2).

27. In der vierten Expositionswoche sollten die sensorische Reaktivität auf Reize verschiedener Art (2) (z. B. akustische, visuelle und propriozeptive Reize) (3)(4)(5), die Greifkraft (6) und die motorische Aktivität (7) bewertet werden. Weitere Einzelheiten zu den möglichen Untersuchungen finden sich in der Literatur. Allerdings können auch andere als dort genannte Verfahren angewendet werden.

▼M4

28. Die funktionellen Beobachtungen in der vierten Expositionswoche können entfallen, wenn es sich um eine Vorstudie für eine nachfolgende Prüfung auf subchronische Toxizität (90 Tage) handelt. In diesem Fall sollten die funktionellen Beobachtungen im Rahmen dieser Folgestudie vorgenommen werden. Andererseits könnten die Daten über funktionelle Beobachtungen aus der Studie mit wiederholter Verabreichung aber die Wahl der Dosisstufen für eine nachfolgende Prüfung auf subchronische Toxizität erleichtern.

29. In Ausnahmefällen können funktionelle Beobachtungen auch bei Gruppen entfallen, die so starke sonstige Toxizitätsanzeichen aufweisen, dass die Leistungen in Funktionstests dadurch signifikant beeinträchtigt würden.

30. Bei der Nekropsie kann der Östruszyklus aller weiblichen Tiere (fakultativ) durch Vaginalabstriche bestimmt werden. Diese Beobachtungen geben Aufschluss über die Phase des Östruszyklus zum Zeitpunkt der Tötung und erleichtern die histologische Beurteilung östrogenempfindlicher Gewebe [siehe Leitfaden zur Histopathologie (19)].

**Körpergewicht und Futter-/Trinkwasseraufnahme**

31. Alle Tiere sind mindestens einmal wöchentlich zu wiegen. Die Futteraufnahme wird mindestens wöchentlich gemessen. Wenn die Prüfsubstanz über das Trinkwasser verabreicht wird, wird auch die Wasseraufnahme mindestens einmal wöchentlich gemessen.

**Hämatologische Untersuchung**

32. Die folgenden hämatologischen Parameter sind am Ende der Prüfung zu bestimmen: Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Retikulozyten, Gesamt- und Differential-Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und Blutgerinnungszeit/-fähigkeit. Wenn die Prüfsubstanz oder ihre möglichen Metaboliten oxidierende Eigenschaften haben oder diese vermutet werden, sollten zusätzlich die Methämoglobinkonzentration und die Heinz-Körper bestimmt werden.

33. Die Blutproben müssen an einer benannten Stelle unmittelbar vor oder bei der Tötung der Tiere entnommen und fachgerecht gelagert werden. In der Nacht vor der Tötung sollten die Tiere kein Futter erhalten ([2]).

**Klinisch-biochemische Untersuchungen**

34. Zur Untersuchung der wesentlichen toxischen Wirkungen in Geweben und insbesondere der Wirkungen auf Leber und Nieren sollten klinisch-biochemische Parameter in Blutproben aller Tiere bestimmt werden, die unmittelbar vor oder bei der Tötung der Tiere (mit Ausnahme von Tieren, die moribund aufgefunden und/oder vor Beendigung der Studie getötet werden) entnommen werden. Die Plasma- oder Serumuntersuchungen umfassen die Parameter Natrium, Kalium, Glucose, Gesamtcholesterin, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtprotein und Albumin, mindestens zwei Enzyme, die auf hepatozelluläre Wirkungen schließen lassen (wie Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, alkalische Phosphatase, γ-Glutamyltranspeptidase und Glutamatdehydrogenase) sowie Gallensäuren. Die Bestimmung weiterer Enzyme (aus Leber oder anderen Organen) sowie von Bilirubin kann unter bestimmten Umständen ebenfalls wertvolle Hinweise liefern.

35. Optional können in der letzten Woche der Studie am Urin, der zu festgelegten Zeiten gesammelt wird, folgende Analysebestimmungen durchgeführt werden: Aussehen, Volumen, Osmolalität oder spezifisches Gewicht, pH-Wert, Protein, Glucose und Blut/Blutzellen.

([2]) Für eine Reihe von Serum- und Plasmabestimmungen, insbesondere der Glucose, ist eine Futterkarenz der Tiere über Nacht zu empfehlen. Der Hauptgrund dafür ist, dass die bei fehlender Futterkarenz unweigerlich zunehmende Variabilität zu einer Maskierung subtilerer Wirkungen führen und die Interpretation erschweren könnte. Andererseits jedoch kann die nächtliche Futterkarenz den allgemeinen Stoffwechsel der Tiere beeinflussen und, insbesondere in Futterstudien, die tägliche Exposition gegen die Prüfsubstanz beeinträchtigen. Wenn man sich für die nächtliche Futterkarenz entscheidet, sollten die klinisch-biochemischen Parameter nach Durchführung der funktionellen Beobachtungen in Woche 4 der Studie bestimmt werden.

▼M4

36. Darüber hinaus sollten Untersuchungen zur Bestimmung von Plasma- oder Serummarkern für eine allgemeine Gewebsschädigung erwogen werden. Des Weiteren sollten, wenn die bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz im Verdacht stehen, die entsprechenden Stoffwechselprofile zu beeinflussen, die Parameter Calcium, Phosphat, Triglyzeride, spezifische Hormone und Cholinesterase bestimmt werden. Die jeweiligen Parameter sind je nach Prüfsubstanzklasse bzw. von Fall zu Fall zu bestimmen.

37. Wenngleich in der internationalen Bewertung der endokrinen Endpunkte kein klarer Vorteil der Bestimmung von Schilddrüsenhormonen (T3, T4) und TSH nachgewiesen werden konnte, kann es hilfreich sein, Plasma- oder Serumproben zur Messung von T3, T4 und TSH (fakultativ) aufzubewahren, wenn es einen Hinweis auf eine Wirkung auf die Hypophysen-Schilddrüsen-Achse gibt. Diese Proben können zur Lagerung bei - 20 °C eingefroren werden. Die folgenden Faktoren können die Variabilität und die absoluten Konzentrationen der Hormonbestimmungen beeinflussen:

— der Zeitpunkt der Tötung wegen Schwankungen der Hormonkonzentrationen im Tagesverlauf,

— Methode der Tötung, die gewählt wird, um übermäßigen Stress für die Tiere zu vermeiden, der die Hormonkonzentrationen beeinflussen könnte,

— Testkits für Hormonbestimmungen mit unterschiedlichen Standardkurven.

Schilddrüsenaktive Substanzen können durch histopathologische Untersuchungen zuverlässiger identifiziert werden als über die Hormonspiegel.

38. Plasmaproben, die speziell zur Hormonbestimmung vorgesehen sind, sollten immer zur gleichen Tageszeit gewonnen werden. Es wird empfohlen, die durch histopathologische Veränderungen der Schilddrüse verursachten T3-, T4- und TSH-Spiegel zu bestimmen. Die verschiedenen im Handel erhältlichen Assay-Kits können bei der Analyse der Hormonkonzentration unterschiedliche numerische Werte ergeben. Aus diesem Grund können möglicherweise keine Leistungskriterien auf der Grundlage einheitlicher historischer Daten angegeben werden. Die Labors sollten stattdessen anstreben, die Variationskoeffizienten für T3 und T4 unter 25 und für TSH unter 35 zu halten. Alle Konzentrationen sind in ng/ml zu protokollieren.

39. Erweisen sich die Daten aus vorangegangenen Versuchen als ungeeignet, sollte eine Bestimmung hämatologischer und klinisch-biochemischer Parameter vor Versuchsbeginn oder vorzugsweise an einer nicht in die Versuchsgruppen einbezogenen Gruppe von Tieren in Betracht gezogen werden.

PATHOLOGIE

**Makroskopische Untersuchung**

40. Alle an der Studie beteiligten Tiere müssen einer vollständigen, eingehenden makroskopischen Untersuchung unterzogen werden, die die sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel-, Brust- und Bauchhöhlen und ihres Inhalts umfasst. Leber, Nieren, Nebennieren, Hoden, Nebenhoden, Prostata und Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen als Ganzes, Thymus, Milz, Gehirn und Herz aller Tiere (mit Ausnahme von Tieren, die moribund aufgefunden und/oder vor Beendigung der Studie getötet werden) sind in angemessener Form von anhaftendem Gewebe zu befreien, und ihr Nassgewicht ist so rasch wie möglich nach der Sektion festzustellen, um ein Austrocknen zu verhindern. Bei der Entfernung der anhaftenden Gewebe von der Prostata ist sorgfältig darauf zu achten, die mit Flüssigkeit gefüllten Samenbläschen nicht zu perforieren. Alternativ können Samenbläschen und Prostata auch nach der Fixierung von anhaftendem Gewebe befreit und gewogen werden.

▼M4

41. Darüber hinaus können fakultativ auch zwei weitere Organe baldmöglichst nach der Sektion gewogen werden, um ein Austrocknen zu verhindern: die Ovarien (Nassgewicht) und der Uterus mit Zervix (Anleitung zur Entfernung und Aufbereitung des Uterusgewebes für die Gewichtsbestimmung in OECD TG 440 (18)).

42. Das Gewicht der Schilddrüse (fakultativ) kann nach der Fixierung bestimmt werden. Anhaftendes Gewebe ist sehr vorsichtig und erst nach der Fixierung zu entfernen, um Gewebeschäden zu vermeiden. Eine Gewebeschädigung könnte die histopathologische Analyse beeinträchtigen.

43. Die folgenden Gewebe sind in dem für die betreffende Gewebeart und die vorgesehene anschließende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmittel aufzubewahren (siehe Nummer 47): alle Gewebe mit makroskopischen Veränderungen, Hirn (typische Regionen einschließlich Cerebrum, Cerebellum und Pons), Rückenmark, Auge, Magen, Dünn- und Dickdarm (mit Peyer'schen-Platten), Leber, Nieren, Nebennieren, Milz, Herz, Thymus, Schilddrüse, Trachea und Lungen (konserviert durch Inflation mit Fixierungsmittel und Immersion), Gonaden (Hoden und Ovarien), akzessorische Geschlechtsorgane (Uterus und Zervix, Nebenhoden, Prostata und Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen), Vagina,Harnblase,Lymphknoten [je nach Erfahrung des Labors sollte neben dem proximalsten drainierenden Lymphknoten ein weiterer Lymphknoten entnommen werden (15)], periphere Nerven (N. ischiadicus oder N. tibialis) vorzugsweise in der Nähe des Muskels, Skelettmuskel und Knochen mit Knochenmark (Schnitt oder wahlweise ein frisch fixiertes Knochenmarkaspirat). Es wird empfohlen, die Hoden durch Immersion in Bouin'scher Lösung oder modifizierter Davidson-Lösung zu fixieren (16) (17). Damit das Fixierungsmittel rasch eindringen kann, muss die Tunica albuginea an beiden Enden des Organs vorsichtig und flach mit einer Nadel punktiert werden. Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebeuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz als mögliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden.

44. Die folgenden Gewebe können wichtige Hinweise auf endokrine Wirkungen geben: Gonaden (Ovarien und Hoden), akzessorische Geschlechtsorgane (Uterus mit Zervix, Nebenhoden, Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen, Prostata dorsolateral und ventral), Vagina, Hypophose, männliche Brustdrüse, Schilddrüse und Nebennieren. Veränderungen der männlichen Brustdrüsen sind nicht ausreichend dokumentiert, aber dieser Parameter kann sehr empfindlich auf Stoffe mit östrogener Wirkung reagieren. Die Beobachtung von nicht unter Nummer 43 genannten Organen/Geweben ist fakultativ (siehe Anlage 2).

45. Der Leitfaden zur Histopathologie (19) enthält zusätzliche Informationen zur Sektion, Fixierung, Schnittherstellung und Histopathologie endokriner Gewebe.

46. Das internationale Prüfprogramm hat Hinweise darauf ergeben, dass subtile endokrine Wirkungen chemischer Stoffe, die die Homöostase der Geschlechtshormone geringfügig beeinträchtigen können, eher durch die Störung der Synchronisation des Östruszyklus als durch deutliche histopathologische Veränderungen in weiblichen Geschlechtsorganen identifiziert werden können. Wenngleich diese Wirkungen nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten, wird empfohlen, Hinweise auf eine mögliche Asynchronie des Östruszyklus bei der Auswertung der histopathologischen Untersuchung von Ovarien (Follikelzellen, Theca-Zellen und Granulosazellen), Uterus, Zervix und Vagina zu berücksichtigen. Falls die Phase des Östruszyklus durch Vaginalabstriche bestimmt wird, kann sie auch in diesen Vergleich einbezogen werden.

▼M4

**Histopathologie**

47. Bei allen Tieren der Kontrollgruppe und der Hochdosisgruppe sind die konservierten Organe und Gewebe umfassend histopathologisch zu untersuchen. Diese Untersuchungen sind auch auf die Tiere aller anderen Dosisgruppen auszudehnen, wenn behandlungsbedingte Veränderungen in der Hochdosisgruppe festgestellt werden.

48. Alle makroskopischen Läsionen sind zu untersuchen.

49. Umfasst eine Prüfung auch eine Satellitengruppe, sind bei den Tieren dieser Gruppe die Gewebe und Organe histopathologisch zu untersuchen, bei denen in den Behandlungsgruppen Wirkungen aufgetreten sind.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Daten**

50. Es sollten Einzeldaten zur Verfügung gestellt werden. Darüber hinaus sollten alle Daten in Form einer Tabelle zusammengefasst werden, aus der für jede Prüfgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Zahl der Tiere bei Beginn der Prüfung und die Zahl der während der Prüfung tot aufgefundenen oder aus Tierschutzgründen getöteten Tiere, ferner der Zeitpunkt des Todes oder der Tötung, die Zahl der Tiere, die Toxizitätszeichen aufweisen, eine Beschreibung der beobachteten Toxizitätszeichen, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen erstmalig aufgetreten sind, ihrer Dauer und ihres Schweregrads, die Zahl der Tiere mit Läsionen, die Art der Läsionen und ihr Schweregrad sowie der Prozentsatz der von jeder Läsion betroffenen Tiere.

51. Wenn möglich, sollen die numerischen Ergebnisse mittels einer geeigneten und allgemein anerkannten statistischen Methode ausgewertet werden. Durch Vergleiche der Wirkungen in einem Dosisbereich sollte die Anwendung multipler t-Tests vermieden werden. Die Statistikmethoden sind bei der Planung der Studie festzulegen.

52. Für die Qualitätskontrolle wird vorgeschlagen, historische Kontrolldaten zu sammeln und Variationskoeffizienten für numerische Daten zu berechnen, insbesondere für die Parameter, die mit dem Nachweis der Störung des endokrinen Systems zusammenhängen. Diese Daten können für Vergleichszwecke verwendet werden, wenn tatsächliche Studien bewertet werden.

**Prüfbericht**

53. Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

*Prüfsubstanz:*

— physikalische Beschaffenheit, Reinheit und physikalisch-chemische Eigenschaften,

— Identifizierungsdaten.

*Vehikel (wenn verwendet):*

— Begründung der Wahl des Vehikels, sofern anders als Wasser.

*Versuchstiere:*

— Tierart/Stamm,

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere,

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.,

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn,

— Begründung für die Wahl einer anderen Art als der Ratte.

*Prüfbedingungen:*

— Begründung der gewählten Dosisstufen,

— Angaben zur Zubereitungsform der Prüfsubstanz/des Futters, der erreichten Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung,

▼**M4**

— Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz,

— gegebenenfalls Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag),

— Angaben zu Futter- und Wasserqualität.

*Untersuchte fakultative Endpunkte*

— Liste der untersuchten fakultativen Endpunkte.

*Ergebnisse:*

— Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts,

— gegebenenfalls Angaben zur Futter- und Wasseraufnahme,

— Daten der toxischen Reaktionen nach Geschlecht und Dosisstufe, einschließlich Toxizitätszeichen,

— Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität),

— Bewertung von sensorischer Aktivität, Greifkraft und motorischer Aktivität,

— hämatologische Parameter mit entsprechenden Ausgangswerten,

— klinisch-biochemische Parameter mit entsprechenden Ausgangswerten,

— Körpergewicht beim Töten der Tiere sowie Organgewichte,

— Sektionsbefunde,

— ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde,

— Angaben zur Resorption, falls vorliegend,

— statistische Auswertung der Ergebnisse, wenn möglich.

*Erörterung der Ergebnisse.*

*Schlussfolgerungen.*

▼**M4**

*Anlage 1*

DEFINITIONEN

**Androgene Wirkung:** die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches androgenes Hormon zu wirken (z. B. Testosteron).

**Antiandrogene Wirkung:** die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen androgenen Hormons (z. B. Testosteron) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

**Antiöstrogene Wirkung:** die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen östrogenen Hormons (z. B. Östradiol 17ß) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

**Antithyroide Wirkung:** die Fähigkeit einer Chemikalie, die Wirkung eines natürlichen Schilddrüsenhormons (z. B. $T_3$) in einem Säugetierorganismus zu unterdrücken.

**Dosierung:** ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, ihre Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung umfasst.

**Dosis:** die Menge der verabreichten Prüfsubstanz. Die Dosis wird ausgedrückt als Masse der Prüfsubstanz je Einheit Körpergewicht des Versuchstiers pro Tag (z. B. mg/kg Körpergewicht/Tag) oder als konstante Konzentration im Futter.

**Offensichtliche Toxizität:** ein allgemeiner Begriff zur Beschreibung deutlicher Toxizitätszeichen nach Verabreichung einer Prüfsubstanz. Diese Zeichen sollten für eine Bewertung der Gefährdung ausreichen und so schwerwiegend sein, dass bei einer Steigerung der verabreichten Dosis die Entwicklung schwerer Toxizitätszeichen und der wahrscheinliche Tod zu erwarten wären.

**NOAEL:** die Abkürzung für no observed adverse effect level. Dies ist die höchste Dosis, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

**Östrogene Wirkung:** die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches östrogenes Hormon zu wirken (z. B. Östradiol 17ß).

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

**Thyroide Wirkung:** die Fähigkeit einer Chemikalie, in einem Säugetierorganismus wie ein natürliches Schilddrüsenhormon (z. B. $T_3$) zu wirken.

**Validierung:** ein wissenschaftlicher Prozess zur Beschreibung der operationellen Anforderungen und Grenzen einer Prüfmethode und zum Nachweis ihrer Zuverlässigkeit und Eignung für einen bestimmten Zweck.

▼M4

*Anlage 2*

**Empfohlene Endpunkte für den Nachweis endokriner Disruptoren in dieser Prüfmethode b.7**

| Obligatorische Endpunkte | Fakultative Endpunkte |
|---|---|
| Gewicht | |
| — Hoden<br>— Nebenhoden<br>— Nebennieren<br>— Prostata und Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen | — Ovarien<br>— Uterus mit Zervix<br>— Schilddrüse |
| Histopathologie | |
| — Gonaden:<br>— Hoden und<br>— Ovarien<br>— akzessorische Geschlechtsorgane:<br>— Nebenhoden<br>— Prostata und Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen<br>— Uterus mit Zervix<br>— Nebenniere<br>— Schilddrüse<br>— Vagina | — Vaginalabstriche<br>— männliche Brustdrüsen<br>— Hypophyse |
| Hormonbestimmung | |
| | — $T_3$-, $T_4$-Spiegel im Blut<br>— TSH-Spiegel im Blut |

*LITERATUR:*


1. OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

2. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60

3. Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rates. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

4. Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

5. Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

6. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rates and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼M4


7. Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

8. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11 March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

9. OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rates. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

10. OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

11. OECD (2012).Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.ht ml

12. OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

13. OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

14. OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

15. Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

16. Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

17. Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

18. OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

19. OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

## B.8 PRÜFUNG AUF SUBAKUTE TOXIZITÄT NACH INHALATION — 28-TAGE-TEST

ZUSAMMENFASSUNG

Diese überarbeitete Prüfmethode B.8 wurde entwickelt, um die Toxizität der Prüfsubstanz nach wiederholter Exposition durch Inhalation über einen begrenzten Zeitraum (28 Tage) umfassend zu beschreiben und um Daten für die Bewertung des quantitativen Inhalationsrisikos zu gewinnen. Gruppen von mindestens fünf männlichen und fünf weiblichen Nagern werden über einen Zeitraum von 28 Tagen 6 Stunden am Tag a) der Prüfsubstanz in drei oder mehr Konzentrationsstufen, b) gefilterter Luft (negative Kontrolle) und/oder c) dem Vehikel (Vehikelkontrolle) ausgesetzt. Im Allgemeinen werden die Tiere der Prüfsubstanz an fünf Tagen pro Woche ausgesetzt, aber auch sieben Tage pro Woche sind zulässig. Es werden immer männliche und weibliche Tiere geprüft, aber sie können unterschiedlichen Konzentrationsstufen ausgesetzt werden, wenn bekannt ist, dass ein Geschlecht empfindlicher auf eine bestimmte Prüfsubstanz reagiert als das andere. Bei dieser Methode hat der Studienleiter die Möglichkeit, Satellitengruppen (Reversibilitätsprüfung) aufzunehmen sowie eine bronchoalveoläre Lavage (BAL), neurologische Tests, zusätzliche klinische Pathologieuntersuchungen und histopathologische Untersuchungen durchzuführen, um die Toxizität einer Prüfsubstanz besser beschreiben zu können.

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 412 (2009). Die ursprüngliche Prüfrichtlinie 412 (TG 412) zur subakuten Inhalation wurde 1981 angenommen (1). Diese Prüfmethode B.8 (die der überarbeiteten TG 412 entspricht) wurde aktualisiert, um dem neuesten Stand der Wissenschaft Rechnung zu tragen und derzeitige und künftige Regulierungsanforderungen zu erfüllen.

2. Die Methode ermöglicht die Beschreibung der schädlichen Wirkungen nach wiederholter täglicher inhalativer Exposition gegen eine Prüfsubstanz für einen Zeitraum von 28 Tagen. Die in Prüfungen auf subakute Toxizität nach Inhalation über 28 Tage gewonnenen Daten können für quantitative Risikobewertungen verwendet werden [wenn im Anschluss keine Prüfung auf subchronische Toxizität nach Inhalation über 90 Tage erfolgt (Kapitel B.29 dieses Anhangs)]. Die Daten können auch Informationen für die Wahl der Konzentrationen für längerfristige Studien wie die Prüfung auf subchronische Toxizität nach Inhalation über 90 Tage liefern. Diese Prüfmethode ist nicht speziell für die Prüfung von Nanomaterialien bestimmt. Die im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe werden am Ende dieses Kapitels und im Guidance Document 39 (2) definiert.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

3. Um die Qualität der Studie zu verbessern und möglichst wenig Versuchstiere zu verwenden, sollte das Prüflabor vor Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz berücksichtigen. Für die Auswahl der am besten geeigneten Prüfkonzentrationen könnten u. a. Informationen wie die Identität, die chemische Struktur und die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, Ergebnisse jeglicher In-vitro- oder In-vivo-Toxizitätsprüfungen, vorgesehene Verwendungen und die Möglichkeit der Exposition des Menschen, (Q)SAR-Daten und toxikologische Daten über strukturverwandte Substanzen sowie Daten aus Versuchen zur Prüfung der akuten Toxizität nach Inhalation herangezogen werden. Falls Neurotoxizität erwartet oder im Verlauf der Studie beobachtet wird, kann der Studienleiter beschließen, geeignete Untersuchungen wie eine FOB (functional observational battery) und die Messung der motorischen Aktivität aufzunehmen. Obwohl die Expositionszeit bei bestimmten Untersuchungen ein kritischer Aspekt sein kann, darf die Durchführung dieser zusätzlichen Versuche die Auslegung der Hauptstudie nicht beeinträchtigen.

▼M4

4. Verdünnungen ätzender oder reizender Prüfsubstanzen können in Konzentrationen geprüft werden, die den gewünschten Toxizitätsgrad erzielen [siehe GD 39 (2)]. Wenn Versuchstiere diesen Stoffen ausgesetzt werden, sollten die Zielkonzentrationen so niedrig sein, dass sie keine starken Schmerzen oder Leiden verursachen; sie sollten aber ausreichen, um die Konzentrations-Wirkungs-Kurve so zu erweitern, dass das regulatorische und wissenschaftliche Ziel der Prüfung erreicht wird. Diese Konzentrationen sollten von Fall zu Fall festgelegt werden, möglichst auf Basis einer entsprechend ausgelegten Dosisfindungsstudie, die Informationen über den kritischen Endpunkt, eine etwaige Reizschwelle und den Zeitpunkt des Einsetzens der Wirkung liefert (siehe Nummern 11, 12 und 13). Die Wahl der Konzentration ist zu begründen.

5. Moribunde Tiere oder Tiere, die Anzeichen starker und andauernder Qualen zeigen, sollten tierschutzgerecht getötet werden. Moribunde Tiere werden auf die gleiche Weise gewertet wie während des Tests gestorbene Tiere. Kriterien für die Entscheidung, moribunde oder schwer leidende Tiere zu töten, sowie Hinweise zur Erkennung des absehbaren oder bevorstehenden Todes sind Gegenstand des OECD Guidance Document on Humane Endpoints (3).

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Auswahl von Versuchstierarten**

6. Es sind junge, gesunde, adulte Nagetiere aus üblicherweise eingesetzten Laborstämmen zu verwenden. Bevorzugtes Versuchstier ist die Ratte. Wird eine andere Tierart eingesetzt, ist dies zu begründen.

**Vorbereitung der Tiere**

7. Die weiblichen Tiere dürfen weder bereits geworfen haben noch momentan trächtig sein. Am Tag der Randomisierung sollten die jungen, adulten Tiere 7 bis 9 Wochen alt sein; ihr Körpergewicht sollte innerhalb von ± 20 % des mittleren Gewichts für jedes Geschlecht liegen. Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zur individuellen Identifizierung markiert und vor Beginn der Prüfung für einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen gewöhnt.

**Tierhaltung**

8. Um die Beobachtungen zu erleichtern und Verwechslungen auszuschließen, sollten die Tiere möglichst mit einem subkutanen Transponder einzeln gekennzeichnet werden. Die Temperatur in dem Raum, in dem die Versuchstiere gehalten werden, sollte 22 ± 3 °C betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte im Idealfall im Bereich zwischen 30 und 70 % liegen; bei Verwendung von Wasser als Vehikel könnte dies jedoch unmöglich sein. Die Tiere sollten vor und nach den Expositionen im Allgemeinen nach Geschlecht und Konzentration in Käfigen gruppiert werden, wobei aber die Anzahl der Tiere pro Käfig noch eine genaue Beobachtung der einzelnen Tiere ermöglichen muss und Verluste aufgrund von Kannibalismus oder Kämpfen minimiert werden sollten. Wenn die Tiere der Prüfsubstanz nur mit der Nase ausgesetzt werden sollen, müssen sie möglicherweise an die Restrainer gewöhnt werden. Die Restrainer sollten die Tiere weder körperlich noch in Bezug auf Wärme oder Fixierung übermäßig beeinträchtigen. Die Fixierung kann physiologische Endpunkte wie Körpertemperatur (Hyperthermie) und/oder das Atemminutenvolumen beeinflussen. Wenn generische Daten zeigen, dass keine derartigen Veränderungen in nennenswertem Ausmaß vorkommen, ist eine Eingewöhnung an die Restrainer nicht erforderlich. Bei der Ganzkörperexposition gegen ein Aerosol sollten die Tiere während der Exposition einzeln untergebracht sein, damit sie die Prüfsubstanz nicht durch das Fell ihrer Käfiggenossen filtriert einatmen. Außer während der Exposition kann herkömmliches und zertifiziertes Labortierfutter bei uneingeschränkter Versorgung mit Trinkwasser verwendet werden. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln.

▼M4

**Inhalationskammern**

9. Bei der Auswahl einer Inhalationskammer sind die Art der Prüfsubstanz und der Gegenstand der Prüfung zu berücksichtigen. Das bevorzugte Verfahren ist die „Nose-only"-Exposition (dieser Begriff umfasst „nur Kopf", „nur Nase" oder „nur Schnauze"). Für die Untersuchung von Flüssigkeits- oder Feststoffaerosolen und für Dämpfe, die zu Aerosolen kondensieren können, wird im Allgemeinen die „Nose-only"-Exposition bevorzugt. Besondere Ziele der Untersuchung können möglicherweise mit einer Ganzkörperexposition besser erreicht werden, doch dies sollte im Prüfbericht begründet werden. Um bei Verwendung einer Ganzkörperkammer die Stabilität der Atmosphäre sicherzustellen, sollte das „Gesamtvolumen" der Versuchstiere 5 % des Volumens der Kammer nicht übersteigen. Die Grundzüge der „Nose-only"- und der Ganzkörperexposition sowie ihre jeweiligen Vor- und Nachteile sind in GD 39 (2) beschrieben.

TOXIZITÄTSSTUDIEN

**Grenzkonzentrationen**

10. Anders als bei Studien zur akuten Toxizität gibt es bei Prüfungen auf subakute Toxizität nach Inhalation über 28 Tage keine festgelegten Grenzkonzentrationen. Bei der Festlegung der maximalen Prüfkonzentration ist Folgendes zu beachten: 1) die höchste erreichbare Konzentration, 2) das maximale Expositionsniveau von Menschen (‚worst case), 3) die Notwendigkeit, eine ausreichende Sauerstoffversorgung aufrechtzuerhalten, und/oder 4) Tierschutzerwägungen. Gibt es keine auf Daten basierenden Grenzwerte, können die akuten Grenzwerte der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (13) zugrunde gelegt werden (d. h. bis zu einer Höchstkonzentration von 5 mg/l bei Aerosolen, 20 mg/l bei Dämpfen und 20 000 ppm bei Gasen); siehe GD 39 (2). Wenn diese Grenzen bei der Prüfung von Gasen oder hochflüchtigen Prüfsubstanzen (z. B. Kältemitteln) überschritten werden müssen, ist dies zu begründen. Die Grenzkonzentration muss eine eindeutige Toxizität hervorrufen, ohne den Tieren übermäßigen Stress zu bereiten oder ihre Lebensdauer zu beeinträchtigen (3).

**Dosisfindungsstudie**

11. Vor Beginn der Hauptstudie muss möglicherweise eine Dosisfindungsstudie durchgeführt werden. Diese ist umfassender als eine Vorstudie, weil sie nicht auf die Wahl der Konzentration begrenzt ist. Die in einer Dosisfindungsstudie gewonnenen Erkenntnisse können zu einer erfolgreichen Hauptstudie führen. Sie kann z. B. technische Informationen zu den Analysemethoden, zur Partikelgröße, zur Erkennung toxischer Mechanismen, klinische Pathologiedaten und histopathologische Daten sowie Schätzungen möglicher NOAEL- und MTC-Konzentrationen in einer Hauptstudie liefern. Der Studienleiter kann entscheiden, mithilfe der Dosisfindungsstudie die Schwelle für die Reizung der Atemwege (z. B. durch histopathologische Untersuchung der Atemwege, Lungenfunktionsprüfung oder bronchoalveoläre Lavage), die höchste Konzentration, die von den Tieren ohne übermäßigen Stress toleriert wird, und die Parameter, die die Toxizität der Prüfsubstanz am besten beschreiben, zu identifizieren.

12. Eine Dosisfindungsstudie kann eine oder mehrere Konzentrationsstufen umfassen. Auf jeder Konzentrationsstufe sollten höchstens drei männliche und drei weibliche Tiere der Prüfsubstanz ausgesetzt werden. Eine Dosisfindungsstudie sollte mindestens fünf Tage und im Allgemeinen nicht mehr als 14 Tage dauern. Die Wahl der Konzentrationen für die Hauptstudie ist im Prüfbericht zu begründen. Ziel der Hauptstudie ist es, nachzuweisen, dass eine Beziehung zwischen der Konzentration und der Wirkung besteht, die am voraussichtlich empfindlichsten Endpunkt auftritt. Die niedrigste Konzentration sollte im Idealfall eine Konzentration sein, bei der keine zu beobachtenden schädlichen Wirkungen auftreten, und die höchste Konzentration sollte eine eindeutige Toxizität hervorrufen, ohne den Tieren übermäßigen Stress zu bereiten oder ihre Lebensdauer zu beeinträchtigen (3).

▼M4

13. Bei der Auswahl der Konzentrationsstufen für die Dosisfindungsstudie sollten alle verfügbaren Informationen berücksichtigt werden, einschließlich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen und der Daten über ähnliche Stoffe (siehe Nummer 3). Eine Dosisfindungsstudie kann bestätigen/widerlegen, welche Endpunkte nach mechanistischen Kriterien als die empfindlichsten Endpunkte angesehen werden, z. B. die Cholinesterasehemmung durch Organophosphate, die Methämoglobinbildung durch für Erythrozyten toxische Stoffe, Schilddrüsenhormone ($T_3$, $T_4$) im Fall von thyrotoxischen Stoffen, Proteine, LDH oder Neutrophile in bronchoalveolärer Lavage im Fall schwach löslicher unschädlicher Partikel oder lungenreizender Aerosole.

**Hauptstudie**

14. Die Hauptstudie zur Prüfung auf subakute Toxizität umfasst im Allgemeinen drei Konzentrationsstufen sowie, falls erforderlich, eine gleichzeitige negative (Luft-)Kontrolle und/oder eine Vehikelkontrolle (siehe Nummer 17). Die Festlegung der geeigneten Expositionsstufen sollte sich auf alle verfügbaren Daten stützen, einschließlich der Ergebnisse systemischer Toxizitätsprüfungen, des Metabolismus und der Kinetik (hohe Konzentrationsstufen, die kinetische Prozesse sättigen, sind zu vermeiden). Jede Prüfgruppe umfasst mindestens zehn Nagetiere (fünf Männchen und fünf Weibchen), die der Prüfsubstanz für einen Zeitraum von 4 Wochen an fünf Tagen in der Woche jeweils 6 Stunden pro Tag ausgesetzt werden (Gesamtdauer der Prüfung 28 Tage). Die Tiere können auch an sieben Tagen in der Woche exponiert werden (z. B. wenn inhalierte Arzneimittel geprüft werden). Ist bekannt, dass ein Geschlecht empfindlicher auf eine bestimmte Prüfsubstanz reagiert, können die Geschlechter unterschiedlichen Konzentrationsstufen ausgesetzt werden, um die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung genauer zu bestimmen (siehe Nummer 15). Wenn für eine „Nose-only"-Exposition andere Nagetierarten als Ratten verwendet werden, kann die maximale Expositionsdauer angepasst werden, um artenspezifisches Leiden zu minimieren. Eine Expositionsdauer von weniger als 6 Stunden/Tag oder die Notwendigkeit einer Ganzkörperexpositionsstudie mit Langzeitexposition (z. B. 22 Stunden/Tag) ist zu begründen [siehe GD 39 (2)]. Während der Exposition sollte kein Futter verabreicht werden, es sei denn die Exposition dauert länger als 6 Stunden. Wasser kann während einer Ganzkörperexposition jederzeit angeboten werden.

15. Die gewählten Zielkonzentrationen sollen es ermöglichen, die Zielorgane zu identifizieren und eine deutliche Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zu belegen:

— Die hohe Konzentrationsstufe sollte toxische Wirkungen hervorrufen, aber keine anhaltenden Symptome oder Todesfälle verursachen, die eine Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigen würden.

— Der Abstand zwischen den mittleren Konzentrationsstufen muss eine Abstufung der toxischen Wirkungen zwischen der niedrigen und der hohen Konzentration ermöglichen.

— Die untere Konzentrationsstufe sollte praktisch keine Toxizitätszeichen hervorrufen.

**Satellitenstudie (Reversibilität)**

16. Es kann eine Satellitenstudie durchgeführt werden, um die Tiere für einen angemessenen Zeitraum nach der Behandlung (mindestens 14 Tage) auf Reversibilität, Persistenz oder ein verzögertes Auftreten von Toxizität zu beobachten. Satellitengruppen bestehen aus fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren, die der Prüfsubstanz gleichzeitig mit den Versuchstieren der Hauptstudie ausgesetzt werden. Dabei sollten sie der Prüfsubstanz auf der höchsten Konzentrationsstufe ausgesetzt werden; erforderlichenfalls sollte es auch gleichzeitige Luft- und/oder Vehikelkontrollen geben (siehe Nummer 17).

▼M4

**Kontrolltiere**

17. Eine gleichzeitige negative (Luft-)Kontrollgruppe ist genauso zu behandeln wie die Prüfgruppe, außer dass die Tiere nicht der Prüfsubstanz, sondern gefilterter Luft ausgesetzt werden. Wenn die Prüfatmosphäre mithilfe von Wasser oder einem anderen Stoff erzeugt wird, ist statt der negativen (Luft-)Kontrollgruppe eine Vehikelkontrollgruppe zu verwenden. Wenn möglich sollte Wasser als Vehikel benutzt werden. In diesem Fall sind die Tiere Luft mit derselben relativen Luftfeuchtigkeit auszusetzen wie die exponierten Gruppen. Das geeignete Vehikel ist auf der Grundlage einer geeigneten Vorstudie oder von historischen Daten auszuwählen. Ist die Toxizität eines Vehikels unklar, kann der Studienleiter beschließen, sowohl eine negative (Luft-)Kontrolle als auch eine Vehikelkontrolle zu verwenden; hiervon wird jedoch dringend abgeraten. Wenn historische Daten belegen, dass ein Vehikel nicht toxisch ist, besteht keine Notwendigkeit für eine negative (Luft-)Kontrollgruppe und es sollte nur eine Vehikelgruppe verwendet werden. Ergibt eine Vorstudie einer in einem Vehikel formulierten Prüfsubstanz, dass keine Toxizität vorliegt, ist das Vehikel folglich in der geprüften Konzentration nicht toxisch, und diese Vehikelkontrolle sollte verwendet werden.

EXPOSITIONSBEDINGUNGEN

**Verabreichung der Konzentrationen**

18. Die Tiere werden der Prüfsubstanz in Form von Gas, Dampf, Aerosol oder einer Kombination dieser Formen ausgesetzt. Der zu prüfende Aggregatzustand hängt von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, der gewählten Konzentration und/oder der physikalischen Form ab, in der die Prüfsubstanz bei der Handhabung und Verwendung am wahrscheinlichsten vorliegt. Hygroskopische und chemisch reaktive Prüfsubstanzen sollten bei geringer Luftfeuchtigkeit geprüft werden. Dabei ist darauf zu achten, dass keine explosionsfähigen Konzentrationen erzeugt werden. Bei Partikeln kann die Partikelgröße durch mechanische Prozesse verringert werden. GD 39 (2) enthält nähere Hinweise.

**Partikelgrößenverteilung**

19. Bei allen Aerosolen und bei Dämpfen, die zu Aerosolen kondensieren können, sollte die Partikelgröße bestimmt werden. Damit alle relevanten Regionen der Atemwege der Prüfsubstanz ausgesetzt werden, werden mittlere aerodynamische Massendurchmesser (Mass Median Aerodynamic Diameter — MMAD) von 1 bis 3 μm mit einer geometrischen Standardabweichung ($\sigma_g$) von 1,5 bis 3,0 empfohlen (4). Wenngleich nach Möglichkeit versucht werden sollte, diese Werte zu erreichen, ist Fachwissen erforderlich, falls sie nicht erzielt werden können. Metalldampfpartikel können z. B. unter diesen Werten liegen, geladene Partikel und Fasern dagegen können diese Werte überschreiten.

**Vorbereitung der Prüfsubstanz in einem Vehikel**

20. Im Idealfall sollte die Prüfsubstanz ohne ein Vehikel geprüft werden. Wenn für die Erzeugung einer geeigneten Prüfsubstanzkonzentration oder Partikelgröße ein Vehikel verwendet werden muss, ist Wasser zu bevorzugen. Wird eine Prüfsubstanz in einem Vehikel gelöst, so ist seine Stabilität nachzuweisen.

ÜBERWACHUNG DER EXPOSITIONSBEDINGUNGEN

**Luftstrom in der Inhalationskammer**

21. Der Luftstrom durch die Kammer sollte während jeder Exposition sorgfältig geregelt, kontinuierlich überwacht und mindestens stündlich protokolliert werden. Die Echtzeit-Überwachung der Konzentration (oder zeitliche Stabilität) der Prüfatmosphäre ist eine integrale Messung aller dynamischen Parameter und gibt indirekt die Möglichkeit, alle relevanten dynamischen Inhalationsparameter zu messen. Wenn die Konzentration in Echtzeit

▼M4

überwacht wird, kann die Frequenz der Messung der Luftströme auf eine einzige Messung je Exposition und Tag reduziert werden. Es sollte besonders darauf geachtet werden, das erneute Einatmen in „Nose-only"-Expositionskammern zu vermeiden. Die Sauerstoffkonzentration sollte mindestens 19 % betragen, und die Kohlendioxidkonzentration sollte 1 % nicht überschreiten. Gibt es Grund zu der Annahme, dass diese Werte nicht eingehalten werden können, sind die Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen zu messen. Wenn die Messungen am ersten Expositionstag die richtigen Werte dieser Gase bestätigen, sollten keine weiteren Messungen erforderlich sein.

**Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit in der Inhalationskammer**

22. Die Temperatur in der Inhalationskammer sollte 22 ± 3 °C betragen. Sowohl bei der „Nose-only"- als auch bei der Ganzkörperexposition sollte die relative Luftfeuchtigkeit im Atembereich der Tiere kontinuierlich überwacht und während jeder Exposition möglichst stündlich dokumentiert werden. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte möglichst zwischen 30 und 70 % liegen, was jedoch möglicherweise nicht erreichbar ist (z. B. bei der Prüfung von wasserbasierten Mischungen) oder wegen chemischer Interferenz mit der Prüfmethode nicht gemessen werden kann.

**Prüfsubstanz: nominale Konzentration**

23. Die nominale Konzentration in der Expositionskammer sollte möglichst berechnet und protokolliert werden. Die nominale Konzentration ist die Masse der erzeugten Prüfsubstanz dividiert durch das Gesamtvolumen der durch die Inhalationskammer geleiteten Luft. Sie wird nicht zur Beschreibung der Exposition der Tiere verwendet; vielmehr gibt ein Vergleich der nominalen Konzentration und der tatsächlichen Konzentration Aufschluss über die Effizienz des Prüfsystems bei der Erzeugung der Prüfkonzentration und kann daher für die Aufdeckung von Problemen bei dieser Erzeugung verwendet werden.

**Prüfsubstanz: tatsächliche Konzentration**

24. Die tatsächliche Konzentration ist die Konzentration der Prüfsubstanz im Atembereich der Tiere in einer Inhalationskammer. Die tatsächlichen Konzentrationen können entweder durch spezifische Methoden (z. B. direkte Probenahme, adsorptive Methoden oder chemische Reaktionsverfahren mit anschließender analytischer Charakterisierung) oder durch unspezifische Methoden wie Gravimetrie bestimmt werden. Die gravimetrische Methode ist lediglich für Aerosole mit nur einem Bestandteil in Pulverform oder Aerosole von Flüssigkeiten mit geringer Flüchtigkeit akzeptabel und sollte sich auf geeignete, vor der Studie zu erstellende und für die Prüfsubstanz spezifische Beschreibungen stützen. Die Konzentration von Aerosolen mit mehreren Bestandteilen in Pulverform kann ebenfalls gravimetrisch bestimmt werden. Hierzu muss jedoch mit Analysedaten belegt werden, dass die Schwebstoffe eine ähnliche Zusammensetzung haben wie das Ausgangsmaterial. Liegen diese Angaben nicht vor, muss die Prüfsubstanz (im Idealfall im Schwebezustand) möglicherweise im Verlauf der Studie in regelmäßigen Abständen neu analysiert werden. Bei aerosolisierten Agenzien, die verdunsten oder sublimieren können, sollte gezeigt werden, dass alle Phasen von der gewählten Methode erfasst wurden.

25. Für die gesamte Dauer der Studie sollte möglichst eine Partie der Prüfsubstanz verwendet werden; die Probe sollte unter Bedingungen aufbewahrt werden, die ihre Reinheit, Homogenität und Stabilität gewährleisten. Die Prüfsubstanz sollte vor Beginn der Studie mit Angaben zur Reinheit und, falls technisch machbar, zur Identität sowie zu den Mengen identifizierter Schadstoffe und Verunreinigungen beschrieben werden. Hierzu können unter anderem die folgenden Daten verwendet werden: Retentionszeit und relative Peakfläche, durch Massenspektrometrie oder Gaschromatographie bestimmtes Molekulargewicht oder andere Werte. Das Prüflabor ist zwar nicht für die Identität der Probe verantwortlich, doch es kann ratsam sein, dass es die Beschreibung des Auftraggebers zumindest in gewissen Grenzen (z. B. Farbe, physikalische Beschaffenheit usw.) überprüft.

▼M4

26. Die Expositionsatmosphäre ist so konstant wie möglich zu halten. Um die Stabilität der Expositionsbedingungen nachzuweisen, kann ein Echtzeitüberwachungsgerät verwendet werden, z. B. ein Aerosol-Photometer für Aerosole oder ein Gesamtkohlenwasserstoff-Analysator (THC) für Dämpfe. Die tatsächliche Konzentration in der Kammer sollte an jedem Expositionstag für jede Expositionsstufe mindestens dreimal gemessen werden. Falls dies wegen geringer Luftdurchflussraten oder niedriger Konzentrationen nicht möglich ist, reicht eine Probe je Expositionsperiode. Im Idealfall sollte diese Probe dann über die gesamte Expositionszeit gewonnen werden. Die einzelnen Proben der Konzentration in der Kammer sollten bei Gasen und Dämpfen nicht mehr als ± 10 % und bei Flüssig- oder Feststoffaerosolen nicht mehr als ± 20 % von der mittleren Kammerkonzentration abweichen. Die Zeit bis zum Erreichen eines Gleichgewichts in der Kammer ($t_{95}$) ist zu berechnen und zu dokumentieren. Die Expositionsdauer erstreckt sich über den Zeitraum, in dem die Prüfsubstanz erzeugt wird. Dies schließt die Zeiten zur Erreichung des Gleichgewichts in der Kammer ($t_{95}$) und zum Abbau der Konzentrationen ein. GD 39 (2) enthält Hinweise zur Einschätzung von $t_{95}$.

27. Bei sehr komplexen Mischungen aus Gasen/Dämpfen und Aerosolen (z. B. Verbrennungsatmosphären und Prüfsubstanzen, die aus hierzu bestimmten Endverbraucherprodukten/-geräten gesprüht werden) kann sich jede Phase in einer Inhalationskammer anders verhalten. Daher sollte mindestens eine Indikatorsubstanz (Analyt), normalerweise der wichtigste Wirkstoff in der Mischung, von jeder Phase (Gas/Dampf und Aerosol) ausgewählt werden. Wenn die Prüfsubstanz eine Mischung ist, sollte die Analysekonzentration für die gesamte Mischung und nicht nur für den Wirkstoff oder die Indikatorsubstanz (Analyt) dokumentiert werden. Weitere Informationen zu tatsächlichen Konzentrationen sind in GD 39 (2) zu finden.

**Prüfsubstanz: Partikelgrößenverteilung**

28. Die Partikelgrößenverteilung von Aerosolen sollte auf jeder Konzentrationsstufe mindestens wöchentlich mit einem Kaskaden-Impaktor oder einem anderen Messgerät wie einem APS bestimmt werden. Kann nachgewiesen werden, dass die mit einem Kaskaden-Impaktor und dem alternativen Messgerät erzielten Ergebnisse gleichwertig sind, so kann das alternative Instrument während der gesamten Studie verwendet werden.

29. Parallel zum Hauptinstrument ist ein zweites Gerät wie ein Gravimetriefilter oder eine Gaswaschflasche zu verwenden, um den Abscheidegrad des Hauptinstruments zu bestätigen. Die durch die Partikelgrößenanalyse bestimmte Massenkonzentration sollte innerhalb vertretbarer Grenzen um die durch die Filteranalyse bestimmte Massenkonzentration liegen [siehe GD 39 (2)]. Wenn die Gleichwertigkeit bei allen geprüften Konzentrationen zu Beginn der Studie nachgewiesen werden kann, kann auf weitere bestätigende Messungen verzichtet werden. Aus Tierschutzgründen sollten Vorkehrungen getroffen werden, um unklare Daten zu minimieren, die dazu führen könnten, dass eine Studie wiederholt werden muss.

30. Wenn die Möglichkeit besteht, dass Dampfkondensation zur Bildung eines Aerosols führen kann, oder wenn in einer Dampfatmosphäre mit dem Potenzial für gemischte Phasen Partikel nachgewiesen werden, sollte eine Partikelgrößenbestimmung für Dämpfe vorgenommen werden.

BEOBACHTUNGEN

31. Die Tiere sollten vor, während und nach der Exposition auf klinische Zeichen beobachtet werden. Je nach Reaktion der Tiere während der Exposition können häufigere Beobachtungen angezeigt sein. Wenn die Beobachtung der Tiere durch die Verwendung von Restrainern, wegen schlecht beleuchteter Ganzkörperkammern oder getrübter Atmosphäre erschwert ist, sind die Tiere nach der Exposition sorgfältig zu beobachten. Durch Beobachtungen vor der Exposition am folgenden Tag kann beurteilt werden, ob toxische Wirkungen sich zurückgebildet oder verschlimmert haben.

▼M4

32. Sämtliche Beobachtungen werden in Einzelprotokollen dokumentiert, die für jedes Tier geführt werden. Wenn Tiere aus humanen Gründen getötet werden oder ihr Tod festgestellt wird, sollte der Todeszeitpunkt so genau wie möglich registriert werden.

33. Die Beobachtungen der Tiere sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des Nervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Besonderes Augenmerk ist auf Tremor, Konvulsionen, Salivation, Diarrhö, Lethargie, Schlaf und Koma zu richten. Die Messung der Rektaltemperatur kann zusätzliche Belege für mit der Behandlung oder Unterbringung zusammenhängende Reflex-Bradypnoe oder Hypo-/Hyperthermie liefern. Darüber hinaus können zusätzliche Aspekte wie Kinetik, Biomonitoring, Lungenfunktion, Retention schlecht löslicher Stoffe, die im Lungengewebe akkumulieren, und Verhaltensstörungen in das Studienprotokoll aufgenommen werden.

KÖRPERGEWICHT

34. Das Körpergewicht der einzelnen Tiere sollte kurz vor der ersten Exposition (Tag 0), danach zweimal wöchentlich (z. B. freitags und montags, um die Erholung während eines expositionsfreien Wochenendes nachzuweisen, oder in einem Zeitintervall, das die Beurteilung der systemischen Toxizität ermöglicht) und zum Zeitpunkt des Todes oder der Tötung dokumentiert werden. Treten in den ersten zwei Wochen keine Wirkungen auf, kann das Körpergewicht während der restlichen Studiendauer wöchentlich gemessen werden. Satellitentiere (Reversibilitätsprüfung) (falls verwendet) sollten während der gesamten Erholungsphase weiterhin wöchentlich gewogen werden. Am Ende der Studie sollten alle Tiere kurz vor der Tötung gewogen werden, um eine objektive Berechnung der Organ-Körpergewicht-Verhältnisse zu ermöglichen.

FUTTER- UND WASSERAUFNAHME

35. Die Futteraufnahme sollte wöchentlich gemessen werden. Auch die Wasseraufnahme kann gemessen werden.

KLINISCHE PATHOLOGIE

36. An allen Tieren, auch an Kontroll- und Satellitentieren (Reversibilitätprüfung), sollten klinische Pathologieuntersuchungen durchgeführt werden, wenn sie getötet werden. Der Zeitraum zwischen dem Ende der Exposition und der Blutentnahme ist zu protokollieren, insbesondere wenn der betreffende Endpunkt rasch zu seinem ursprünglichen Wert zurückkehrt. Für Parameter mit einer kurzen Plasmahalbwertszeit (z. B. COHb, CHE und MetHb) ist die Probenahme nach Ende der Exposition angezeigt.

37. In Tabelle 1 sind die im Allgemeinen für alle Toxikologiestudien erforderlichen klinischen Pathologieparameter aufgeführt. In der Regel ist eine Urinanalyse nicht notwendig, kann aber durchgeführt werden, wenn sie wegen erwarteter oder festgestellter Toxizität für nützlich gehalten wird. Der Studienleiter kann beschließen, zusätzliche Parameter zu bestimmen, um die Toxizität einer Prüfsubstanz genauer zu beschreiben (z. B. Cholinesterase, Lipide, Hormone, Säure-Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin oder Heinz-Körper, Creatin-Kinase, Verhältnis von myeloiden zu erythroiden Zellen, Troponin, arterielle Blutgase, Lactatdehydrogenase, Sorbitdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase und γ-Glutamyltranspeptidase).

▼M4

*Tabelle 1*

**Klinische Standardpathologieparameter**

| Hämatologische Untersuchung | |
|---|---|
| Erythrozytenzahl | Gesamtleukozytenzahl |
| Hämatokrit | Differentialleukozytenzahl |
| Hämoglobinkonzentration | Thrombozytenzahl |
| Mittleres korpuskuläres Hämoglobin | Gerinnungsfähigkeit (einen Wert wählen): |
| Mittleres Erythrozyteneinzelvolumen | — Prothrombinzeit |
| Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration | — Blutgerinnungszeit |
| Retikulozyten | — Partielle Thromboplastinzeit |
| **Klinische Chemie** | |
| Glucose (*) | Alanin-Aminotransferase |
| Gesamtcholesterin | Aspartat-Aminotransferase |
| Triglyceride | Alkalische Phosphatase |
| Harnstoff-N | Kalium |
| Gesamtbilirubin | Natrium |
| Kreatinin | Calcium |
| Gesamtprotein | Phosphor |
| Albumin | Chlorid |
| Globulin | |
| **Urinuntersuchung (fakultativ)** | |
| Aussehen (Farbe und Trübung) | Gesamtprotein |
| Menge | Glucose |
| Spezifisches Gewicht oder Osmolarität | Blut/Blutzellen |
| pH-Wert | |

(*) Da ein längerer Futterentzug die Glucosemessungen bei den behandelten gegenüber den Kontrolltieren verzerren kann, sollte der Studienleiter entscheiden, ob eine Futterkarenz angezeigt ist. Die Dauer des Futterentzugs muss auf die verwendete Art abgestimmt sein; bei der Ratte kann sie 16 Stunden betragen (nächtliche Futterkarenz). Der Nüchternglucosewert kann nach nächtlicher Futterkarenz in der letzten Expositionswoche oder nach nächtlicher Futterkarenz vor der Nekropsie (in letzterem Fall zusammen mit allen anderen klinischen Pathologieparametern) bestimmt werden.

38. Gibt es Anhaltspunkte dafür, dass die unteren Atemwege (d. h. die Alveolen) die Hauptablagerungs- und Retentionsorte sind, kann die bronchoalveoläre Lavage (BAL) die Methode der Wahl sein, um hypothesenbasierte Dosis-Wirkungs-Parameter quantitativ zu analysieren, wobei Alveolitis, Lungenentzündung und Phospholipidose im Vordergrund stehen. Auf diese Weise können Veränderungen der Dosis-Wirkungs-Beziehung und des zeitlichen Verlaufs alveolärer Läsionen angemessen untersucht werden. Die BAL-Flüssigkeit kann auf Gesamt- und Differenzialleukozytenzahl, Gesamtprotein und Laktatdehydrogenase analysiert werden. In Betracht gezogen werden können auch Parameter, die auf lysosomale Schäden, Phospholipidose, Fibrose und reizende oder allergische Entzündung hindeuten; dazu kann auch die Bestimmung entzündungsfördernder Zytokine/Chemokine gehören. BAL-Messungen dienen im Allgemeinen zur Ergänzung der Ergebnisse histopathologischer Untersuchungen, können sie aber nicht ersetzen. Eine Anleitung zur Durchführung der Lungenlavage ist in GD 39 (2) enthalten.

▼M4

MAKROSKOPISCHE PATHOLOGIE UND ORGANGEWICHTE

39. Alle Versuchstiere, einschließlich der Tiere, die während der Prüfung sterben oder aus Tierschutzgründen getötet und aus der Studie genommen werden, sind (falls möglich) vollständig zu entbluten und auf makroskopische Veränderungen zu untersuchen. Der Zeitabstand zwischen dem Ende der letzten Exposition eines Tiers und seiner Tötung ist zu dokumentieren. Kann die Nekropsie nicht unmittelbar nach Auffinden eines toten Tieres erfolgen, sollte der Körper auf eine Temperatur gekühlt (nicht eingefroren) werden, die tief genug ist, um die Autolyse zu minimieren. Die Nekropsie ist baldmöglichst, in der Regel innerhalb von einem oder zwei Tagen durchzuführen. Alle makroskopischen Veränderungen sollten für jedes Tier protokolliert werden, wobei besonders auf Veränderungen der Atemwege zu achten ist.

40. In Tabelle 2 sind die Organe und Gewebe aufgeführt, die bei der Nekropsie zur histopathologischen Untersuchung in einem geeigneten Medium aufbewahrt werden sollten. Die Aufbewahrung der in [Klammern] gesetzten Organe und Gewebe sowie aller sonstigen Organe und Gewebe liegt im Ermessen den Studienleiters. Die durch **Fettdruck** hervorgehobenen Organe sind so bald wie möglich nach der Sektion von anhaftendem Gewebe zu befreien und feucht zu wiegen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Schilddrüse und die Nebenhoden sind nur zu wiegen, wenn dies notwendig ist, da ihre Befreiung von anhaftendem Gewebe die histopathologische Bewertung erschweren kann. Gewebe und Organe sind unmittelbar nach der Nekropsie und je nach verwendetem Fixierungsmittel mindestens 24-48 Stunden vor der Befreiung von anhaftendem Gewebe in 10 %ig gepuffertem Formalin oder einem anderen geeigneten Fixierungsmittel zu fixieren.

*Tabelle 2*

**Bei der Nekropsie aufbewahrte Organe und Gewebe**

| | |
|---|---|
| **Nebennieren** | Samenbläschen |
| Knochenmark (und/oder frisches Aspirat) | Rückenmark (zervical, mittlerer Thoraxbereich und lumbar) |
| **Gehirn** (mit Schnitten von Cerebrum, Cerebellum und Medulla/Pons) | **Milz** |
| [Augen (Netzhaut, Sehnerv) und Lider] | Magen |
| **Herz** | **Hoden** |
| **Nieren** | **Thymus** |
| Larynx (3 Ebenen, 1 Ebene, die die Basis der Epiglottis enthält) | Schilddrüse |
| **Leber** | Trachea (mindestens 2 Ebenen mit einem Längsschnitt durch die Carina und 1 Querschnitt) |
| **Lunge** (alle Lungenlappen auf einer Ebene, einschließlich der Hauptbronchien) | [Harnblase] |
| Lymphknoten aus der Hilusregion der Lunge, insbesondere bei schlecht löslichen Prüfsubstanzen, die in Partikelform vorliegen. Für gründlichere Untersuchungen und/oder Studien mit immunologischem Schwerpunkt können zusätzliche Lymphknoten in Betracht gezogen werden, z. B. aus der mediastinalen, der cervicalen/submandibulären und/oder der aurikularen Region. | Uterus |
| | Alle makroskopischen Veränderungen |
| Nasopharyngeale Gewebe (mindestens 4 Ebenen; 1 Ebene muss den Nasen-Rachen-Gang und das Lymphgewebe des Nasen-Rachen-Raums (NALT) umfassen. | |
| Speiseröhre | |
| [Riechkolben] | |
| Ovarien | |

▼M4

41. Die Lungen sind in intaktem Zustand zu entfernen, zu wiegen und mit einem geeigneten Fixierungsmittel bei einem Druck von 20-30 cm Wasser zu behandeln, damit die Lungenstruktur erhalten bleibt (5). Die Schnitte werden bei allen Lungenlappen auf einer Ebene einschließlich der Hauptbronchien hergestellt; wenn eine Lungenlavage durchgeführt wird, ist der nicht gewaschene Lappen jedoch auf drei Ebenen zu schneiden (keine seriellen Schnitte).

42. Mindestens vier Ebenen der nasopharyngealen Gewebe sind zu untersuchen; eine der Ebenen sollte den Nasen-Rachen-Gang umfassen (5, 6, 7, 8, 9), damit das Plattenepithel, das (nicht Zilien-tragende respiratorische) Übergangsepithel, das (Zilien-tragende respiratorische) Flimmerepithel und das Riechepithel sowie das Lymphgewebe (NALT; 10,11) gründlich untersucht werden können. Drei Ebenen des Larynx sind zu untersuchen; eine dieser Ebenen sollte die Basis der Epiglottis enthalten (12). Mindestens zwei Ebenen der Trachea sind zu untersuchen, darunter ein Längsschnitt durch die Carina der Bifurkation der extrapulmonalen Bronchien und ein Querschnitt.

HISTOPATHOLOGIE

43. Die in Tabelle 2 aufgeführten Organe und Gewebe der Tiere in der Kontrollgruppe und der Gruppe mit der höchsten Konzentration und aller während der Studie gestorbenen oder getöteten Tiere sollten histopathologisch untersucht werden. Besonderes Augenmerk ist auf Atemwege, Zielorgane und makroskopische Veränderungen zu richten. Die Organe und Gewebe, die in der höchsten Konzentrationsgruppe makroskopische Veränderungen aufweisen, sollten in allen Gruppen untersucht werden. Der Studienleiter kann beschließen, histopathologische Untersuchungen bei zusätzlichen Gruppen durchzuführen, um eine eindeutige Konzentrationswirkung nachzuweisen. Umfasst eine Prüfung auch eine Satellitengruppe (Reversibilitätsprüfung), sind alle Gewebe und Organe histopathologisch zu untersuchen, bei denen in den Behandlungsgruppen Wirkungen aufgetreten sind. Treten in der Gruppe mit der höchsten Konzentration übermäßig viele frühzeitige Todesfälle oder andere Probleme auf, die die Signifikanz der Daten beeinträchtigen, so ist die Gruppe mit der nächstniedrigeren Konzentration histopathologisch zu untersuchen. Man sollte versuchen, die makroskopischen Befunde mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchung zu korrelieren.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Daten**

44. Körpergewichte, Futteraufnahme, Ergebnisse der klinischen Pathologie, makroskopische Befunde, Organgewichte und Ergebnisse der Histopathologie sind für die einzelnen Tiere anzugeben. Die Daten der klinischen Beobachtung sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Prüfgruppe die Anzahl der verwendeten Tiere, die Anzahl der Tiere mit spezifischen Toxizitätszeichen, die Anzahl der Tiere, die während der Prüfung tot aufgefunden oder vorzeitig getötet wurden, der Todeszeitpunkt der einzelnen Tiere, eine Beschreibung und der zeitliche Verlauf der toxischen Wirkungen und deren Reversibilität sowie die Sektionsbefunde ersichtlich sein. Sowohl die quantitativen als auch die gelegentlich erzielten Ergebnisse sind anhand eines geeigneten statistischen Verfahrens zu bewerten. Hierzu ist eine allgemein anerkannte Statistikmethode heranzuziehen; die Statistikmethoden sind bei der Auslegung der Studie festzulegen.

**Prüfbericht**

45. Der Prüfbericht sollte, soweit zutreffend, die folgenden Informationen enthalten:

*Versuchstiere und Tierhaltung*

— Beschreibung der Haltungsbedingungen mit Angaben zu Anzahl (oder Veränderung der Anzahl) der Tiere je Käfig, Einstreu, Umgebungstemperatur und relativer Luftfeuchtigkeit, Photoperiode und Futter,

▼M4

— Art/Stamm und Begründung für die Verwendung einer anderen Art als der Ratte; Daten zur Herkunft der Tiere und historische Daten können angegeben werden, wenn sie von Tieren mit ähnlichen Expositions-, Unterbringungs- und Futterkarenzbedingungen stammen,

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere,

— Randomisierungsmethode,

— Beschreibung etwaiger Vorbereitung vor der Prüfung, einschließlich Ernährung, Quarantäne und Behandlung von Krankheiten.

*Prüfsubstanz*

— physikalische Beschaffenheit, Reinheit und, wenn maßgeblich, physikalisch-chemische Eigenschaften (einschließlich Isomerisierung),

— Angaben zur Identifikation und CAS-Nummer (Chemical Abstract Services), falls bekannt.

*Vehikel*

— Begründung für die Verwendung eines Vehikels sowie für die Wahl des Vehikels (falls nicht Wasser),

— historische oder parallel erzeugte Daten, die belegen, dass das Vehikel keinen Einfluss auf das Ergebnis der Studie hat.

*Inhalationskammer*

— ausführliche Beschreibung der Inhalationskammer mit Angabe des Volumens sowie ein Diagramm,

— Herkunft und Beschreibung der für die Exposition der Tiere sowie für die Erzeugung der Atmosphäre verwendeten Ausrüstung,

— Ausrüstung für die Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Partikelgröße und tatsächlicher Konzentration,

— Herkunft der Luft und Klimatisierungssystem,

— für die Kalibrierung der Ausrüstung verwendete Methoden, um eine homogene Prüfatmosphäre sicherzustellen,

— Druckunterschied (positiv oder negativ),

— Expositions-Öffnungen je Kammer („Nose-only"-Exposition); Anordnung der Tiere in der Kammer (Ganzkörperexposition),

— Stabilität der Prüfatmosphäre,

— Lage von Temperatur- und Feuchtigkeitssensoren und Ort der Probenahme der Prüfatmosphäre in der Kammer,

— Behandlung der zugeführten/entzogenen Luft,

— Luftdurchflussraten, Luftdurchflussrate/Expositions-Öffnung („Nose-only"-Exposition) oder Anzahl der Tiere je Kammer (Ganzkörperexposition),

— Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts in der Inhalationskammer ($t_{95}$),

— Zahl der Volumenänderungen pro Stunde,

— Messgeräte (falls zutreffend).

*Expositionsdaten*

— Begründung für die Wahl der Zielkonzentration in der Hauptstudie,

▼M4

— nominale Konzentrationen (Gesamtmasse der in die Inhalationskammer eingeleiteten Prüfsubstanz dividiert durch das Volumen der durch die Kammer geleiteten Luft),

— im Atembereich der Tiere ermittelte tatsächliche Konzentrationen der Prüfsubstanz; bei Gemischen mit heterogenen physikalischen Formen (Gase, Dämpfe, Aerosole) kann jede Form getrennt analysiert werden,

— alle Luftkonzentrationen sollten in Masseneinheiten (z. B. mg/l, $mg/m^3$ usw.) und nicht in Volumeneinheiten (z. B. ppm, ppb usw.) angegeben werden,

— Partikelgrößenverteilung, mittlerer aerodynamischer Massendurchmesser (MMAD) und geometrische Standardabweichung (σg), einschließlich der Berechnungsmethoden. Einzelne Partikelgrößenanalysen sind zu protokollieren.

*Prüfbedingungen*

— Angaben zur Vorbereitung der Prüfsubstanz, einschließlich Angaben zu den Verfahren zur Reduzierung der Partikelgröße von Feststoffen oder zur Herstellung von Lösungen der Prüfsubstanz,

— eine Beschreibung (möglichst mit Diagramm) der Ausrüstung, die zur Erzeugung der Prüfatmosphäre und zur Exposition der Tiere gegen die Prüfatmosphäre verwendet wird,

— Angaben zur Ausrüstung, die für die Überwachung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftstrom in der Kammer verwendet wird (Erstellung einer Kalibrationskurve),

— Angaben zur Ausrüstung, mit der die Proben zur Bestimmung der Konzentration in der Kammer und der Partikelgrößenverteilung genommen werden,

— Angaben zur verwendeten chemischen Analysemethode und zur Validierung der Methode (einschließlich der Effizienz der Wiederfindung der Prüfsubstanz im Medium),

— Randomisierungsmethode für die Einteilung der Tiere in Prüf- und Kontrollgruppen,

— Angaben über Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Wasserquelle),

— Begründung für die Wahl der Prüfkonzentrationen.

*Ergebnisse*

— tabellarische Darstellung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftstrom in der Kammer,

— tabellarische Darstellung von Daten zur nominalen und tatsächlichen Konzentration in der Kammer,

— tabellarische Darstellung der Partikelgrößendaten einschließlich Daten zur analytischen Probenahme, Partikelgrößenverteilung und Berechnung des MMAD und der $\sigma_g$,

— tabellarische Darstellung der erhobenen Daten und der Konzentration für jedes einzelne Tier (d. h. Tiere, die Anzeichen für Toxizität zeigen, einschließlich Mortalität sowie Art, Schweregrad, Zeitpunkt des Einsetzens und Dauer der Wirkungen),

▼M4

— tabellarische Darstellung des Körpergewichts der einzelnen Tiere,

— tabellarische Darstellung der Futteraufnahme,

— tabellarische Darstellung der klinischen Pathologieparameter,

— Sektionsbefunde und histopathologische Ergebnisse für jedes einzelne Tier, falls vorhanden,

— tabellarische Darstellung aller anderen gemessenen Parameter.

*Diskussion und Auswertung der Ergebnisse*

— Besondere Aufmerksamkeit sollte der Beschreibung der Methoden gelten, die verwendet wurden, um die Kriterien dieser Prüfmethode zu erfüllen, z. B. die Grenzkonzentration oder die Partikelgröße.

— Die Lungengängigkeit von Partikeln vor dem Hintergrund der Gesamtbefunde sollte behandelt werden, insbesondere, wenn die Partikelgrößenkriterien nicht erfüllt werden konnten.

— Die Kohärenz der Methoden zur Bestimmung der nominalen und der tatsächlichen Konzentration sowie die Beziehung der tatsächlichen Konzentration zur nominalen Konzentration sind in die Gesamtbewertung der Studie aufzunehmen.

— Die wahrscheinliche Todesursache und die vorherrschende Wirkungsweise (systemisch oder lokal) sollten behandelt werden.

— Falls Tiere, die unter Schmerzen litten oder Zeichen für schweres und anhaltendes Leiden aufwiesen, auf humane Weise getötet werden mussten, ist eine Erklärung auf der Grundlage der Kriterien im OECD Guidance Document on Humane Endpoints (3) zu geben.

— Die Zielorgane sollten identifiziert werden.

— Der NOAEL und der LOAEL sollten bestimmt werden.

*LITERATUR:*

1. OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

2. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4. Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5. Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

6. Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

7. Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

8. Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

9. Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

10. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

11. Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

12. Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

13. Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

▼**M4**

*Anlage 1*

DEFINITION

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

▼B

B.9. **TOXIZITÄT NACH 28-TÄGIGER GABE (DERMAL)**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B (Punkt A).

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B (Punkt B)

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird täglich in abgestuften Dosen mehreren Versuchstiergruppen auf die Haut aufgetragen, und zwar eine Dosierung je Gruppe über einen Zeitraum von 28 Tagen. Während des Versuchszeitraums werden die Tiere täglich beobachtet, um Symptome toxischer Wirkungen festzustellen. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie bei Versuchsende überlebende Tiere werden seziert.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1. **Vorbereitung**

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- oder Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor dem Versuch werden gesunde junge Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeordnet. Kurz vor Versuchsbeginn wird das Fell auf dem Rücken der Versuchstiere geschoren. Ein Abrasieren des Fells ist ebenfalls möglich, sollte jedoch 24 Stunden vor dem Versuch erfolgen. Das Scheren oder Rasieren muss normalerweise wöchentlich wiederholt werden. Es ist darauf zu achten, dass dabei die Haut nicht verletzt wird. Mindestens 10 % der Körperoberfläche wird für die Applikation vorbereitet. Bei der Bestimmung des zu scherenden Bereichs und der Applikationsfläche ist das Gewicht der Tiere zu berücksichtigen. Werden feste Stoffe verwendet, die gegebenenfalls pulverisiert werden können, sollte die Prüfsubstanz ausreichend mit Wasser oder ggf. in anderer geeigneter Form angefeuchtet werden, um einen guten Kontakt mit der Haut sicherzustellen. Flüssige Prüfsubstanzen werden im Allgemeinen unverdünnt angewendet. Die Applikation erfolgt täglich an 5 bis 7 Tagen pro Woche.

1.6.2. **Versuchsbedingungen**

1.6.2.1. *Versuchstiere*

Es können geschlechtsreife Ratten oder Kaninchen verwendet werden. Auch andere Tierarten können verwendet werden, jedoch muss ihre Verwendung begründet werden.

▼B

Die Schwankung des Körpergewichts der Tiere des jeweiligen Versuchs sollte bei Versuchsbeginn nicht mehr als ± 20 % vom entsprechenden Mittelwert betragen.

1.6.2.2. *Anzahl und Geschlecht*

Mindestens 10 Tiere (5 weibliche und 5 männliche) mit gesunder unbeschädigter Haut sind für jede Dosierung zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muss die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 10 Tieren (5 Tiere pro Geschlecht) über 28 Tage mit der höchsten Dosierung behandelt werden. Während der darauf folgenden behandlungsfreien 14 Tage wird auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen geachtet. Eine Satellitengruppe von 10 Kontrolltieren (5 Tiere pro Geschlecht) wird ebenfalls verwendet.

1.6.2.3. *Dosierungen*

Es sind mindestens drei Dosierungen sowie eine Kontrollgruppe oder — sofern ein Vehikel benutzt wurde — eine Vehikel-Kontrollgruppe zu wählen. Die Einwirkungszeit sollte mindestens 6 Stunden pro Tag betragen. Die Applikation der Prüfsubstanz sollte täglich zur gleichen Zeit erfolgen. Eine Anpassung der Dosierung an das Körpergewicht ist in festgesetzten Intervallen (wöchentlich oder zweimal wöchentlich) vorzunehmen, um in Relation zum Körpergewicht des Tieres ein konstantes Dosierungsniveau zu erhalten. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere. Wird zur Erleichterung der Applikation ein Vehikel benutzt, so wird der Kontrollgruppe das Vehikel in gleicher Weise verabreicht wie den behandelten Tieren, und zwar in der Menge, die die Gruppe mit der höchsten Dosierung erhält. Die höchste Dosierung sollte so gewählt werden, dass auf jeden Fall toxische Effekte auftreten, die Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Dosierung sollte keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Liegen brauchbare Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so sollte die niedrigste Dosis diesen Wert überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Dosierung nur geringe toxische Effekte verursachen. Werden mehrere Zwischendosierungen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, dass es zu einer graduellen Abstufung der toxischen Wirkungen kommt. In den Gruppen mit niedriger oder mittlerer Dosierung sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl der Todesfälle gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

Führt die Applikation der Prüfsubstanz zu schweren Hautreizungen, sollte die Konzentration herabgesetzt werden, was bei hoher Dosierung zu einer Verminderung oder einem Ausbleiben sonstiger toxischer Wirkungen führen könnte. Wurde überdies die Haut stark beschädigt, ist es u. U. notwendig, den Versuch abzubrechen und mit einer geringeren Konzentration erneut durchzuführen.

1.6.2.4. *Limit-Test*

Verursacht bei Durchführung einer Vorstudie die Verabreichung einer Dosis von 1 000 mg/kg bzw. einer höheren Dosis, die einer möglichen Exposition beim Menschen entspricht, keine toxischen Auswirkungen, so ist eine weitere Prüfung nicht erforderlich.

1.6.2.5. *Beobachtungszeitraum*

Alle Tiere sind täglich auf Symptome toxischer Wirkungen zu beobachten. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Symptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

▼B

1.6.3. **Versuchsdurchführung**

Die Tiere sollten einzeln in Käfigen gehalten werden. Sie erhalten die Prüfsubstanz vorzugsweise an 7 Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Tiere einer Satellitengruppe, die für eine Nachbeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 14 Tage ohne Behandlung gehalten werden, um die Reversibilität bzw. das Fortbestehen toxischer Wirkungen zu beobachten. Die Expositionszeit beträgt mindestens 6 Stunden pro Tag.

Die Prüfsubstanz ist einheitlich auf einen Bereich, der etwa 10 % der Körperoberfläche entspricht, aufzutragen. Bei hochtoxischen Substanzen kann die behandelte Oberfläche kleiner sein, es sollte jedoch ein möglichst großer Bereich mit einer möglichst dünnen und einheitlichen Schicht exponiert werden.

Die Prüfsubstanz ist während der Expositionszeit mit einem porösen Mullverband und einem hautschonenden Pflaster in Kontakt mit der Haut zu halten. Die Versuchsfläche ist außerdem auf eine geeignete Art abzudecken, um den Mullverband und die Prüfsubstanz zu fixieren und sicherzustellen, dass die Tiere die Prüfsubstanz nicht oral aufnehmen können. Es können auch Mittel zur Einschränkung der Bewegungsfreiheit angewendet werden, eine vollständige Immobilisierung ist jedoch nicht zu empfehlen. Als Alternative kann eine „Halsmanschette“ verwendet werden.

Nach Ablauf der Expositionszeit entfernt man — soweit möglich — den Rest der Prüfsubstanz, und zwar unter Verwendung von Wasser oder eines anderen geeigneten Hautreinigungsverfahrens.

Alle Tiere sollen täglich beobachtet und Zeichen toxischer Wirkungen, darunter der Zeitpunkt des Auftretens sowie Grad und Dauer, aufgezeichnet werden. Die Beobachtungen sollten sich insbesondere auf Veränderung an Haut, Fell, Augen und Schleimhäuten, Atmung, Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie an der Somatomotorik und am Verhaltensmuster erstrecken. Die Futteraufnahme und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt. Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um so weit wie möglich sicherzustellen, dass Tiere während des Versuchs nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe oder Fehler beim Umsetzen verloren gehen. Nach Abschluss des Versuchszeitraums werden alle überlebenden Tiere mit Ausnahme der Satellitengruppe seziert. Sterbende Tiere sowie Tiere, bei denen Anzeichen von starkem Leiden und Schmerzen, festgestellt werden, sollten daraufhin sofort ausgesondert und unter Verwendung einer tierschutzgerechten Methode getötet und seziert werden.

Am Ende des Versuchs werden alle Tiere, einschließlich der Kontrolltiere, folgenden Untersuchungen unterzogen:

1. Die Hämatologie sollte mindestens die Bestimmung des Hämatokritwerts und Hämoglobinkonzentrat der Erythrozytenzahl, der Gesamt- und Differenzial-Leukozytenzahl sowie die Messung der Gerinnungsfähigkeit umfassen;

2. klinisch-biochemische Analyse des Blutes: Zur Beurteilung der Leber- und Nierenfunktion sollte zumindest je einer der folgenden Parameter bestimmt werden: Alanin-Aminotransferase (früher bekannt als Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase), Aspartat-Aminotransferase (früher bekannt als Serum-Glutamat-Oxalazetat-Transaminase), Harnstoff-Stickstoff, Albumin, Kreatinin, Gesamt-Bilirubin und Gesamt-Serum-Protein.

Bestimmungen weiterer blutchemischer Parameter, die ggf. für eine adäquate toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen: Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchternglukose, Lipide, Hormone, Säuren-Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität.

▼B

Zusätzliche klinisch-biochemische Analysen können ggf. notwendig sein, um die Untersuchung der beobachteten Effekte zu vertiefen.

1.6.4. **Autopsie**

An allen am Versuch beteiligten Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen. Zumindest die Leber, die Nieren, die Nebennieren und die Hoden werden so bald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Organe und Gewebe, d. h. unbehandelte und behandelte Haut, Leber, Nieren, Milz, Hoden, Nebennieren, Herz und Zielorgane (Organe mit makroskopischen Veränderungen und Größenveränderungen) sind in einem geeigneten Medium für mögliche spätere histopathologische Untersuchungen aufzubewahren.

1.6.5. **Histopathologische Untersuchungen**

Bei allen Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosierung sowie bei den Tieren der Kontrollgruppe ist eine histologische Untersuchung der konservierten Organe und Gewebe durchzuführen. Alle Organe und Gewebe, die in der Gruppe mit der höchsten Dosierung prüfsubstanzbedingte Schädigungen aufweisen, müssen auch bei allen anderen Gruppen bei geringerer Dosierung untersucht werden. Bei den Tieren der Satellitengruppe sind jene Organe und Gewebe mit besonderer Aufmerksamkeit zu untersuchen, bei denen in den anders behandelten Gruppen Vergiftungssymptome auftraten.

2. **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Dosisgruppe und Kontrollgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs und die Anzahl der Tiere mit den einzelnen Schädigungsformen zu entnehmen sein.

Alle ermittelten Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Dazu kann jede anerkannte statistische Methode herangezogen werden.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— Angaben zu den Tieren (Tierart, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.);

— Versuchsbedingungen (einschließlich Art des Verbandes; okklusiv oder nicht okklusiv);

— Dosierungen (ggf. Vehikel) und Konzentrationen;

— No effect-level (NEL), falls möglich;

— Daten über toxische Reaktionen, nach Geschlecht und Konzentration;

— Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;

— toxische und andere Wirkungen;

— Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Zeichen toxischer Wirkungen und deren weiterer Verlauf;

— Angaben über Fütterung und Körpergewicht;

— hämatologische Tests und deren Ergebnisse;

▼B

— klinisch-biochemische Tests und deren Ergebnisse;

— Sektionsbefunde;

— detaillierte Beschreibung der histopathologischen Befunde;

— statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

3.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B (Punkt D).

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B (Punkt E).

▼B

## B.10. MUTAGENITÄT — IN-VITRO-TEST AUF CHROMOSOMENABERRATIONEN IN SÄUGETIERZELLEN

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der OECD TG 473, In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

### 1.1. EINLEITUNG

Der In-vitro-Test auf Chromosomenaberrationen dient zum Nachweis von Agenzien, die in Säugerzellkulturen strukturelle Chromsomenaberrationen auslösen. (1) (2) (3). Dabei ist zwischen strukturellen Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen zu unterscheiden. Bei der Mehrzahl der chemischen Mutagene sind die Aberrationen dem Chromatidentyp zuzuordnen, doch kommen auch Chromosomentypaberrationen vor. Eine Zunahme der Polyploidie ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass ein chemischer Stoff numerische Aberrationen hervorzurufen vermag. Allerdings ist diese Methode nicht zur Messung numerischer Aberrationen bestimmt und wird daher auch nicht routinemäßig dafür eingesetzt. Chromsomenmutationen und ähnliche Vorgänge sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen. Es spricht manches dafür, dass Chromsomenmutationen und ähnliche Vorgänge, die Änderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen somatischer Zellen auslösen, an der Entstehung von Krebs bei Menschen und Versuchstieren beteiligt sind.

Beim In-vitro-Chromosomenaberrationstest können Kulturen von etablierten Zelllinien und Zellstämmen oder primäre Zellkulturen zum Einsatz kommen. Die verwendeten Zellen werden unter dem Gesichtspunkt der Wachstumsfähigkeit in Kultur, der Karyotypstabilität, der Chromosomenzahl, der Chromosomenvielfalt und der spontanen Häufigkeit von Chromosomenaberrationen ausgewählt.

In vitro durchgeführte Versuche erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit diesem System lassen sich aber die In-vivo-Bedingungen bei Säugetieren nicht gänzlich nachvollziehen. Es sind unbedingt Bedingungen zu vermeiden, bei denen positive Ergebnisse auftreten, die nicht die intrinsische Mutagenität widerspiegeln und möglicherweise aus Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität oder hochgradiger Zytotoxizität herrühren (4) (5).

Dieser Test dient zum Nachweis möglicher Mutagene und Kanzerogene in Säugetierzellen. Viele chemische Verbindungen, bei denen der Test positiv ausfällt, haben eine kanzerogene Wirkung auf Säugetiere, doch besteht keine absolute Korrelation zwischen Test und Kanzerogenität. Die Korrelation ist von der chemischen Klasse abhängig, und es gibt zunehmende Anzeichen dafür, dass bestimmte Kanzerogene durch diesen Test nicht nachweisbar sind, da ihre Wirkung anscheinend auf anderen Mechanismen als einer direkten DNA-Schädigung beruht.

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

### 1.2. DEFINITIONEN

**Chromatidentypaberration:** strukturelle Chromsomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion zwischen Chromatiden.

**Chromosomentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch oder Bruch und Reunion beider Chromatiden an gleicher Position.

▼B

**Endoreduplikation:** Prozess, bei dem der Kern nach einer S-Phase der DNA-Replikation keine Mitose durchläuft, sondern in eine weitere S-Phase eintritt. Das Ergebnis sind Chromosomen mit 4, 8, 16, ... Chromatiden.

**Gap:** achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide und mit minimaler Verlagerung der Chromatide(n).

**Mitoseindex:** Anteil der Zellen einer Zellpopulation, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in Metaphase befinden: Gradmesser für den Vermehrungsgrad dieser Population.

**Numerische Aberration:** Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Zellen charakteristisch ist.

**Polyploidie:** Vorhandensein von mehr als zwei haploiden Chromosomensätzen (n) (z. B. 3n, 4n usw.).

**Strukturelle Aberration:** Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen und Fragmenten, intra-chromosomalen oder reziproken Translokationen.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Behandlung der Zellkulturen mit der Prüfsubstanz erfolgt mit und ohne Zusatz eines Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Nach Ablauf eines vorher festgelegten Zeitraums werden die Zellkulturen mit einem Spindelgift (z. B. Colcemid® oder Colchicin) behandelt, gewonnen und gefärbt, woraufhin die Metaphasezellen mikroskopisch auf Chromosomenaberrationen untersucht werden.

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Vorbereitungen**

1.4.1.1. *Zellen*

Es können verschiedene Zelllinien, Zellstämme oder primäre Zellkulturen, auch menschliche Zellen, Verwendung finden (z. B. Fibroblasten des chinesischen Hamsters, Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Menschen oder anderen Säugern).

1.4.1.2. *Kulturmedien und Inkubationsbedingungen*

Zur Kultivierung sind geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße, $CO_2$-Konzentration, Temperatur und Feuchtigkeit) zu verwenden. Etablierte Zelllinien und -stämme sind routinemäßig auf Stabilität der modalen Chromosomenzahl und Mycoplasmaverunreinigung zu überprüfen und sollten bei Verunreinigung nicht herangezogen werden. Die normale Dauer des Zellzyklus bei den gewählten Zellen und Inkubationsbedingungen sollte bekannt sein.

1.4.1.3. *Vorbereitung der Kulturen*

Etablierte Zelllinien und -stamme: die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen, im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, dass die Kultur vor dem Zeitpunkt der Gewinnung nicht konfluent wird, und bei 37 °C inkubiert.

▼B

Lymphozyten: mit einem Antikoagulans (z. B. Heparin) behandeltes Vollblut oder separierte Lymphozyten von gesunden Probanden werden dem Kulturmedium beigegeben, das ein Mitogen (z. B. Phytohämagglutinin) enthält, und bei 37 °C inkubiert.

1.4.1.4. *Stoffwechselaktivierung*

Die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Fremdstoff-Metabolisierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9) oder einem Gemisch aus Phenobarbiton und β-Naphtoflavon (10) (11) (12) vorbehandelt wurde.

Die post-mitochondriale Fraktion wird im Endmedium in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 10 % v/v verwendet. Der Zustand des Stoffwechselsystems ist möglicherweise von der geprüften chemischen Klasse abhängig. In bestimmten Fällen ist es ggf. zweckmäßig, mehr als eine Konzentration der post-mitochondrialen Fraktion zu verwenden.

Eine Reihe von Entwicklungen, darunter die Herstellung gentechnisch veränderter Zelllinien zur Expression spezifischer Aktivierungsenzyme, eröffnen vielleicht die Möglichkeit für eine endogene Aktivierung. Die Wahl der verwendeten Zelllinien sollte wissenschaftlich begründet sein (z. B. durch die Relevanz des Isoenzyms Cytochrom P450 für den Stoffwechsel der Prüfsubstanz).

1.4.1.5. *Prüfsubstanz/Zubereitung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können den Versuchssystemen vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

1.4.2. **Prüfbedingungen**

1.4.2.1. *Lösungsmittel/Vehikel*

Die Lösungsmittel/Vehikel sollten nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen, und sie sollten mit dem Überleben der Zellen und der S9-Aktivität kompatibel sein. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Bei der Prüfung wasserinstabiler Substanzen sollten die verwendeten organischen Lösungsmittel frei von Wasser sein. Das Wasser lässt sich durch Zusatz eines Molekularsiebs entfernen.

1.4.2.2. *Expositionskonzentration*

Zu den Kriterien, die bei der Bestimmung der höchsten Konzentration zu berücksichtigen sind, zählen die Zytotoxizität, die Löslichkeit im Versuchssystem und die Veränderungen des pH-Wertes oder der Osmolalität.

Die Zytotoxizität sollte im Hauptversuch mit und ohne Stoffwechselaktivierung unter Verwendung eines geeigneten Indikators für Zellintegrität und -wachstum wie Konfluenzgrad, Anzahl der lebensfähigen Zellen oder Mitoseindex bestimmt werden. Es ist möglicherweise sinnvoll, die Zytotoxizität und Löslichkeit in einem Vorversuch zu bestimmen.

▼B

Es sind mindestens drei analysierbare Konzentrationen zu verwenden. Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten diese Konzentrationen den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Im Normalfall bedeutet dies, dass sich die Konzentrationen maximal um einen Faktor zwischen 2 und 10 unterscheiden. Zum Zeitpunkt der Gewinnung sollte die höchste Konzentration eine deutliche Verminderung des Konfluenzgrades, der Anzahl der Zellen oder des Mitoseindexes (jeweils um mehr als 50 %) erkennen lassen. Der Mitoseindex ist nur ein indirekter Gradmesser für zytotoxische/zytostatische Wirkungen und hängt davon ab, wie viel Zeit seit der Behandlung vergangen ist. Allerdings ist der Mitoseindex für Suspensionskulturen vertretbar, bei denen andere Methoden zur Toxizitätsbestimmung möglicherweise umständlich oder unpraktisch sind. Informationen über die Zellzykluskinetik, z. B. die mittlere Generationszeit (MGZ), könnten als zusätzliche Angaben herangezogen werden. Bei der MGZ handelt es sich jedoch um einen Gesamtdurchschnittswert, der nicht immer das verspätete Auftreten von Teilpopulationen erkennen lässt, und schon ein leichter Anstieg der mittleren Generationszeit kann eine erhebliche Verzögerung des Zeitpunkts der optimalen Ausbeute an Aberrationen zur Folge haben.

Bei relativ nichtzytotoxischen Substanzen sollte die Höchstkonzentration bei Versuchen 5 µl/ml, 5 mg/ml oder 0,01 M betragen, je nachdem, welcher Wert am niedrigsten ist.

Im Falle relativ unlöslicher Substanzen, die bei Konzentrationen unterhalb der unlöslichen Konzentration nicht toxisch sind, sollte die höchste verwendete Dosis eine Konzentration oberhalb der Löslichkeitsgrenze im Endmedium nach Ablauf der Behandlungszeit sein. In bestimmten Fällen (z. B. wenn die Toxizität nur bei einer Konzentration auftritt, die über der geringsten unlöslichen Konzentration liegt) ist es ratsam, die Prüfung bei mehr als einer Konzentration mit sichtbarer Ausfällung vorzunehmen. Möglicherweise ist es sinnvoll, die Löslichkeit zum Anfang und Abschluss der Behandlung zu bestimmen, da sich die Löslichkeit im Versuchssystem während der Exposition aufgrund des Vorhandenseins von Zellen, S9, Serum usw. verändern kann. Die Unlöslichkeit ist mit dem bloßen Auge erkennbar. Die Ausfällung sollte die Bewertung nicht beeinträchtigen.

1.4.2.3. *Negativ- und Positivkontrollen*

Für jeden Versuch sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel- oder Vehikel-)Kontrollen mit und ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems anzulegen. Bei Stoffwechselaktivierung sollte die Positivkontrollsubstanz jene Substanz sein, die zur mutagenen Reaktion eine Aktivierung benötigt.

Zur Positivkontrolle sollte ein bekanntes Clastogen in Expositionskonzentrationen verwendet werden, die voraussichtlich eine reproduzierbare und erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben, womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems demonstrieren lässt.

Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, dass die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

| Stoffwechselaktivierungsstatus | Substanz | CAS-Nummer | EINECS-Nummer |
|---|---|---|---|
| Ohne exogene Stoffwechselaktivierung | Methylmethansulfonat | 66-27-3 | 200-625-0 |
| | Ethylmethansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |

▼B

| Stoffwechselaktivierungsstatus | Substanz | CAS-Nummer | EINECS-Nummer |
|---|---|---|---|
| | Ethylnitrosoharnstoff | 759-73-9 | 212-072-2 |
| | Mitomycin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| | 4-Nitroquinolin-N-oxid | 56-57-5 | 200-281-1 |
| Mit exogener Stoffwechselaktivierung | Benzo[a]pyren | 50-32-8 | 200-028-5 |
| | CyclophosphamidCyclophosphamidmonohydrat | 50-18-0<br>6055-19-2 | 200-015-4 |

Es können auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen verwendet werden. Gegebenenfalls sollten Positivkontrollen herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehören wie der Prüfstoff.

Bei jedem Gewinnungszeitpunkt sind Negativkontrollen hinzuzuziehen, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel oder Vehikel enthält und die auf die gleiche Weise wie die Behandlungskulturen behandelt werden. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrollen verwendet werden, wenn nicht historische Kontrolldaten belegen, dass das gewählte Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

1.4.3. **Verfahren**

1.4.3.1. *Behandlung mit der Prüfsubstanz*

Proliferierende Zellen werden mit und ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt. Die Behandlung der Lymphozyten sollte ca. 48 Stunden nach der mitogenen Stimulierung beginnen.

1.4.3.2. Im Normalfall sollten für jede Konzentration zwei parallele Kulturen verwendet werden, die auch nachdrücklich für Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollkulturen empfohlen werden. Lässt sich anhand von historischen Daten nachweisen, dass zwischen den Zweifachkulturen nur eine minimale Abweichung besteht (13) (14), so ist ggf. die Verwendung von Einfachkulturen für jede Konzentration vertretbar.

Gasförmige oder flüchtige Substanzen sind mit Hilfe geeigneter Methoden zu prüfen, z. B. in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (15) (16).

1.4.3.3. *Zeitpunkt der Gewinnung der Kulturen*

Beim ersten Versuch sollten die Zellen 3 bis 6 Stunden lang mit und ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt werden, wobei eine Aufarbeitung nach Ablauf eines Zeitraums erfolgt, der etwa der 1,5-fachen Dauer des normalen Zellzyklus nach Behandlungsbeginn entspricht (12). Ergibt dieses Protokoll sowohl mit als auch ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems negative Ergebnisse, so sollte ein weiterer Versuch ohne Aktivierung vorgenommen werden, bei dem eine kontinuierliche Behandlung bis hin zur Probenahme nach Ablauf eines Zeitraums erfolgt, der etwa der 1,5-fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht. Bestimmte Stoffe sind möglicherweise leichter nachweisbar, wenn der Zeitraum für die Behandlung/Probenahme mehr als die l,5-fache Dauer des normalen Zellzyklus beträgt. Negative Befunde bei Zusatz eines Metabolisierungssystems bedürfen der Bestätigung durch Einzelfallprüfung. In jenen Fällen, in denen eine Bestätigung negativer Befunde nicht für erforderlich gehalten wird, ist eine Begründung anzugeben.

▼B

1.4.3.4. *Chromosomenpräparation*

Die Zellkulturen werden vor der Gewinnung in der Regel ein bis drei Stunden lang mit Colcemid® oder Colchicin behandelt. Für die Chromosomenpräparation wird jede Zellkultur gesondert gewonnen und aufgearbeitet. Zur Chromosomenpräparation gehören die Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung, die Fixierung und Färbung.

1.4.3.5. *Analyse*

Alle Objektträger, auch die für die Positiv- und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite zu kodieren. Da es bei der Fixierung häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen unter Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen daher eine Zentromerzahl enthalten, die bei allen Zelltypen dem Modalwert ± 2 entspricht. Es sind mindestens 200 gut gespreitete Metaphasen je Konzentration und Kontrolle zu analysieren und bei Zweifachkulturen gleichmäßig auf diese zu verteilen. Eine Reduzierung dieser Zahl ist möglich, wenn eine hohe Zahl von Aberrationen beobachtet wird.

Obwohl es bei der Prüfung um den Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen geht, ist das Auftreten von Polyploidie und Endoreduplikation unbedingt zu vermerken.

2. **DATEN**

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Versuchseinheit ist die Zelle, und daher ist der Anteil der Zellen mit struktureller Chromosomenaberration bzw. strukturellen Chromosomenaberrationen zu bewerten. Für die Versuchs- und Kontrollkulturen sind die unterschiedlichen Typen struktureller Chromosomenaberrationen mit Anzahl und Häufigkeit aufzuführen. Gaps werden getrennt erfasst und angegeben, aber in der Regel nicht bei der Gesamthäufigkeit der Aberrationen berücksichtigt.

Zu erfassen sind auch Maßnahmen, die in den Hauptprüfungen auf Aberrationen gleichzeitig zur Bestimmung der Zytotoxizität aller behandelten und Negativkontrollkulturen durchgeführt werden.

Es sind die Daten für die einzelnen Kulturen zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden.

Bei einer eindeutigen positiven Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich. Nicht eindeutige Ergebnisse sind durch weitere Prüfungen abzuklären, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen. Die Notwendigkeit der Bestätigung negativer Ergebnisse wurde in 1.4.3.3 dargelegt. Bei Folgeversuchen sollte die Abänderung der Studienparameter zur Erweiterung des Umfangs der bewerteten Bedingungen in Betracht gezogen werden. Zu den Studienparametern, die für eine Abänderung in Frage kommen, gehören die Abstände der Konzentrationen und die Stoffwechselaktivierungsbedingungen.

2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine konzentrationsbezogene Zunahme oder reproduzierbare Zunahme der Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (3) (13). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

▼B

Eine zahlenmäßige Zunahme der polyploiden Zellen deutet möglicherweise darauf hin, dass die Prüfsubstanz mitotische Prozesse zu hemmen und numerische Chromosomenaberrationen hervorzurufen vermag. Eine zahlenmäßige Zunahme der Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen ist möglicherweise ein Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz die Zellzyklusprogression zu hemmen vermag (17) (18).

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den oben genannten Kriterien entsprechen, gilt in diesem System als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, dass sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde beim In-vitro-Chromosomenaberrationstest deuten darauf hin, dass die Prüfsubstanz in kultivierten somatischen Säugetierzellen strukturelle Chromosomenaberrationen hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine Chromosomenaberrationen in kultivierten somatischen Säugetierzellen hervorruft.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

*PRÜFBERICHT*

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel:

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt.

Zellen:

— Typ und Herkunft der Zellen;

— Karyotypmerkmale und Eignung des verwendeten Zelltyps;

— ggf. Nichtvorhandensein von Mycoplasma;

— Angaben über die Dauer des Zellzyklus;

— Geschlecht der Blutspender, Vollblut oder separierte Lymphozyten, verwendetes Mitogen;

— ggf. Passagenanzahl;

— ggf. zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;

— Modalwert der Chromosomen.

Prüfbedingungen:

— Bezeichnung der Spindelgifte, deren Konzentration und Dauer der Zellexposition;

— Begründung für die Auswahl der Konzentrationen und die Anzahl der Kulturen, darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze, falls vorhanden;

— Medienzusammensetzung, ggf. $CO_2$-Konzentration;

▼B

— Konzentration der Prüfsubstanz;

— Volumen des Vehikels und der beigegebenen Prüfsubstanz;

— Inkubationstemperatur;

— Inkubationszeit;

— Behandlungsdauer;

— ggf. Zelldichte bei der Beimpfung;

— Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems einschließlich Eignungskriterien;

— Positiv- und Negativkontrollen;

— Methoden zur Präparation des Objektträgers;

— Kriterien für die Auswertung der Aberrationen;

— Anzahl der analysierten Metaphasen;

— Methoden zur Bestimmung der Toxizität;

— Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

— Toxizitätszeichen, z. B. Konfluenzgrad, Angaben zum Zellzyklus, Zellzahlen, Mitoseindex;

— Ausfällungszeichen;

— Angaben zum pH-Wert und zur Osmolalität des Behandlungsmediums, falls ermittelt;

— Begriffsbestimmungen für Aberrationen, einschließlich Lücken;

— Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen mit getrennter Angabe des Chromosomenaberrationstyps für jede behandelte Kultur und Kontrollkultur;

— ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie;

— nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;

— ggf. statistische Analysen;

— Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen;

— Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens,* Principles *and Methods for their Detection,* Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, 1-29.

(2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress* in *Mutation Research,* Vol. 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford. 427-432.

▼B

(3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C, Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environs.* Molec. *Mutagen* 10 (suppl. 10), 1-175.

(4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.,* 257, 147-204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, Mutation Res., 268, 297-305.

(6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, 347-364.

(7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation *Res.,* 113, 173-215.

(8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro,* J. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.,* 37, 83-90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro, *Mutation Res.,* 66, 277-290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclar 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis,* 7, 175-177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Berid, J. R. and Philpot, R. M. (eds), In Vitro *Metabolic* Activation *in* Mutagenesis *Testing,* Elsevier, North-Holland, 85-88.

(12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L, Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.,* 312, 241-261.

(13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, 141-154.

(14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, Mutation Res, 312, 139-149.

(15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L, Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents,* New York, Plenum, 91-103.

▼B

(16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, Environmental Mutagenesis, 5, 795-801.

(17) Locke-Huhle, C. (198 3), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, Mutation Res., 119, 403-413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (198 3), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, Cancer Res., 43, 1362-1364.

▼B

B.11. **MUTAGENITÄT — IN-VIVO-TEST AUF CHROMOSOMENABERRATIONEN IN SÄUGETIERKNOCHENMARKZELLEN**

1. **METHODE**

Diese Methode entspricht der OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. EINLEITUNG

Der In-vivo-Test auf Chromosomenaberrationen in Säugetierzellen dient zum Nachweis von strukturellen Chromosomenaberrationen, die von der Prüfsubstanz im Knochenmark von Säugetieren, in der Regel Nagetieren, ausgelöst werden (1) (2) (3) (4). Dabei ist zwischen strukturellen Chromosomen- und Chromatidentypaberrationen zu unterscheiden. Eine Zunahme der Polyploidie ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass ein chemischer Stoff numerische Aberrationen hervorzurufen vermag. Bei der Mehrzahl der chemischen Mutagene sind die Aberrationen dem Chromatidentyp zuzuordnen, doch kommen auch Chromosomentypaberrationen vor. Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen. Es spricht manches dafür, dass Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge, die Änderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen auslösen, an der Entstehung von Krebs bei Menschen und in Versuchssystemen beteiligt sind.

Bei dieser Prüfung werden routinemäßig Nagetiere eingesetzt. Zielgewebe ist dabei das Knochenmark, da es sich dabei um ein gefäßreiches Gewebe mit einer Population rasch proliferierender Zellen handelt, die sich leicht isolieren und aufarbeiten lassen. Andere Versuchstiere und Zielgewebe sind nicht Gegenstand dieser Methode.

Dieser Chromosomenaberrationstest ist insbesondere für die Bewertung der mutagenen Eigenschaften von Relevanz, da er die Berücksichtigung von Faktoren des In-vivo-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und der DNA-Reparaturprozesse ermöglicht, auch wenn diese bei den einzelnen Spezies und Geweben unterschiedlich sind. Ein In-vivo-Test ist auch für die weitere Untersuchung einer bei In-vitro-Prüfungen festgestellten mutagenen Wirkung von Nutzen.

Wenn Anzeichen dafür bestehen, dass die Prüfsubstanz oder ein reaktiver Metabolit das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Test nicht geeignet.

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

**Chromatidentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion zwischen Chromatiden.

**Chromosomentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch oder Bruch und Reunion beider Chromatiden an gleicher Position.

**Endoreduplikation:** Prozess, bei dem der Kern nach einer S-Phase der DNA-Replikation keine Mitose durchläuft, sondern in eine weitere S-Phase eintritt. Das Ergebnis sind Chromosomen mit 4, 8, 16 ... Chromatiden.

**Gap:** achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide und mit minimaler Verlagerung der Chromatide(n).

**Numerische Aberration:** Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Zellen charakteristisch ist.

▼B

**Polyploidie:** Vorhandensein von mehr als zwei haploiden Chromosomensätzen (n) (z. B. 3n, 4n. usw.).

**Strukturelle Aberration:** Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen und Fragmenten, intra-chromosalen oder reziproken Translokationen.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz mittels einer geeigneten Expositionsform verabreicht und werden zu einem geeigneten Zeitpunkt nach der Behandlung getötet. Vor der Tötung werden die Tiere mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin oder Colcemid® behandelt. Aus den Knochenmarkzellen werden dann Chromosomen präpariert und gefärbt, und die Metaphasezellen werden auf Chromosomenaberrationen untersucht.

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Vorbereitungen**

1.4.1.1. *Versuchstiere*

Gewöhnlich werden Ratten, Mäuse und chinesische Hamster verwendet, doch kommen auch andere geeignete Säugetierarten in Frage. Es sollten gesunde und geschlechtsreife junge Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert so gering wie möglich sein und bei beiden Geschlechtern nicht mehr als ± 20 % betragen.

1.4.1.2. *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert um 50-60 % anzustreben.

1.4.1.3. *Vorbereitung der Tiere*

Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so anzuordnen, dass sich ihre Position möglichst wenig auswirkt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

1.4.1.4. *Vorbereitung der Dosierung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

1.4.2. **Prüfbedingungen**

1.4.2.1. *Lösungsmittel/Vehikel*

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

▼B

1.4.2.2. *Kontrollen*

Für jeden Versuch und jedes Geschlecht sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel/Vehikel)-Kontrollen anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der behandelten Gruppen.

Die Positivkontrollen sollten in vivo strukturelle Aberrationen bei Expositionskonzentrationen hervorrufen, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben. Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, dass die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Auswerten nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es ist vertretbar, dass die Positivkontrolle auf anderem Wege als die Prüfsubstanz verabreicht wird und nur eine Probenahme erfolgt. Ggf. könnte eine zusätzliche Positivkontrolle herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die zu prüfende Substanz. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

| Substanz | CAS-Nummer | EINECS-Nummer |
|---|---|---|
| Ethylmethansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| Ethylnitrosoharnstoff | 759-73-9 | 212-072-2 |
| Mitomycin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| Cyclophosphamid<br>Cyclophosphamidmonohydrat | 50-18-0<br>6055-19-2 | 200-015-4 |
| Triethylenmelamin | 51-18-3 | 200-083-5 |

Zu jedem Zeitpunkt der Probenahme sind Tiere der Negativkontrolle einzubeziehen, die nur ein Lösungsmittel erhalten und ansonsten ebenso wie die Behandlungsgruppen behandelt werden, soweit nicht aus historischen Kontrolldaten akzeptable Werte zur Variabilität der Tiere und Häufigkeit der Zellen mit Chromosomenaberrationen vorliegen. Erfolgt bei den Negativkontrollen nur eine einzige Probenahme, so ist dafür die erste Probenahme der günstigste Zeitpunkt. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrolltiere verwendet werden, soweit nicht historische oder veröffentlichte Kontrolldaten belegen, dass das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

1.5. VERFAHREN

1.5.1. **Anzahl und Geschlecht der Tiere**

Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe muss pro Geschlecht mindestens 5 analysierbare Tiere umfassen. Wenn zum Zeitpunkt der Studie Daten aus Untersuchungen zur gleichen Spezies und Expositionsform vorliegen, die belegen, dass zwischen den Geschlechtern kein nennenswerter Unterschied der Toxizität feststellbar ist, reicht die Prüfung von Tieren nur eines Geschlechts aus. Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z. B. bei bestimmten pharmazeutischen Wirkstoffen, ist der Versuch an Tieren des betreffenden Geschlechts durchzuführen.

1.5.2. **Behandlungsplan**

Die Prüfsubstanzen sind möglichst auf einmal zu verabreichen. Die Gabe kann aber auch in Form von zwei Teilmengen erfolgen, die am gleichen Tag im Abstand von wenigen Stunden verabreicht werden, wenn es sich um ein großes Materialvolumen handelt. Andere Verabreichungsschemata sollten wissenschaftlich begründet sein.

▼B

Wenn die Testsubstanz an einem Tag verabreicht wird, sollte zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten aufgearbeitet werden. Bei Nagern erfolgt die erste Probenahme im Anschluss an die Behandlung nach Ablauf eines Zeitraums, der der l,5-fachen Dauer des normalen Zellzyklus (der in der Regel 12 bis 18 Std. dauert) entspricht. Da die für die Aufnahme und Metabolisierung der Prüfsubstanz sowie für die Wirkung auf die Zellzykluskinetik benötigte Zeit den optimalen Zeitpunkt für die Feststellung von Chromosomenaberrationen beeinflussen kann, wird empfohlen, 24 Stunden nach der ersten Aufarbeitung eine weitere Aufarbeitung vorzunehmen. Werden Verabreichungsschemata gewählt, die über einen Tag hinausgehen, sollte die Probenahme im Anschluss an die letzte Behandlung nach Ablauf eines Zeitraums erfolgen, der der l,5-fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht.

Vor der Tötung wird den Tieren intraperitoneal eine geeignete Dosis eines Spindelgifts (z. B. Colcemid® oder Colchicin) verabreicht. Die Tiere werden dann zu einem geeigneten Zeitpunkt aufgearbeitet. Bei Mäusen beträgt der Zeitabstand ca. 3 bis 5 Stunden, beim chinesischen Hamster ca. 4 bis 5 Stunden. Aus dem Knochenmark werden Zellen gewonnen und auf Chromosomenaberrationen untersucht.

1.5.3. **Dosierungen**

Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen (5). Liegt Toxizität vor, so sind zum ersten Zeitpunkt der Aufarbeitung drei Dosisstufen zu verwenden. Die Dosisstufen sollten den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Bei der späteren Aufarbeitung muss nur die Höchstdosis verwendet werden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, dass höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen. Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität im Knochenmark hervorruft (z. B. eine Reduzierung des Mitoseindex um mehr als 50 %).

1.5.4. **Limit-Test**

Verursacht die Prüfung bei einer Dosis von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Gentoxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen verzichtet werden. Bei Studien von längerer Dauer beträgt die Limit-Dosis 2 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von bis zu 14 Tagen und 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von mehr als 14 Tagen. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

1.5.5. **Verabreichung**

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde bzw. durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von reizenden oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfvolumens dadurch auf ein Minimum zu reduzieren, dass eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

▼B

1.5.6. **Chromosomenpräparation**

Unmittelbar nach der Tötung wird das Knochenmark gewonnen, mit hypotoner Lösung behandelt und fixiert. Die Zellen werden dann auf Objektträger aufgetropft und gefärbt.

1.5.7. **Analyse**

Bei allen behandelten Tieren (einschließlich der Positivkontrollen) und unbehandelten Tieren der Negativkontrollgruppe ist der Mitoseindex als Gradmesser der Zytotoxizität in mindestens 1 000 Zellen pro Tier zu bestimmen.

Bei jedem Tier sind mindestens 100 Zellen zu analysieren. Eine Reduzierung dieser Zahl ist möglich, wenn eine hohe Zahl von Aberrationen beobachtet wird. Alle Objektträger, auch die für die Positiv- und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite zu kodieren. Da es bei der Fixierung häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen unter Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen daher eine Zentromerzahl enthalten, die der Zahl 2n ± 2 entspricht.

2. **DATEN**

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Versuchseinheit ist das Tier. Für jedes Tier sind die Anzahl der bewerteten Zellen, die Zahl der Aberrationen pro Zelle und der Anteil der Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen anzugeben. Für die Versuchs- und Kontrollgruppen sind die unterschiedlichen Typen struktureller Chromsomenaberrationen mit Anzahl und Häufigkeit aufzuführen. Gaps werden getrennt erfasst und angegeben, aber in der Regel nicht bei der Gesamthäufigkeit der Aberrationen berücksichtigt. Gibt es keine Anhaltspunkte für unterschiedliche Reaktionen der Geschlechter, so können die Daten für beide Geschlechter zur statistischen Analyse zusammengefasst werden.

2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine dosisbezogene Zunahme der Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen oder eine eindeutige Zunahme der Anzahl der Zellen mit Aberrationen in einer bestimmten Dosisgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt der Probenahme. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (6). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein. Nicht eindeutige Ergebnisse sollten durch weitere Prüfungen abgeklärt werden, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen.

Eine zahlenmäßige Zunahme der Polyploidie deutet möglicherweise darauf hin, dass die Prüfsubstanz numerische Chromosomenaberrationen hervorzurufen vermag. Eine zahlenmäßige Zunahme der Endoreduplikation ist möglicherweise ein Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz die Zellzyklusprogression zu hemmen vermag (7) (8).

Eine Prüfsubstanz, bei denen die Ergebnisse nicht den oben genannten Kriterien entsprechen, gilt in diesem System als nichtmutagen.

▼B

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, dass sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde des In-vivo-Chromosomenaberrationstests deuten darauf hin, dass die Prüfsubstanz im Knochenmark der untersuchten Spezies Chromosomenaberrationen hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine Chromosomenaberrationen im Knochenmark der untersuchten Spezies hervorruft.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Prüfsubstanz oder ihre Metaboliten in den allgemeinen Blutkreislauf bzw. in das spezifische Zielgewebe gelangen (z. B. systemische Toxizität).

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel:

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt.

Versuchstiere:

— Spezies/Stamm:

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe.

Prüfbedingungen:

— Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;

— Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;

— Begründung der gewählten Dosisstufen;

— Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;

— Begründung für den Verabreichungsweg;

— ggf. Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfsubstanz in den allgemeinen Kreislauf oder in das Zielgewebe gelangt;

— ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);

— Angaben über Futter- und Wasserqualität;

— nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;

— Methoden zur Bestimmung der Toxizität;

▼B

— Bezeichnung des Spindelgifts, Konzentration und Behandlungsdauer;

— Methoden zur Präparation des Objektträgers;

— Kriterien zur Bewertung von Aberrationen;

— Anzahl der analysierten Zellen pro Tier;

— Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

— Toxizitätszeichen;

— Mitoseindex;

— Typ und Anzahl der Aberrationen, für jedes Tier gesondert anzugeben;

— Gesamtzahl der Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;

— Anzahl der Zellen mit Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;

— ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie;

— nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;

— ggf. statistische Analysen;

— Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen;

— Daten zu historischen Negativkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;

— Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: *a Practical Approach,* S. Venitt and J. M. Parry (eds.). IRL Press, Oxford, Washington D. C, 275-306.

(2) Preston. R. J., Dean, B. I., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian In *Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, Mutation *Res.,* 189. 157-165.

(3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J., and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), Basic Mutagenicity *Tests, UKEMS Recommended Procedures.* UKEMS *Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, 115-141.

(4) Tice, R. R. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, Mutation *Res.,* 312, 305-312.

(5) Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker. G., Morton, D, B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in In *Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis,* 7, 313-319.

▼B

(6) Lovell, D. P. Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In *Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Commitee on Guidelines for* Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation *of Mutagenicity Test Data,* D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, 184-232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, Mutation Res. 119, 403-413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.,* 43, 1363-1364.

▼B

## B.12. MUTAGENITÄT — IN-VIVO-ERYTHROZYTEN-MIKROKERNTEST BEI SÄUGERN

### 1. METHODE

Die Methode entspricht der OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

### 1.1. EINLEITUNG

Der In-vivo-Mikrokerntest bei Säugern dient zum Nachweis einer von der Prüfsubstanz in den Chromosomen oder im mitotischen Apparat von Erythroblasten hervorgerufenen Schädigung durch Analyse der Erythrozyten aus dem Knochenmark und/oder dem peripheren Blut von Tieren, in der Regel Nagern.

Zweck des Mikrokerntests ist der Nachweis von Substanzen, die zytogenetische Schäden hervorrufen, durch die es zur Bildung von Mikrokernen mit zurückgebliebenen Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen kommt.

Wenn sich ein Knochenmarkerythroblast zu einem polychromatischen Erythrozyten entwickelt, wird der Hauptkern ausgestoßen. Dabei kann aber ein möglicherweise entstandener Mikrokern im ansonsten entkernten Zytoplasma verbleiben. Die Sichtbarmachung der Mikrokerne wird in diesen Zellen dadurch erleichtert, dass sie keinen Hauptkern aufweisen. Eine Zunahme der Häufigkeit von polychromatischen mikrokernhaltigen Erythrozyten in behandelten Tieren deutet auf die Verursachung einer Chromosomenschädigung hin.

Routinemäßig wird bei diesem Test das Knochenmark von Nagern verwendet, da in diesem Gewebe polychromatische Erythrozyten erzeugt werden. Zur Bestimmung von nicht ausgereiften (polychromatischen) mikrokernhaltigen Erythrozyten im peripheren Blut kann aber auch jede Spezies herangezogen werden, bei der erwiesenermaßen die Milz keine mikrokernhaltigen Erythrozyten abzubauen vermag oder eine ausreichende Sensibilität für den Nachweis von Agenzien, die strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen verursachen, gegeben ist. Mikrokerne lassen sich mit Hilfe einer Reihe von Kriterien differenzieren. Dazu zählen die Feststellung des Vorhandenseins oder Fehlens einer Kinetochor- bzw. Zentromer-DNA in den Mikrokernen. Hauptendpunkt ist die Häufigkeit der nicht ausgereiften (polychromatischen) mikrokernhaltigen Erythrozyten. Werden die Tiere kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 Wochen oder länger behandelt, kommt aber auch der Anteil der Mikrokerne enthaltenden ausgereiften (normochromatischen) Erythrozyten an einer bestimmten Zahl ausgereifter Erythrozyten im peripheren Blut als Endpunkt des Tests in Betracht.

Der In-vivo-Mikrokerntest bei Säugetieren ist für die Bewertung des mutagenen Risikos von besonderer Bedeutung, da er die Berücksichtigung von Faktoren des In-vivo-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und der DNA-Reparaturprozesse ermöglicht, auch wenn diese bei den einzelnen Spezies, Gewebearten und genetischen Endpunkten unterschiedlich sind. Ein In-vivo-Versuch ist auch für weitere Untersuchungen der mittels In-vitro-System festgestellten mutagenen Wirkungen von Nutzen.

Gibt es Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz oder ein reaktiver Metabolit das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Test nicht geeignet.

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

1.2. DEFINITIONEN

**Zentromer (Kinetochor):** Region(en) eines Chromosoms, an die während der Zellteilung die Spindelfasern anhaften, wodurch die ordnungsgemäße Beförderung der Tochterchromosomen zu den Polen der Tochterzellen ermöglicht wird.

**Mikrokerne:** kleine Kerne zusätzlich zu den Hauptkernen der Zellen und von diesen getrennt, die während der Telophase der Mitose (Meiose) durch zurückgebliebene Chromosomenteile oder ganze Chromosomen gebildet werden.

**Normochromatischer Erythrozyt:** reifer Erythrozyt, der keine Ribosomen aufweist und sich von unreifen polychromatischen Erythrozyten mit Hilfe ribosomenselektiver Farbstoffe unterscheiden lässt.

**Polychromatischer Erythrozyt:** unreifer Erythrozyt, der sich in seiner Zwischenstufe der Entwicklung befindet und noch Ribosomen enthält, so dass er sich mit Hilfe ribosomenselektiver Farbstoffe von reifen normochromatischen Erythrozyten unterscheiden lässt.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Prüfsubstanz wird den Tieren über einen geeigneten Applikationsweg verabreicht. Bei Verwendung von Knochenmark werden sie zu einem geeigneten Zeitpunkt nach der Behandlung getötet. Das Knochenmark wird entnommen, präpariert und gefärbt (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Findet peripheres Blut Verwendung, so wird es zu geeigneten Zeitpunkten nach der Behandlung entnommen, und es werden Ausstrichpräparate hergestellt und gefärbt (4) (8) (9) (10). Bei Versuchen mit peripherem Blut sollte zwischen der letzten Exposition und der Zellgewinnung möglichst wenig Zeit vergehen. Die Präparate werden auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht.

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Vorbereitungen**

1.4.1.1. *Versuchstiere*

Bei Verwendung von Knochenmark ist der Einsatz von Mäusen oder Ratten zu empfehlen, doch kommt jede geeignete Säugerspezies in Betracht. Wird peripheres Blut verwendet, so empfiehlt sich der Einsatz von Mäusen. Es kommt aber auch jede andere geeignete Säugerspezies in Frage, wenn es sich um eine Spezies handelt, bei der erwiesenermaßen die Milz keine mikrokernhaltigen Erythrozyten abbaut oder eine ausreichende Empfindlichkeit für den Nachweis von Agenzien, die strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen verursachen, gegeben ist. Es sollten junge gesunde Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert möglichst gering sein und bei beiden Geschlechtern nicht mehr als ± 20 % betragen.

1.4.1.2. *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert von 50-60 % anzustreben.

▼B

1.4.1.3. *Vorbereitung der Tiere*

Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt. Die Käfige sind so anzuordnen, dass sich ihre Position möglichst wenig auswirkt.

1.4.1.4. *Vorbereitung der Dosierung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

1.4.2. **Prüfbedingungen**

1.4.2.1. *Lösungsmittel/Vehikel*

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht in Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

1.4.2.2. *Kontrollen*

Bei jedem Versuch sind gleichzeitig Positiv- und Negativkontrollen für jedes Geschlecht anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

Die Positivkontrollen sollten in vivo Mikrokerne bei Expositionskonzentrationen hervorrufen, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben. Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, dass die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Auswerten nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es ist vertretbar, dass die Positivkontrolle auf anderem Wege als die Prüfsubstanz verabreicht wird und nur eine Aufarbeitung erfolgt. Gegebenenfalls könnte eine zusätzliche Positivkontrolle herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die zu prüfende Substanz. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

| Substanz | CAS-Nummer | EINECS-Nummer |
|---|---|---|
| Ethylmethansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| N-ethyl-N-nitrosoharnstoff | 759-73-9 | 212-072-2 |
| Mitomycin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| Cyclophosphamid<br>Cyclophosphamidmonohydrat | 50-18-0<br>6055-19-2 | 200-015-4 |
| Triethylenmelamin | 51-18-3 | 200-083-5 |

▼B

Zu jedem Zeitpunkt der Probenahme sind Tiere der Negativkontrolle einzubeziehen, die nur ein Lösungsmittel oder Vehikel erhalten und ansonsten ebenso wie die Behandlungsgruppen behandelt werden, soweit nicht aus historischen Kontrolldaten akzeptable Werte zur Variabilität der Tiere und Häufigkeit der Zellen mit Mikrokernen vorliegen. Erfolgt bei den Negativkontrollen nur eine einzige Aufarbeitung, so ist dafür die erste Aufarbeitung der günstigste Zeitpunkt. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrolltiere verwendet werden, soweit nicht historische oder veröffentlichte Kontrolldaten belegen, dass das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

Bei Verwendung von peripherem Blut ist als gleichzeitige Negativkontrolle möglicherweise auch eine vor der Behandlung entnommene Probe vertretbar, jedoch nur bei Kurzzeitstudien an peripherem Blut (z. B. 1 bis 3 Gaben) und unter der Voraussetzung, dass sich die gewonnenen Daten in dem Bereich bewegen, den die historische Kontrolle erwarten lässt.

1.5. VERFAHREN

1.5.1. **Anzahl und Geschlecht der Tiere**

Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe muss pro Geschlecht mindestens 5 analysierbare Tiere umfassen (11). Wenn zum Zeitpunkt der Studie Daten aus Untersuchungen zur gleichen Spezies und Expositionsform vorliegen, die belegen, dass zwischen den Geschlechtern kein nennenswerter Unterschied der Toxizität feststellbar ist, reicht die Prüfung von Tieren nur eines Geschlechts aus. Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z. B. bei bestimmten pharmazeutischen Wirkstoffen, ist der Versuch an Tieren des betreffenden Geschlechts durchzuführen.

1.5.2. **Behandlungsplan**

Es lässt sich kein Standard-Behandlungsplan (d. h. 1, 2 oder mehr Gaben im Abstand von 24 Stunden) empfehlen. Die bei längerer Verabreichung entnommenen Stichproben sind akzeptabel, solange für diese Studie ein positives Ergebnis nachgewiesen wurde bzw. solange bei einer negativen Studie Toxizität nachgewiesen oder die Limit-Testdosis verwendet wurde und die Verabreichung bis zum Zeitpunkt der Probenahme erfolgt Die Gabe kann aber auch in Form von zwei Teilmengen erfolgen, die am gleichen Tag im Abstand von wenigen Stunden verabreicht werden, wenn es sich um ein großes Materialvolumen handelt.

Die Prüfung kann auf zweierlei Weise durchgeführt werden:

a) Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz einmal. Knochenmark wird mindestens zweimal aufgearbeitet, wobei die erste Aufarbeitung frühestens 24 Stunden nach Applikation und die letzte spätestens 48 Stunden nach Applikation erfolgen muss. Zwischen den Aufarbeitungsweiten müssen angemessene Abstände sein. Wird eine Probe bereits früher als 24 Stunden nach der Behandlung entnommen, so ist dies zu begründen. Bei Verwendung peripheren Bluts werden mindestens zweimal Proben entnommen, wobei die erste Probenahme frühestens 36 Stunden nach der Behandlung und die letzte spätestens 72 Stunden nach der Behandlung zu erfolgen hat und nach der ersten Probenahme entsprechende Abstände einzuhalten sind. Wird bei einer Probenahme eine positive Reaktion verzeichnet, so ist die Entnahme weiterer Proben nicht erforderlich.

▼B

b) Bei zwei oder mehr Gaben pro Tag (d. h. zwei oder mehr Gaben im Abstand von 24 Stunden) sind die Proben bei der Verwendung von Knochenmark einmal zwischen 18 und 24 Stunden nach der letzten Gabe und bei Verwendung von peripherem Blut einmal zwischen 36 und 48 Stunden nach der letzten Gabe zu entnehmen (12).

Bei Bedarf können zu anderen Zeitpunkten weitere Probenahmen erfolgen.

1.5.3. **Dosierungen**

Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen (13). Liegt Toxizität vor, so sind zum ersten Zeitpunkt der Probenahme drei Dosisstufen zu verwenden. Die Dosisstufen sollten den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Bei der späteren Probenahme muss nur die Höchstdosis verwendet werden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, dass höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen. Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität im Knochenmark hervorruft (z. B. eine Reduzierung des Anteils unreifer Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten im Knochenmark oder peripheren Blut).

1.5.4. **Limit-Test**

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist eine Gentoxizität angesichts von Daten für strukturverwandte Substanzen nicht zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen verzichtet werden. Bei Studien von längerer Dauer beträgt die Limit-Dosis 2 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von bis zu 14 Tagen und 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von mehr als 14 Tagen. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

1.5.5. **Verabreichung**

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde bzw. durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von reizenden oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfvolumens dadurch auf ein Minimum zu reduzieren, dass eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

▼B

1.5.6. **Knochenmark/Blutpräparation**

Die Knochenmarkzellen werden in der Regel unmittelbar nach der Tötung aus den Oberschenkel- oder Schienbeinknochen gewonnen. Dabei werden die Zellen gewöhnlich aus den Oberschenkel- oder Schienbeinknochen entnommen und unter Verwendung erprobter Methoden präpariert und gefärbt. Das periphere Blut wird aus der Schwanzvene oder einem anderen geeigneten Blutgefäß entnommen. Die Blutzellen werden sofort supravital gefärbt (8) (9) (10), oder es werden Ausstrichpräparate hergestellt und dann gefärbt. Durch Verwendung eines DNA-spezifischen Farbstoffs (z. B. Acridin Orange (14) oder Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)) lassen sich bestimmte Artefakte vermeiden, die bei Verwendung eines nicht DNA-spezifischen Farbstoffs auftreten. Trotz dieses Vorteils ist aber die Verwendung herkömmlicher Farbstoffe (z. B. Giemsa) nicht ausgeschlossen. Zusätzliche Systeme (z. B. Cellulosesäulen zur Entfernung kernhaltiger Zellen (16)) können ebenfalls verwendet werden, falls sich diese Systeme nachweislich bei der Mikrokernpräparation im Labor bewährt haben.

1.5.7. **Analyse**

Der Anteil unreifer Erythrozyten an der Gesamtzahl (unreife + reife Erythrozyten) wird für jedes Tier bestimmt, indem bei Verwendung von Knochenmark mindestens 200 Erythrozyten und bei Verwendung von peripherem Blut mindestens 1 000 Erythrozyten gezählt werden (17). Alle Objektträger, auch die für Positiv und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Analyse von unabhängiger Seite zu kodieren. Je Tier werden mindestens 2 000 unreife Erythrozyten auf das Vorhandensein von unreifen mikrokernhaltigen Erythrozyten untersucht. Zusätzlichen Aufschluss kann die Untersuchung reifer Erythrozyten auf Mikrokerne geben. Bei der Analyse der Objektträger sollte der Anteil der unreifen Erythrozyten nicht weniger als 20 % des Kontrollwerts betragen. Werden die Tiere kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 Wochen oder länger behandelt, können auch mindestens 2 000 reife Erythrozyten pro Tier auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht werden. Automatisierte Analysesysteme (Bildanalyse und Zellsuspensions-Durchflusszytometrie) stellen bei entsprechender Begründung und Validierung vertretbare Alternativen zur manuellen Auswertung dar.

2. **DATEN**

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Versuchseinheit ist das Tier. Für jedes Tier gesondert sind die Anzahl der bewerteten unreifen Erythrozyten, die Anzahl der unreifen mikrokernhaltigen Erythrozyten und der Anteil der unreifen Erythrozyten an der Gesamterythrozytenzahl anzugeben. Werden die Tiere kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 Wochen oder länger behandelt, sollten auch die Daten über die reifen Erythrozyten angegeben werden, wenn sie erfasst wurden. Für jedes Tier wird der Anteil der unreifen Erythrozyten an der Gesamterythrozytenzahl und ggf. der Anteil der mikrokernhaltigen Erythrozyten angegeben. Gibt es keine Anhaltspunkte für unterschiedliche Reaktionen der Geschlechter, so können die Daten für beide Geschlechter zur statistischen Analyse zusammengefasst werden.

▼B

2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine dosisbezogene Zunahme der Anzahl von Mikrokernzellen oder eine deutliche Zunahme der Anzahl von Mikrokernzellen in einer bestimmten Dosisgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt der Probenahme. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (18) (19). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein. Nicht eindeutige Ergebnisse sollten durch weitere Prüfungen abgeklärt werden, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen.

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den oben genannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem Test als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, dass sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Ergebnisse des Mikrokerntests deuten darauf hin, dass die Prüfsubstanz Mikrokerne verursacht, die infolge einer Chromosomenschädigung oder einer Schädigung des mitotischen Apparats in den Erythroblasten der geprüften Spezies entstehen. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen in den unreifen Erythrozyten der geprüften Spezies keine Mikrokerne verursacht.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Prüfsubstanz oder ihre Metaboliten in den allgemeinen Blutkreislauf oder in das spezifische Zielgewebe gelangen (z. B. systemische Toxizität).

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

*PRÜFBERICHT*

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel:

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/-Vehikel, falls bekannt;

Versuchstiere:

— Spezies/Stamm;

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe;

Prüfbedingungen:

— Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;

— Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;

▼B

— Begründung der gewählten Dosisstufen;

— Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz:

— Begründung für den Verabreichungsweg;

— ggf. Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfsubstanz in den allgemeinen Kreislauf oder in das Zielgewebe gelangt;

— ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);

— Angaben über Futter- und Wasserqualität;

— nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;

— Methoden zur Präparation des Objektträgers;

— Methoden zur Bestimmung der Toxizität;

— Kriterien zur Bewertung unreifer mikrokernhaltiger Erythrozyten:

— Zahl der analysierten Zellen pro Tier;

— Kriterien zur Bewertung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

— Toxizitätszeichen;

— Anteil der unreifen Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten;

— Anzahl der unreifen mikrokernhaltigen Erythrozyten, für jedes Tier gesondert anzugeben;

— Mittelwert ± Standardabweichung der unreifen mikrokernhaltigen Erythrozyten je Gruppe;

— nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;

— verwendete statistische Analysen und Methoden;

— Daten zu gleichzeitigen und historischen Negativkontrollen;

— Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen.

— Diskussion der Ergebnisse.

— Schlussfolgerungen.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.,* 18, 187-190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res*., 31, 9-15.

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res*. 123, 61-118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C, Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.,* 239, 29-80.

▼B

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology,* ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, 555-558.

(6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A. Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.,* 189, 103-112.

(7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The in *vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, Fund. Appl. *Toxicol.* 14, 513-522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.,* 245, 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/-JEMMS, MMS, *Mutation Res.,* 278, 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis,* 10, 153-159.

(11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchicrotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo,* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res*., 312, 293-304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis, 10,* 313-319.

(13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis,* 7, 313-319.

(14) Hayashi, M, Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, Mutation Res., 120, 241-247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res*., 120, 269-275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 213, 91-104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation *Res*., 347, 97-99.

▼B

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity tests. *UKEMS Recommended Procedures. UKEMS* Sub-Committee *on* Guidelines *for* Mutagenicity Testing. Report, *Part I, revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 115-141.

(19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of in Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical *Evaluation of* Mutagenicity Test *Data.* UKEMS Sub-Committee *on* Guidelines *for Mutagenicity* Testing. Report, Part *III,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 184-232.

▼B

B.13./14. **MUTAGENITÄT — RÜCKMUTATIONSTEST UNTER VERWENDUNG VON BAKTERIEN**

1. **METHODE**

Diese Methode entspricht den OECD TG 471, Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1. EINLEITUNG

Beim Rückmutationstest an Bakterien werden Stämme von Salmonella typhimurium und Escherichia coli, die Aminosäure benötigen, zum Nachweis von Punktmutationen verwendet, die Substitution, Addition oder Deletion eines oder mehrerer DNA-Basenpaare umfassen (1) (2) (3). Der unter Verwendung von Bakterien durchgeführte Rückmutationstest beruht auf dem Nachweis von Mutationen, durch die Mutationen in den entsprechenden Stämmen rückgängig gemacht und die funktionale Kapazität der Bakterien zur Synthetisierung einer essenziellen Aminosäure wiederhergestellt wird. Die Revertanten-Bakterien lassen sich an ihrer Fähigkeit zum Wachstum ohne die vom Elternstamm benötigte Aminosäure erkennen.

Punktmutationen sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen. Es spricht manches dafür, dass Punktmutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen somatischer Zellen an der Entstehung von Krebs bei Menschen und Versuchstieren beteiligt sind. Der Rückmutationstest an Bakterien ist wenig zeitaufwendig, kostengünstig und relativ leicht durchzuführen. Viele Versuchsstämme weisen mehrere Merkmale auf, die ihnen eine größere Empfindlichkeit beim Nachweis von Mutationen verleihen, darunter reaktive DNA-Sequenzen an den Reversionsorten, erhöhte Zelldurchlässigkeit gegenüber großen Molekülen und Eliminierung von DNA-Reparatursystemen oder Anstieg der fehlerhaften DNA-Reparaturprozesse. Die Spezifität der Versuchsstämme kann wertvollen Aufschluss über die Typen der von gentoxischen Agenzien ausgelösten Mutationen liefern. Für Rückmutationstests unter Verwendung von Bakterien steht ein sehr umfangreicher Bestand an Ergebnissen für eine Vielzahl von Strukturen zur Verfügung, und es wurden gründlich erprobte Methoden zur Prüfung von Chemikalien mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, darunter flüchtige Verbindungen, entwickelt.

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Ein **Rückmutationstest** bei Salmonella typhimurium oder Escherichia coli dient zum Nachweis von Mutationen, die in einem Stamm auftreten, der eine Aminosäure (Histidin bzw. Tryptophan) benötigt, und zur Bildung eines Stammes führen, der nicht auf eine Aminosäurezufuhr von außen angewiesen ist.

**Basenpaaraustauschmutagene** sind Agenzien, die in DNA eine Basenveränderung verursachen. Bei einem Reversionstest kann diese Veränderung am Ort der ursprünglichen Mutation oder an einem zweiten Ort des bakteriellen Genoms auftreten.

**Rasterschubmutagene** sind Agenzien, die eine Addition oder Deletion von einem oder mehreren Basenpaaren in der DNA verursachen, wodurch sich der Leseraster der RNS verändert.

▼B

1.3. AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

Beim Rückmutationstest an Bakterien werden prokaryotische Zellen verwendet, die sich im Hinblick auf Faktoren wie Aufnahme. Stoffwechsel, Chromosomenstruktur und DNA-Reparaturprozesse von Säugetierzellen unterscheiden. In vitro durchgeführte Versuche erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit einem ln-vitro-Metabolisierungssystem lassen sich aber die In-vivo-Bedingungen bei Säugetieren nicht gänzlich nachvollziehen. Der Test gibt daher keinen direkten Aufschluss über das mutagene und kanzerogene Potential einer Substanz bei Säugetieren.

Der unter Verwendung von Bakterien durchgeführte Rückmutationstest dient in der Regel zur Erstuntersuchung auf gentoxische Aktivität, insbesondere auf Punktmutationen. Aus dem umfangreichen Datenbestand geht hervor, dass sich zahlreiche chemische Stoffe, die bei diesem Test einen positiven Befund ergeben, auch bei anderen Prüfungen als mutagen erweisen. Es gibt allerdings Beispiele dafür, dass mutagene Agenzien nicht durch diesen Test nachgewiesen werden. Zurückzuführen ist dies auf die spezifische Art des ermittelten Endpunkts und auf Unterschiede in der Stoffwechselaktivierung bzw. in der Bioverfügbarkeit. Andererseits können Faktoren, die eine verstärkte Empfindlichkeit des Rückmutationstests an Bakterien bewirken, zu einer Überbewertung der mutagenen Wirkung führen.

Der Rückmutationstest an Bakterien eignet sich möglicherweise nicht zur Bewertung bestimmter Klassen von chemischen Substanzen, so etwa von stark bakteriziden Verbindungen (z. B. bestimmten Antibiotika) und Stoffen, die vermutlich (oder nachweislich) in das Zellreplikationssystem von Säugetieren eingreifen (z. B. bestimmten Topoisomerasehemmern und Nucleosidanalogen). In diesen Fällen sind wohl Mutationstests an Säugetieren eher angebracht.

Zahlreiche Verbindungen, die bei diesem Test einen positiven Befund ergeben, haben zwar eine kanzerogene Wirkung auf Säugetiere, doch besteht keine absolute Korrelation. Ausschlaggebend ist die chemische Klasse, und bestimmte Kanzerogene sind durch diesen Test nicht nachweisbar, weil ihre Wirkung auf anderen, nicht gentoxischen Mechanismen oder in Bakterienzellen fehlenden Mechanismen beruht.

1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Suspensionen von Bakterienzellen werden mit und ohne ein exogenes Stoffwechselaktivierungssystem mit der Prüfsubstanz behandelt. Bei der Platteninkorporationsmethode werden die Suspensionen mit Schichtagar vermischt und unmittelbar danach auf einem Minimalmedium ausgestrichen. Bei der Vorinkubationsmethode wird das Prüfgemisch bebrütet und dann mit Schichtagar vermischt, bevor es auf einem Minimalmedium ausgestrichen wird. Bei beiden Verfahren wird nach einer Inkubationszeit von zwei oder drei Tagen die Anzahl der Revertanten-Kolonien bestimmt und mit der Anzahl der spontanen Revertanten-Kolonien auf den Lösungsmittel-Kontrollplatten verglichen.

Es wurden verschiedene Verfahren zur Durchführung des Rückmutationstests an Bakterien beschrieben. Zu den gebräuchlichsten Verfahren zählen die Platteninkorporationsmethode (1) (2) (3) (4), die Vorinkubationsmethode (2) (3) (5) (6) (7) (8), die Fluktuationsmethode (9) (10) und die Suspensionsmethode (11). Beschrieben wurden auch Abänderungen zur Untersuchung von Gasen oder Dämpfen (12).

▼B

Die hier beschriebenen Verfahren beziehen sich im Wesentlichen auf die Platteninkorporations- und Vorinkubationsmethode. Beide sind für die Durchführung von Versuchen mit und ohne Stoffwechselaktivierungssystem geeignet. Einige Substanzen lassen sich möglicherweise besser mit der Vorinkubationsmethode nachweisen. Sie gehören chemischen Klassen an, zu denen unter anderem kurzkettige aliphatische Nitrosamine, bivalente Metalle, Aldehyde, Azofarbstoffe und Diazoverbindungen, Pyrollizidinalkaloide, Allylverbindungen und Nitroverbindungen zählen (3). Dabei wird anerkannt, dass bestimmte Klassen von Mutagenen bei Anwendung von Standardverfahren wie der Platteninkorporations- oder Vorinkubationsmethode nicht immer nachweisbar sind. Diese sind als „Sonderfälle" anzusehen, zu deren Nachweis unbedingt alternative Verfahren eingesetzt werden sollten. Es könnten sich die folgenden „Sonderfälle" ergeben (mit Beispielen für möglicherweise geeignete Nachweisverfahren): Azofarbstoffe und Diazoverbindungen (3) (5) (6) (13), Gase und flüchtige chemische Stoffe (12) (14) (15) (16) sowie Glycoside (17) (18). Abweichungen von den Standardverfahren sind wissenschaftlich zu begründen.

1.5. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.5.1. **Vorbereitungen**

1.5.1.1. *Bakterien*

Frische Bakterienkulturen sollten bis zur späten exponentiellen oder frühen stationären Wachstumsphase kultiviert werden (ca. $10^9$ Zellen pro ml). Kulturen, die sich im Spätstadium der stationären Phase befinden, sind nicht heranzuziehen. Entscheidend ist dabei, dass die zur Prüfung verwendeten Kulturen einen hohen Anteil an lebensfähigen Bakterien enthalten. Der Anteil lässt sich entweder anhand historischer Kontrolldaten über Wachstumskurven bestimmen oder aber für jeden Versuch gesondert durch Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Zellen mittels eines Plattentests.

Die empfohlene Inkubationstemperatur beträgt 37 °C.

Es sind mindestens fünf Bakterienstämme zu verwenden. Dazu sollten vier Stämme von S. typhimurium (TA 1535; TA 1537 oder TA 97a oder TA 97; TA 98; und TA 100) gehören, die erwiesenermaßen zuverlässige und in anderen Labors reproduzierbare Ergebnisse liefern. Diese vier Stämme von S. typhimurium weisen am primären Reversionslocus GC-Basenpaare auf. Bekannt ist, dass möglicherweise bestimmte oxidierende Mutagene, cross-linking induzierende Agenzien und Hydrazine damit nicht nachzuweisen sind. Diese Substanzen lassen sich durch Stämme von E. Coli WP2 oder S. typhimurium TA 102 (19) nachweisen, die am primären Reversionslocus ein AT-Basenpaar aufweisen. Empfohlen wird daher eine Kombination folgender Stämme:

— S. typhimurium TA 1535 und

— S. typhimurium TA 1537 oder TA 97 oder TA 97a und

— S. typhimurium TA 98 und

— S. typhimurium TA 100 und

— E. coli WP2 uvrA oder E. coli WP2 uvrA (pKMI01) oder S. typhimurium TA 102.

Zum Nachweis cross-linking induzierender Mutagene ist es vielleicht ratsam, TA 102 einzubeziehen oder einen reparatur-profizienten Stamm von E. coli (z. B. E. coli WP 2 oder E. coli WP2 (pKM101)) hinzuzugeben.

▼B

Zur Vorbereitung der Stammkulturen, zur Verifizierung der Marker und zur Lagerung sollten bewährte Verfahren verwendet werden. Der wachstumsbedingte Aminosäurebedarf ist für jedes tiefgefrorene Stammkulturpräparat nachzuweisen (Histidin bei Stämmen von S. typhimurium und Tryptophan bei Stämmen von E. coli). Auch andere phänotypische Merkmale sind zu überprüfen, so ggf. das Vorhandensein oder Fehlen von R-Faktor-Plasmiden (d. h. die Ampicillinresistenz bei den Stämmen TA 98, TA 10Ü und TA 97a oder TA 97, WP2 uvrA und WP2 uvrA (pKM101) und die Ampicillin- + Tetracyclinresistenz bei den Stämmen TA 102); das Vorhandensein charakteristischer Mutationen (d. h. rfa-Mutation bei S. typhimurium durch Empfindlichkeit gegenüber Kristallviolett und uvr A-Mutation bei E. coli oder uvrB-Mutation bei S. typhimurium durch Empfindlichkeit gegenüber ultraviolettem Licht) (2) (3). Zudem sollten die Stämme eine Anzahl von Spontan-Revertanten-Kolonien in Häufigkeitsbereichen aufweisen, die anhand der historischen Kontrolldaten des Labors zu erwarten sind, und möglichst innerhalb des in der Literatur angegebenen Bereichs liegen.

1.5.1.2. *Medium*

Verwendet werden geeigneter Minimalagar (z. B. aus Vogel-Bonner-Minimalmedium E und Glucose) und Schichtagar mit Histidin und Biotin oder Tryptophan, damit mehrere Zellteilungen erfolgen können (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Stoffwechselaktivierung*

Die Behandlung der Bakterien mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (1) (2) oder einem Gemisch aus Phenobarbital und β-Naphthoflavon (18) (20) (21) vorbehandelt wurden. Die post-mitochondriale Fraktion wird im S9-Gemisch in der Regel in Konzentrationen von 5 bis 30 % v/v verwendet. Wahl und Status des Stoffwechselaktivierungssystems sind möglicherweise von der geprüften chemischen Klasse abhängig. In bestimmten Fällen ist es ggf. zweckmäßig, mehr als eine Konzentration der post-mitochondrialen Fraktion zu verwenden. Bei Azofarbstoffen und Diazoverbindungen ist möglicherweise eher der Einsatz eines reduktiven Stoffwechselaktivierungssystems angebracht (6) (13).

1.5.1.4. *Prüfsubstanz/Zubereitung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Behandlung der Bakterien in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können den Versuchssystemen vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen, und es sollte mit dem Überleben der Bakterien und der S9-Aktivität kompatibel sein (22). Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Bei der Prüfung wasserinstabiler Substanzen sollten die verwendeten organischen Lösungsmittel frei von Wasser sein.

▼B

1.5.2. **Prüfbedingungen**

1.5.2.1. *Versuchsstämme (siehe 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Expositionskonzentrationen*

Zu den Kriterien, die bei der Bestimmung der höchsten Konzentration der Prüfsubstanz zu berücksichtigen sind, zählen die Zytotoxizität und die Löslichkeit im Endgemisch.

Es ist möglicherweise sinnvoll, die Zytotoxizität und Unlöslichkeit in einem Vorversuch zu bestimmen. Aufschluss über die Zytotoxizität geben der zahlenmäßige Rückgang der Revertanten-Kolonien, der Wegfall bzw. die Verkleinerung des Hintergrundrasens oder die Überlebensrate der behandelten Kulturen. Die Zytotoxizität einer Substanz verändert sich möglicherweise bei Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems. Die Unlöslichkeit sollte als Ausfällung im Endgemisch unter realen Prüfbedingungen ermittelt werden und mit dem bloßen Auge erkennbar sein.

Bei löslichen nicht zytotoxischen Substanzen wird eine maximale Prüfkonzentration von 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte empfohlen. Im Falle nicht zytotoxischer Substanzen, die bei 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte nicht löslich sind, sollte eine oder mehrere der geprüften Konzentrationen im Endgemisch unlöslich sein. Prüfsubstanzen, die sich bereits unter 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte als zytotoxisch erweisen, sind bis zu einer zytotoxischen Konzentration zu prüfen. Die Ausfällung sollte die Bewertung nicht beeinträchtigen.

Es sind mindestens fünf verschiedene analysierbare Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden, wobei beim ersten Versuch der Abstand zwischen den Prüfpunkten etwa eine halbe Log-Phase (d. h. $\sqrt{10}$) beträgt. Kleinere Abstände sind ggf. angebracht, wenn eine Konzentrations-Effekt-Beziehung untersucht wird. Bei der Bewertung von Substanzen, die größere Mengen an potenziell mutagenen Verunreinigungen enthalten, ist die Prüfung bei Konzentrationen über 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte in Betracht zu ziehen.

1.5.2.3. *Negativ- und Positivkontrollen*

Für jeden Versuch sind gleichzeitig stammspezifische Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel- oder Vehikel-)Kontrollen mit oder ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems anzulegen. Für die Positivkontrollen sind Konzentrationen zu wählen, die die Wirksamkeit des jeweiligen Versuchs belegen.

Bei Versuchen mit Stoffwechselaktivierungssystem sollten die Positivkontrollsubstanzen anhand der verwendeten Bakterienstämme ausgewählt werden.

Die folgenden Substanzen gelten als Beispiele für geeignete Positivkontrollen bei Versuchen mit Stoffwechselaktivierung:

| Substanz | CAS-Nummer | EINECS-Nummer |
|---|---|---|
| 9,10-Dimethylanthracen | 781-43-1 | 212-308-4 |
| 7,12-Dimethylbenz[α]anthracen | 57-97-6 | 200-359-5 |
| Benzo[a]pyren | 50-32-8 | 200-028-5 |
| 2-Aminoantracen | 613-13-8 | 210-330-9 |

▼B

| Substanz | CAS-Nummer | EINECS-Nummer |
|---|---|---|
| Cyclophosphamid | 50-18-0 | 200-015-4 |
| Cyclophosphamidmonohydrat | 6055-19-2 | |

Die folgende Substanz eignet sich als Positivkontrolle bei der reduktiven Stoffwechselaktivierungsmethode

| Substanz | CAS-Nummer | EINECS-Nummer |
|---|---|---|
| Kongorot | 573-58-0 | 209-358-4 |

2-Aminoantracen sollte nicht als alleiniger Gradmesser für die Wirksamkeit des S9-Gemischs dienen. Bei Verwendung von 2-Aminoanthracen sollte jede Charge von S9 ebenfalls durch ein Mutagen gekennzeichnet sein, das eine Stoffwechselaktivierung durch mikrosomale Enzyme, z. B. Benzo[a]pyren oder Dimethylbenzanthracen, erfordert.

Die folgenden Substanzen sind Beispiele für stammspezifische Positivkontrollen bei Versuchen ohne exogenes Stoffwechselaktivierungssystem:

| Substanz | CAS-Nummer | EINECS-Nummer | Stamm |
|---|---|---|---|
| Natriumazid | 26628-22-8 | 247-852-1 | TA 1535 und TA 100 |
| 2-Nitrofluoren | 607-57-8 | 210-138-5 | TA 98 |
| 9-Aminoacridin | 90-45-9 | 201-995-6 | TA 1537, TA 97 und TA 97a |
| ICR 191 | 17070-45-0 | 241-129-4 | TA 1537, TA 97 und TA 97a |
| Cumolhydroperoxid | 80-15-9 | 201-254-7 | TA 102 |
| Mitomycin C | 50-07-7 | 200-008-6 | WP2uvrA und TA 102 |
| N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin | 70-25-7 | 200-730-1 | WP2, WP2uvrA und WP2uvrA (pKM101) |
| 4-Nitroquinolin-l-oxid | 56-57-5 | 200-281-1 | WP2, WP2uvrA und WP2uvrA (pKM101) |
| Furylfuramid (AF2) | 3688-53-7 | | Plasmide enthaltende Stämme |

Es können auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen verwendet werden. Ggf. sollten Positivkontrollen herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehören wie der Prüfstoff.

Es sind Negativkontrollen, die allein aus dem Lösungsmittel oder Vehikel ohne Prüfsubstanz bestehen und auf die gleiche Weise wie die Behandlungskulturen behandelt werden, anzulegen. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrollen verwendet werden, wenn nicht historische Kontrolldaten belegen, dass das gewählte Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

▼B

1.5.3. **Verfahren**

Bei der Platteninkorporationsmethode (1) (2) (3) (4) ohne Stoffwechselaktivierung werden gewöhnlich 0,05 ml oder 0,1 ml Prüflösung, 0,1 ml frische Bakterienkultur (mit ca. $10^8$ lebensfähigen Zellen) und 0,5 ml sterile Pufferlösung mit 2,0 ml Schichtagar vermischt. Für Ansätze mit Stoffwechselaktivierung werden gewöhnlich 0,5 ml Stoffwechselaktivierungsgemisch, das eine ausreichende Menge post-mitochondrialer Fraktion (im Bereich von 5 bis 30 % v/v im Stoffwechselaktivierungsgemisch) enthält, mit Schichtagar (2,0 ml) und zugleich mit den Bakterien und der Prüfsubstanz/Prüflösung vermischt. Der Inhalt jedes Röhrchens wird vermischt und auf der Oberfläche einer Minimalagarplatte ausgegossen. Vor der Inkubation lässt man den Schichtagar verfestigen.

Bei der Vorinkubationsmethode (2) (3) (5) (6) wird die Prüfsubstanz/Prüflösung ca. 20 Minuten oder länger bei 30-37 °C mit dem Versuchsstamm (der ca. $10^8$ lebensfähige Zellen enthält) und der sterilen Pufferlösung oder dem Stoffwechselaktivierungssystem (0,5 ml) vorinkubiert, bevor sie mit dem Schichtagar vermischt und auf der Oberfläche einer Minimalagarplatte ausgegossen wird. Gewöhnlich werden 0,05 oder 0,1 ml Prüfsubstanz/Prüflösung, 0,1 ml Bakterien und 0,5 ml S9-Gemisch oder sterile Pufferlösung mit 2,0 ml Schichtagar vermischt. Die Röhrchen sind während der Vorinkubation mit Hilfe eines Schüttlers zu belüften.

Um die Schwankungsbreite hinreichend beurteilen zu können, sind für jede Dosisstufe drei Platten anzulegen. Die Verwendung von zwei Platten ist vertretbar, wenn dies wissenschaftlich begründet wird. Durch den gelegentlichen Verlust einer Platte wird der Versuch nicht zwangsläufig entwertet.

Gasförmige oder flüchtige Substanzen sind mit Hilfe geeigneter Methoden zu prüfen, z. B. in hermetisch verschlossenen Gefäßen (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubation**

Sämtliche Platten des jeweiligen Versuchs sind 48 bis 72 Stunden bei 37 °C zu bebrüten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte ermittelt.

2. **DATEN**

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten sind als Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte anzugeben. Die Anzahl der Revertanten-Kolonien sowohl auf den Negativkontrollplatten (Lösungsmittelkontrolle und ggf. unbehandelte Kontrolle) als auch auf den Positivkontrollplatten ist ebenfalls zu dokumentieren. Für die Prüfsubstanz und die Positivkontrollen sowie Negativkontrollen (unbehandelte und/oder Lösungsmittelkontrollen) sind die Zahlenwerte der einzelnen Platten, die mittlere Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte und die Standardabweichung aufzuführen.

Bei einer eindeutigen positiven Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich. Nicht eindeutige Ergebnisse sind durch weitere Prüfungen abzuklären, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen. Negative Befunde sind durch Einzelfallprüfung zu bestätigen. In jenen Fällen, in denen eine Bestätigung negativer Befunde nicht für notwendig erachtet wird, ist dies zu begründen. Bei Folgeversuchen sollte die Abänderung der Studienparameter zur Erweiterung des Umfangs der bewerteten Bedingungen in Betracht gezogen werden. Zu den Studienparametern, die für eine Abänderung in Frage kommen, gehören die Abstände der Konzentrationen, die Prüfmethode (Platteninkorporation oder flüssige Vorinkubation) und der Stoffwechselaktivierungsstatus.

▼B

2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine konzentrationsbezogene Zunahme im Prüfbereich und/oder eine reproduzierbare Zunahme der Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte bei einer oder mehreren Konzentrationen in mindestens einem Stamm mit oder ohne Stoffwechselaktivierungssystem (23). Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (24). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den oben genannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem Versuch als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, dass sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde beim Rückmutationstest an Bakterien deuten darauf hin, dass die Prüfsubstanz durch Basenaustausch oder Rasterverschiebungen Punktmutationen im Genom von Salmonella typhimurium und/oder Escherichia coli hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen bei den geprüften Spezies keine mutagene Wirkung auslöst.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/-Vehikel, falls bekannt.

Stämme:

— verwendete Stämme;

— Anzahl der Zellen je Kultur;

— Merkmale des Stammes.

Prüfbedingungen:

— Menge der Prüfsubstanz je Platte (mg/Platte oder µl/Platte) mit Begründung für die Wahl der Dosis und Anzahl der Platten je Konzentration;

— verwendete Medien;

— Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems einschließlich Eignungskriterien;

— Behandlungsverfahren.

Ergebnisse:

— Toxizitätszeichen;

— Ausfällungszeichen;

— Zählwerte der einzelnen Platten;

▼B

— mittlere Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte und Standardabweichung;

— nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;

— ggf. statistische Analysen;

— Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;

— Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Arnes, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, 347-364.

(2) Maron, D. M. and Arnes, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 113, 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.,* 312, 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella* typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency GeneTox Program, *Mutation Res.,* 168, 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters,* 1, 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: Short-term *Test* Systems *for Detecting Carcinogens,* ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 273-285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part* 1 Revised, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press., 13-61.

(8) Aeschacher. H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety,* 8, 167-177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res*., 38, 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 141-161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium, Environmental Mutagenesis,* 3, 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res*., 307, 335-344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.,* 136, 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.,* 19, 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology,* D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/ Salmonella Assay, *Environmental* Mutagenesis, 9, 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salomonella typhimurium, Cancer Res.,* 39, 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Arnes, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sa. USA*, 77, 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis,* 5, 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: In Vitro *Metabolic* Activation *in Mutagenesis Testing,* eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, 85-88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays, *Mutagenesis,* 7, 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Arnes, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/ Microsome Test, Mutation Res., 88, 343-350.

(23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, 83-91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L, Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, 28-65.

▼B

B.15. **MUTAGENITÄT (EINSCHLIESSLICH PRESCREENING BETREFFEND KREBSERZEUGENDE EIGENSCHAFTEN) — GENMUTATION — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Verschiedene haploide und diploide Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* können zur Ermittlung chemisch induzierter Genmutationen verwendet werden. Die Versuche können sowohl mit oder ohne exogenes metabolisierendes System durchgeführt werden.

Vorwärtsmutationssysteme an haploiden Stämmen, wie die Messung der Mutation von roten, adeninabhängigen Mutanten *(ade*-1, *ade*-2) zu doppelt adeninabhängigen weißen Mutanten, und Selektivsysteme, wie die Induktion einer Cycloheximid- und Kanavaninresistenz, werden verwendet.

Bei dem am besten validierten Rückmutationssystem wird der haploide Stamm XV 185-14C verwendet. Er weist die „ochre". Nonsense-Mutationen *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 und *trp* 5-48, die durch Basenaustauschmutagene, die ortsspezifische Mutationen oder „ochre" -Suppressor-Mutationen induzieren, reversibel sind. XV 185-14C weist außerdem den Marker *his* 1-7, eine Missense-Mutation, die hauptsächlich durch Mutationen an einem zweiten Genort reversibel ist, sowie den Marker *hom* 3-10 auf, der durch Rasterschubmutagene reversibel ist.

Der einzige gut validierte Stamm ist $D_7$, der für *ilv* 1-92 homozygot ist.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen und die Kontroll- oder Bezugssubstanzen sind unmittelbar vor der Prüfung in einem geeigneten Lösungsmittel zu lösen. Bei wasserunlöslichen organischen Verbindungen sind organische Lösungsmittel wie Ethanol, Aceton und Dimethylsulfoxid (DMSO) zu verwenden, wobei die Konzentration 2 % v/v nicht überschreiten darf. Die Endkonzentration des Lösungsmittels soll die Überlebensrate und die Wachstumseigenschaften der Zellen nicht signifikant verändern.

▼B

Stoffwechselaktivierung

Die Behandlung der Zellen mit den Prüfsubstanzen sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten exogenen Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen.

Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion aus Lebern von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien vorbehandelt wurden. Auch andere Arten, Gewebe, post-mitochondriale Fraktionen oder Verfahren können sich für die Stoffwechselaktivierung eignen.

*Versuchsbedingungen*

Versuchsstämme

In Genmutationsuntersuchungen werden am häufigsten der haploide Stamm XV 185-14 C und der diploide Stamm $D_7$ verwendet. Auch andere Stämme können sich eignen.

Medien

Zur Bestimmung der Überlebensrate und Mutantenzahl sind geeignete Kulturmedien zu verwenden.

Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Positivkontrollen, unbehandelte und Lösungsmittelkontrollen sind gleichzeitig anzulegen. Für jeden spezifischen Mutationsendpunkt sind geeignete Positivkontrollsubstanzen zu verwenden.

Konzentrationen

Es sind mindestens fünf deutlich unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Bei toxischen Substanzen sollte die höchste Konzentration die Überlebensrate nicht unter 5 bis 10 % senken. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Konzentration von Fall zu Fall festzulegen.

Inkubationsbedingungen

Die Platten werden für 4-7 Tage bei 28 bis 30° C im Dunkeln inkubiert.

Häufigkeiten von Spontanmutationen

Es sind Subkulturen zu verwenden, in denen sich die Spontanmutationshäufigkeiten im üblichen Rahmen bewegen.

▼B

Anzahl der Platten

Mindestens 3 Platten pro Konzentration sind für den Nachweis prototropher Zellen, die durch Genmutation erzeugt werden, und zur Ermittlung der Überlebensrate anzulegen. Bei Versuchen, die Marker wie *hom* 3-10 mit einer geringen Mutationsrate verwenden, ist die Anzahl gleich behandelter Platten zu erhöhen, um statistisch relevante Daten zu erhalten.

*Versuchsdurchführung*

Die Behandlung von *S. cerevisiae*-Stämmen wird im Allgemeinen mit einem Flüssigtest unter Verwendung von stationären oder wachsenden Zellen durchgeführt. Das Ausgangsexperiment sollte mit wachsenden Zellen durchgeführt werden. 1- bis 5-mal $10^7$ Zellen/ml werden bis zu 18 Stunden bei 28 bis 37 °C gegenüber der Prüfsubstanz unter Schütteln exponiert. Während der Behandlung wird eine angemessene Menge des exogenen metabolisierenden Systems beigefügt. Nach der Behandlung werden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und auf einem geeigneten Kulturmedium ausgesät. Nach der Inkubation wird die Überlebensrate und die Genmutationsinduktion auf den Platten quantitativ erfasst. Sind die Befunde des ersten Experiments negativ, so ist ein weiterer Versuch durchzuführen mit Zellen, die sich in der stationären Phase befinden. Sind die Befunde des ersten Experiments positiv, so ist dies durch einen geeigneten unabhängigen Versuch zu bestätigen.

2. **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Anzugeben sind die Anzahl der gezählten Konidien, die Anzahl der Mutanten, die Überlebensrate und die Mutantenhäufigkeit. Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen. Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Methoden erfolgen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— verwendeter Stamm;

— Versuchsbedingungen: Zellen der stationären Phase oder wachsende Zellen, Medienzusammensetzung, Inkubationstemperatur und -dauer, Stoffwechselaktivierungssysteme;

— Behandlungsbedingungen: Konzentrationen, Behandlungsverfahren und -dauer, Behandlungstemperatur, Positiv- und Negativkontrollen;

— Anzahl der gezählten Kolonien, Anzahl der Mutanten, Überlebensrate und Mutantenhäufigkeit, ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung, statistische Auswertung der Daten;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

3.2. INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

B.16. **MITOTISCHE REKOMBINATION — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Bei *Saccharomyces cerevisiae* lässt sich mitotische Rekombination zwischen verschiedenen Genen (oder allgemeiner zwischen einem Gen und dem Zentromer) und innerhalb eines Gens feststellen. Im ersten genannten Fall wird sie mitotisches Crossing-over genannt und erzeugt Reziprokprodukte, während sie im letzteren Fall meistens keine reziproken Ergebnisse hat und als Genkonversion bezeichnet wird. Das Crossing-over wird anhand der Bildung rezessiver homozygoter Kolonien oder Sektoren in einem heterozygoten Stamm bestimmt, die Genkonversion hingegen anhand der Bildung prototropher Revertanten mit zwei verschiedenen defekten Allelen des gleichen Gens in einem auxotrophen heteroallelen Stamm. Die am häufigsten zur Ermittlung der mitotischen Genkonversion verwendeten Stämme sind $D_4$ (heteroallel für *ade* 2 und *trp* 5), $BZ_{34}$ (heteroallel für *arg* 4), $D_7$ (heteroallel für *trp* 5) und JD1 (heteroallel für *his* 4 und *trp* 5). Mitotisches Crossing-over, das rote („red“) und rosafarbene („pink“) homozygote Sektoren erzeugt, lässt sich mit $D_5$ oder mit $D_7$ (der auch zur Messung von mitotischer oder Genkonversion und von Rückmutationen an *ilv* 1-92 dient) ermitteln. Beide Stämme sind heteroallel in Bezug für einander komplimentierende Allele von *ade* 2.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen und die Kontroll- und Bezugssubstanzen sind unmittelbar vor der Prüfung in einem geeigneten Lösungsmittel zu lösen. Bei wasserunlöslichen organischen Verbindungen sind organische Lösungsmittel wie Ethanol, Aceton oder Dimethylsulfoxid (DMSO) zu verwenden, wobei die Konzentration 2 % v/v nicht überschreiten darf. Die Endkonzentration des Lösungsmittels soll die Überlebensrate und die Wachstumseigenschaften der Zellen nicht signifikant verändern.

Stoffwechselaktivierung

Die Behandlung der Zellen mit den Prüfsubstanzen soll sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten exogenen Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion aus Lebern von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien vorbehandelt wurden. Auch andere Arten, Gewebe, post-mitochondriale Fraktionen oder Verfahren können sich für die Stoffwechselaktivierung eignen.

▼B

*Prüfbedingungen*

Versuchsstämme

Die am häufigsten verwendeten Stämme sind die diploiden Stämme $D_4$, $D_5$, $D_7$ und JD1. Auch andere Stämme können sich eignen.

Medien

Zur Bestimmung der Überlebensrate und der Häufigkeit der mitotischen Rekombination werden geeignete Kulturmedien verwendet.

Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Positivkontrollen, unbehandelte und Lösungsmittelkontrollen sind gleichzeitig durchzuführen. Für jeden spezifischen Rekombinationsendpunkt sind geeignete Bezugssubstanzen zu verwenden.

Konzentrationen

Mindestens fünf deutlich unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz sind zu verwenden. Unter anderem sind Zytotoxizität und Löslichkeit zu berücksichtigen. Die niedrigste Konzentration darf sich in keiner Weise auf die Überlebensrate der Zellen auswirken. Bei toxischen Substanzen sollte die höchste geprüfte Konzentration die Überlebensrate nicht unter 5 bis 10 % senken. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Konzentration von Fall zu Fall festzulegen.

Zellen können entweder in der stationären oder in der Wachstumsphase bis zu 18 Stunden gegenüber der Prüfsubstanz exponiert werden. Wird für einen längeren Zeitraum exponiert, sind die Kulturen mikroskopisch auf Sporenbildung zu untersuchen, da deren Vorhandensein den Versuch invalidiert.

Inkubationsbedingungen

Die Platten werden im Dunkeln vier bis sieben Tage lang bei 28 bis 30 °C inkubiert. Die zur Bestimmung der durch mitotisches Crossing-over erzeugten roten („red“) und rosafarbenen („pink“) homozygoten Sektoren verwendeten Schalen sind weitere ein bis zwei Tage gekühlt (4 °C) zu halten, um die Entwicklung der entsprechenden pigmentierten Kolonien zu ermöglichen; erst dann sollte die quantitative Erfassung erfolgen.

Häufigkeit von Spontanmutationen

Es sind Subkulturen zu verwenden, bei denen sich die Häufigkeit spontaner mitotischer Rekombinationen im üblichen Rahmen bewegen.

▼B

Anzahl der Platten

Mindestens 3 Platten pro Konzentration sind für den Nachweis prototropher Zellen, die durch mitotische Genkonversion erzeugt wurden, und zur Bestimmung der Überlebensrate anzulegen. Bei der Bestimmung der durch mitotisches Crossing-over erzeugten rezessiven Homozygotie ist die Anzahl an Platten zu erhöhen, um eine geeignete Anzahl an Kolonien zu erhalten.

*Versuchsdurchführung*

Die Behandlung von *S. cerevisiae*-Stämmen erfolgt gewöhnlich in einem Flüssigtest unter Verwendung von stationären oder wachsenden Zellen. Das Ausgangsexperiment sollte mit wachsenden Zellen durchgeführt werden. 1- bis 5-mal $10^7$ Zellen/ml werden bis zu 18 Stunden bei 28 bis 37 °C gegenüber der Prüfsubstanz unter Schütteln exponiert. Während der Behandlung wird eine angemessene Menge des exogenen metabolisierenden Systems zugegeben.

Nach der Behandlung werden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und auf ein geeignetes Kulturmedium ausgesät. Nach der Inkubation wird die Überlebensrate und die Induktion mitotischer Rekombinationen quantitativ erfasst.

Sind die Befunde des ersten Experiments negativ, so ist ein weiterer Versuch durchzuführen mit Zellen, die sich in der stationären Phase befinden. Sind die Befunde des ersten Experiments positiv, so ist dies durch einen geeigneten unabhängigen Versuch zu bestätigen.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe der Anzahl der gezählten Konidien, der Anzahl der Rekombinationen, der Überlebensrate und der Rekombinationshäufigkeit darzustellen.

Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren erfolgen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— verwendeter Stamm;

— Versuchsbedingungen: Zellen der stationären Phase oder wachsende Zellen, Medienzusammensetzung, Inkubationstemperatur und -dauer, Stoffwechselaktivierungssystem;

— Behandlungsbedingungen: Konzentrationen, Behandlungsverfahren und -dauer, Behandlungstemperatur, Positiv- und Negativkontrollen;

— Anzahl der gezählten Kolonien, Anzahl der Rekombinanten, Überlebensrate und Rekombinationshäufigkeit, ggf. Dosis-Wirkungsbeziehung, statistische Auswertung der Daten;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

▼B

3.2. INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

## B.17. MUTAGENITÄT — IN-VITRO-GENMUTATIONSTEST AN SÄUGETIERZELLEN

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der OECD TG 476, In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

### 1.1. EINLEITUNG

Der In-vitro-Genmutationstest an Säugetierzellen kann zum Nachweis von chemisch induzierten Genmutationen herangezogen werden. Zu den geeigneten Zelllinien gehören Maus-Lymphomazellen L5178Y, die Zelllinien CHO, CHO-AS52 und V79 des chinesischen Hamsters und menschliche Lymphoblastoidzellen TK6 (1). Mit diesen Zelllinien werden in den gebräuchlichsten Systemen Mutationen an den Loci für Thymidinkinase (TK) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) sowie für ein Transgen von Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XPRT) nachgewiesen. Durch den TK-, HPRT- und XPRT-Mutationstest lassen sich unterschiedliche Spektren genetischer Ereignisse ermitteln. Die Autosomenlokation von TK und XPRT ermöglicht ggf. den Nachweis genetischer Ereignisse (z. B. großer Deletionen), die nicht am HPRT-Locus auf den X-Chromosomen feststellbar sind (2) (3) (4) (5) (6).

Beim In-vitro-Genmutationstest an Säugetierzellen können Kulturen von etablierten Zelllinien oder Zellstämmen zum Einsatz kommen. Die verwendeten Zellen werden unter dem Gesichtspunkt der Wachstumsfähigkeit in Kultur und der Stabilität der Spontanmutationshäufigkeit ausgewählt.

In vitro durchgeführte Versuche erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit diesem System lassen sich aber die In-vivo-Bedingungen bei Säugetieren nicht gänzlich nachvollziehen. Es sind unbedingt Bedingungen zu vermeiden, bei denen positive Ergebnisse auftreten, die nicht die intrinsische Mutagenität widerspiegeln und möglicherweise aus Veränderungen des pH-Werts bzw. der Osmolalität oder hochgradiger Zytotoxizität herrühren (7).

Dieser Test dient zum Nachweis möglicher Mutagene und Karzinogene in Säugetierzellen. Viele chemische Verbindungen, bei denen der Test positiv ausfällt, haben eine karzinogene Wirkung auf Säugetiere, doch besteht keine absolute Korrelation zwischen Test und Karzinogenität. Die Korrelation ist von der chemischen Klasse abhängig, und es gibt zunehmende Anzeichen dafür, dass bestimmte Karzinogene durch diesen Test nicht nachweisbar sind, da ihre Wirkung anscheinend auf anderen, nicht gentoxischen Mechanismen oder in Bakterienzellen fehlenden Mechanismen beruht (6).

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

### 1.2. DEFINITIONEN

**Vorwärtsmutation:** Genmutation vom Elterntyp zur mutierten Form, die eine Veränderung oder den Ausfall der Enzymaktivität der Funktion des kodierten Proteins bewirkt.

**Basenpaaraustauschmutagene:** Agenzien, die den Austausch eines oder mehrerer Basenpaare in der DNA verursachen.

**Rasterschubmutagene:** Agenzien, die die Addition oder Deletion von einem oder mehreren Basenpaaren im DNA-Molekül verursachen.

▼B

**Expressionszeit des Phänotyps:** Zeitraum, in dem aus neu mutierten Zellen unveränderte Genprodukte abgebaut werden.

**Mutantenhäufigkeit:** Verhältnis der Anzahl der mutierten Zellen zur Anzahl der lebensfähigen Zellen.

**Relative Gesamtwachstumsrate:** Anstieg der Zellpopulation im Zeitverlauf gegenüber einer Kontrollzellpopulation; ermittelt durch Multiplikation der Suspensionswachstumsrate im Verhältnis zur Negativkontrolle mit der Klonierungseffizienz im Verhältnis zur Negativkontrolle.

**Relative Suspensionswachstumsrate:** Anstieg der Zellpopulation während der Expressionszeit gegenüber der Negativkontrolle.

**Lebensfähigkeit:** Klonierungseffizienz der behandelten Zellen zum Zeitpunkt der Ausplattierung unter selektiven Bedingungen nach der Expressionszeit.

**Überlebensrate:** Klonierungseffizienz der behandelten Zellen beim Ausplattieren nach Ablauf der Behandlungszeit; die Überlebensrate wird gewöhnlich in Relation zur Überlebensrate der Kontrollzellpopulation angegeben.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Zellen, die infolge der Mutation $TK^{+/-} \rightarrow$ TK-/- keine Thymidinkinase (TK) enthalten, sind gegenüber der zytotoxischen Wirkung des Pyrimidinanalogons Trifluorthymidin (TFT) resistent. Bei Anwesenheit von Thymidinkinase sind Zellen hingegen empfindlich gegenüber TFT, das die Hemmung des Zellstoffwechsels verursacht und eine weitere Zellteilung verhindert. So können die Mutantenzellen bei Anwesenheit von TFT proliferieren, während die normalen Zellen, die Thymidinkinase enthalten, nicht dazu in der Lage sind. In ähnlicher Weise werden HPRT- oder XPRT-defiziente Zellen durch Resistenz gegenüber 6-Thioguanin (TG) oder 8-Azaguanin (AG) selektiert. Die Eigenschaften der Prüfsubstanz sind sorgfältig zu beachten, wenn bei einem Genmutationstest an Säugetierzellen ein mit dem selektierenden Agens verwandtes Basenanalogon bzw. eine damit verwandte Verbindung geprüft wird. Beispielsweise sollte jedem Verdacht auf selektive Toxizität der Prüfsubstanz bei mutierenden und nichtmutierenden Zellen nachgegangen werden. Bei der Prüfung von Chemikalien, die strukturell mit dem selektierenden Agens verwandt sind, muss die Leistungsfähigkeit des Selektivsystems bzw. des selektierenden Agens bestätigt werden (8).

Zellen in Suspensions- oder Monoschichtkultur werden über einen angemessenen Zeitraum mit und ohne Metabolisierungssystem mit der Prüfsubstanz behandelt und subkultiviert, um die Zytotoxizität zu bestimmen und vor der Mutantenselektion die Expression des Phänotyps zu ermöglichen (9) (10) (11) (12) (13). Die Zytotoxizität wird gewöhnlich durch Bestimmung der relativen Klonierungseffizienz (Überlebensrate) oder des relativen Gesamtwachstums der Kulturen nach Ablauf der Behandlungszeit ermittelt. Die behandelten Kulturen werden für einen ausreichenden Zeitraum, der für den jeweils gewählten Locus und Zelltyp charakteristisch ist, in einem Wachstumsmedium gehalten, um eine annähernd optimale phänotypische Expression der induzierten Mutationen zu ermöglichen. Die Mutantenhäufigkeit wird bestimmt, indem man eine bekannte Anzahl von Zellen auf ein Medium mit dem selektierenden Agens zur Bestimmung der Mutantenzahl und auf ein Medium ohne selektierendes Agens zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Lebensfähigkeit) aufimpft. Nach einer geeigneten Inkubationszeit werden die Kolonien gezählt. Die Mutantenhäufigkeit wird aus der Anzahl der Mutantenkolonien im selektiven Medium und der Anzahl der Kolonien im nichtselektiven Medium berechnet.

▼B

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Vorbereitungen**

1.4.1.1. *Zellen*

Für diesen Versuch steht eine Reihe von Zelltypen zur Verfügung. Dazu gehören Subklone von L5178Y, CHO-, CHO-AS52-, V79- oder TK6-Zellen. Die bei diesem Test verwendeten Zelltypen sollten nachweislich eine Empfindlichkeit für chemische Mutagene, eine hohe Klonierungseffizienz und eine geringe Spontanmutationshäufigkeit aufweisen. Die Zellen sind auf Mycoplasmaverunreinigung zu überprüfen und bei Verunreinigung nicht heranzuziehen.

Der Test sollte so angelegt werden, dass er ausreichende Sensitivität hat. Die Anzahl der Zellen, die verwendeten Kulturen und Konzentrationen der Prüfsubstanz sollten den vorgegebenen Parametern entsprechen (14). Die Mindestzahl der lebensfähigen Zellen, die die Behandlung überstehen und im jeweiligen Stadium der Prüfung verwendet werden, sollte auf der Spontanmutationshäufigkeit beruhen. Als allgemeine Faustregel gilt die Verwendung einer Anzahl von Zellen, die mindestens dem Zehnfachen des reziproken Wertes der Spontanmutationshäufigkeit entspricht. Es wird aber empfohlen, mindestens $10^6$ Zellen zu verwenden. Es sollten angemessene historische Daten zum verwendeten Zellsystem vorhanden sein, um die durchgängige Aussagefähigkeit des Tests zu belegen.

1.4.1.2. *Kulturmedien und Inkubationsbedingungen*

Zur Kultivierung sind geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße, $CO_2$-Konzentration, Temperatur und Feuchtigkeit) zu verwenden. Die Medien sind entsprechend dem beim Test verwendeten Selektivsystem und Zelltyp auszuwählen. Vor allem ist für Inkubationsbedingungen zu sorgen, die ein optimales Zellwachstum während der Expressionszeit und die Fähigkeit der mutierenden und nichtmutierenden Zellen zur Koloniebildung gewährleisten.

1.4.1.3. *Vorbereitung der Kulturen*

Die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen, auf das Kulturmedium aufgeimpft und bei 37 °C inkubiert. Vor der Verwendung bei diesem Test sind die Kulturen ggf. von bereits vorhandenen Mutantenzellen zu reinigen.

1.4.1.4. *Stoffwechselaktivierung*

Die Behandlung der Bakterien mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Metabolisierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) oder einem Gemisch aus Phenobarbiton und β-Naphtoflavon (19) (20) vorbehandelt wurde.

Im Endmedium wird die post-mitochondriale Fraktion in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 10 % v/v verwendet. Wahl und Bedingungen des Metabolisierungssystems können von der geprüften chemischen Klasse abhängig sein. In bestimmten Fällen ist es ggf. zweckmäßig, mehr als eine Konzentration der postmitochondrialen Fraktion zu verwenden.

▼B

Eine Reihe von Entwicklungen, darunter die Herstellung gentechnisch veränderter Zelllinien zur Expression spezifischer Aktivierungsenzyme, eröffnen vielleicht die Möglichkeit für eine endogene Aktivierung. Die Wahl der verwendeten Zelllinien sollte wissenschaftlich begründet sein (z. B. durch die Relevanz des Isoenzyms Cytochrom P450 für den Stoffwechsel der Prüfsubstanz).

1.4.1.5. *Prüfsubstanz/Zubereitung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können den Versuchssystemen vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

1.4.2. **Prüfbedingungen**

1.4.2.1. *Lösungsmittel/Vehikel*

Die Lösungsmittel/Vehikel sollten nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen, und sie sollten mit dem Überleben der Zellen und der S9-Aktivität kompatibel sein. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Bei der Prüfung wasserinstabiler Substanzen sollten die verwendeten organischen Lösungsmittel frei von Wasser sein. Das Wasser lässt sich durch Zusatz eines Molekularsiebs entfernen.

1.4.2.2. *Expositionskonzentrationen*

Zu den Kriterien, die bei der Bestimmung der höchsten Konzentration zu berücksichtigen sind, zählen die Zytotoxizität, die Löslichkeit im Versuchssystem und die Veränderungen des pH-Werts oder der Osmolalität.

Die Zytotoxizität sollte im Hauptversuch mit und ohne Stoffwechselaktivierung unter Verwendung eines geeigneten Indikators für Zellintegrität und -Wachstum wie relative Klonierungseffizienz (Überlebensrate) oder relatives Gesamtwachstum bestimmt werden. Es ist möglicherweise sinnvoll, die Zytotoxizität und Löslichkeit in einem Vorversuch zu bestimmen.

Es sind mindestens vier analysierbare Konzentrationen zu verwenden. Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten diese Konzentrationen den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Im Normalfall bedeutet dies, dass sich die Konzentrationen maximal um einen Faktor zwischen 2 und 10 unterscheiden. Beruht die höchste Konzentration auf der Zytotoxizität, sollte sie eine relative Überlebensrate (relative Klonierungseffizienz) oder relative Gesamtwachstumsrate von ca. 10 bis 20 % (aber mindestens 10 %) ergeben. Bei relativ nichtzytotoxischen Substanzen sollte die maximale Prüfkonzentration 5 mg/ml, 5 µl/ml oder 0,01 M betragen, je nachdem, welcher Wert am niedrigsten ist.

▼B

Relativ unlösliche Substanzen sind unter Kulturbedingungen bis zur Löslichkeitsgrenze und darüber hinaus zu testen. Eine etwaige Unlöslichkeit ist im Endmedium zu bestimmen, dem die Zellen ausgesetzt werden. Möglicherweise ist es sinnvoll, die Löslichkeit zum Anfang und Abschluss der Behandlung zu bewerten, da sich die Löslichkeit im Versuchssystem während der Exposition aufgrund des Vorhandenseins von Zellen, S9, Serum usw. verändern kann. Die Unlöslichkeit ist mit dem bloßen Auge erkennbar. Die Ausfällung sollte die Bewertung nicht beeinträchtigen.

1.4.2.3. *Kontrollen*

Für jeden Versuch sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel- oder Vehikel-)Kontrollen mit oder ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems anzulegen. Bei Stoffwechselaktivierung sollte die Positivkontrollsubstanz jene Substanz sein, die zur mutagenen Reaktion eine Aktivierung benötigt.

Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

| Stoffwechselaktivierungsstatus | Ort | Substanz | CAS-Nummer | EINECS-Nummer |
|---|---|---|---|---|
| Ohne exogene Stoffwechselaktivierung | HPRT | Ethylmethansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| | | Ethylnitrosoharnstoff | 759-73-9 | 212-072-2 |
| | TK (kleine und große Kolonien) | Methylmethansulfonat | 66-27-3 | 200-625-0 |
| | XPRT | Ethylmethansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| | | Ethylnitrosoharnstoff | 759-73-9 | 212-072-2 |
| Mit exogener Stoffwechselaktivierung | HPRT | 3-Methylcholanthren | 56-49-5 | 200-276-4 |
| | | N-Nitrosodimethylamin | 62-75-9 | 200-549-8 |
| | | 7,12-Dimethylbenzanthracen | 57-97-6 | 200-359-5 |
| | TK (kleine und große Kolonien) | Cyclophosphamid | 50-18-0 | 200-015-4 |
| | | Cyclophosphamidmonohydrat | 6055-19-2 | |
| | | Benzo[a]pyren | 50-32-8 | 200-028-5 |
| | | 3-Methylcholanthren | 56-49-5 | 200-276-5 |
| | XPRT | N-Nitrosodimethylamin (für hohe Konzentrationen von S9) | 62-75-9 | 200-549-8 |
| | | Benzo[a]pyren | 50-32-8 | 200-028-5 |

Es kommen auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen in Betracht. Wenn z. B. ein Labor über historische Datenbestände zu 5-Bromo 2'-deoxyuridin (CAS-Nummer 59-14-3, EINECS-Nummer 200-415-9) verfügt, könnte auch diese Bezugssubstanz zum Einsatz kommen. Gegebenenfalls sollten Positivkontrollen herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehören wie der Prüfstoff.

▼B

Es sind Negativkontrollen zu verwenden, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel oder Vehikel enthält und die auf die gleiche Weise wie die Behandlungskulturen behandelt werden. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrollen verwendet werden, wenn nicht historische Kontrolldaten belegen, dass das gewählte Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

1.4.3. **Verfahren**

1.4.3.1. *Behandlung mit der Prüfsubstanz*

Proliferierende Zellen werden mit und ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt. Die Exposition sollte über einen geeigneten Zeitraum (gewöhnlich 3 bis 6 Stunden) erfolgen. Die Expositionszeit kann sich über einen oder mehrere Zellzyklen erstrecken.

Es sollten für jede überprüfte Konzentration behandelte Zweifach- oder Einfachkulturen herangezogen werden. Bei Einfachkulturen ist die Anzahl der Konzentrationen zu erhöhen, damit eine ausreichende Anzahl von Kulturen zur Analyse vorliegt (d. h. mindestens 8 analysierfähige Konzentrationen). Es sind zweifache Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollkulturen zu verwenden.

Gasförmige oder flüchtige Substanzen sind mit Hilfe geeigneter Methoden zu prüfen, z. B. in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (21) (22).

1.4.3.2. *Bestimmung der Überlebensrate, der Lebensfähigkeit und der Mutantenhäufigkeit*

Am Ende der Expositionszeit werden die Zellen gewaschen und kultiviert, um die Überlebensrate zu bestimmen und die Expression des Mutantenphänotyps zu ermöglichen. Die Bestimmung der Zytotoxizität durch Ermittlung der relativen Klonierungseffizienz (Überlebensrate) oder des relativen Gesamtwachstums der Kulturen erfolgt in der Regel nach Ablauf der Behandlungszeit.

Jeder Locus hat eine bestimmte Mindestzeit, um eine annähernd optimale phänotypische Expression der neu induzierten Mutanten zu ermöglichen (HPRT und XPRT benötigen mindestens 6 bis 8 Tage, TK mindestens 2 Tage). Die Zellen werden in Medien mit und ohne selektierende Agenzien kultiviert, um die Mutantenzahl bzw. die Klonierungseffizienz zu bestimmen. Die Bestimmung der Lebensfähigkeit (zur Berechnung der Mutantenhäufigkeit) erfolgt nach dem Ablauf der Expressionszeit durch Ausplattieren in einem nicht selektierenden Medium.

Wenn die Prüfsubstanz im L5178Y-TK$^{+/-}$-Test einen positiven Befund ergibt, sollte zumindest bei einer der Prüfkulturen (der höchsten positiven Konzentration) und bei den Negativ- und Positivkontrollen eine Größeneinteilung der Kolonien erfolgen. Ergibt die Prüfsubstanz beim L5178Y-TK$^{+/-}$-Test einen negativen Befund, so ist eine Koloniegrößeneinstufung bei den Negativ- und Positivkontrollen durchzuführen. Eine Koloniegrößeneinstufung ist ggf. auch bei Studien mit TK6TK$^{+/-}$ vorzunehmen.

▼B

2. **DATEN**

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Anzugeben sind die Zytotoxizität, die Lebensfähigkeit, die Koloniezahlen und die Mutantenhäufigkeit für die Prüf- sowie Kontrollkulturen. Ergibt der L5178/Y-$TK^{+/-}$-Test einen positiven Befund, werden die Kolonien bei mindestens einer Konzentration der Prüfsubstanz (der höchsten positiven Konzentration) sowie bei den Negativ- und Positivkontrollen nach dem Kriterium kleine oder große Kolonie ausgewertet. Die molekulare und zellgenetische Beschaffenheit von Mutanten mit Bildung großer und Mutanten mit Bildung kleiner Kolonien ist gründlich erforscht (23) (24). Beim $TK^{+/-}$-Test werden die Kolonien nach dem Kriterium normal wachsende (große) oder langsam wachsende (kleine) Kolonie eingestuft (25). Mutantenzellen mit einer erheblichen genetischen Schädigung weisen eine längere Generationszeit auf und bilden daher kleine Kolonien. Die Schädigung kann vom Verlust eines kompletten Gens bis zu karyotypisch erkennbaren Chromosomenaberrationen reichen. Mutanten mit der Bildung kleiner Kolonien treten vor allem bei Chemikalien auf, die starke Chromosomenaberrationen hervorrufen (26). Weniger stark betroffene Mutantenzellen wachsen in ähnlichem Tempo wie die Elternzellen und bilden große Kolonien.

Es ist die Überlebensrate (relative Klonierungseffizienz) oder das relative Gesamtwachstum anzugeben. Unter der Mutantenhäufigkeit ist der zahlenmäßige Anteil der Mutantenzellen an den überlebenden Zellen zu verstehen.

Es sind die Daten für die einzelnen Kulturen zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden.

Bei einer eindeutigen positiven Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich. Nicht eindeutige Ergebnisse sind durch weitere Prüfungen abzuklären, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen. Negative Ergebnisse sind durch Einzelfallprüfung zu bestätigen. In jenen Fällen, in denen eine Bestätigung negativer Ergebnisse nicht für notwendig erachtet wird, ist dies zu begründen. Bei Folgeversuchen sollte die Abänderung der Studienparameter zur Erweiterung des Umfangs der bewerteten Bedingungen in Betracht gezogen werden. Zu den Studienparametern, die für eine Abänderung in Frage kommen, gehören die Abstände der Konzentrationen und der Stoffwechselaktivierungsstatus.

2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine konzentrationsbezogene Zunahme und/oder eine reproduzierbare Zunahme der Mutationsrate. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen. Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den oben genannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem System als nichtmutagen.

▼B

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, dass sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Ergebnisse aus dem In-vitro-Genmutationstest an Säugetierzellen deuten darauf hin, dass die Prüfsubstanz in den verwendeten kultivierten Säugetierzellen Genmutationen hervorruft. Eine reproduzierbare positive Relation zwischen Konzentration und Wirkung ist sehr bedeutsam. Negative Ergebnisse sind ein Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen in den verwendeten kultivierten Säugetierzellen keine Genmutation auslöst.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel:

— Begründung für die Wahl des Vehikels/Lösungsmittels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/-Vehikel, falls bekannt.

Zellen:

— Typ und Herkunft der Zellen;

— Anzahl der Zellkulturen;

— ggf. Passagenanzahl;

— ggf. zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;

— Nichtvorhandensein von Mycoplasma.

Prüfbedingungen:

— Begründung für die Auswahl der Konzentrationen und die Anzahl der Kulturen, darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze, falls vorhanden;

— Medienzusammensetzung, $CO_2$-Konzentration;

— Konzentration der Prüfsubstanz;

— Volumen des Vehikels und der beigegebenen Prüfsubstanz;

— Inkubationstemperatur;

— Inkubationszeit;

— Behandlungsdauer;

— Zelldichte während der Behandlung;

— Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems einschließlich Eignungskriterien;

— Positiv- und Negativkontrollen;

▼B

— Dauer der Expressionszeit (ggf. einschließlich Anzahl der überimpften Zellen, Subkulturen und Medienwechsel);

— selektierende Agenzien;

— Kriterien zur Einstufung der Tests als positiv, negativ oder nicht eindeutig;

— Methoden zur Zählung der lebensfähigen und mutierten Zellen;

— Angaben zur Berücksichtigung der Kolonien nach Größe und Typ (ggf. einschließlich Kriterien für, kleine' und, große' Kolonien).

Ergebnisse:

— Toxizitätszeichen;

— Ausfällungszeichen;

— Angaben zum pH-Wert und zur Osmolalität des Behandlungsmediums, falls ermittelt;

— Koloniegröße, falls bewertet, zumindest für Negativ- und Positivkontrollen;

— ggf. Voraussetzungen des Labors zur Bestimmung von Mutanten mit geringer Koloniebildung durch das L5178Y-$TK^{+/-}$-System;

— nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;

— ggf. statistische Analysen;

— Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen;

— Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;

— Mutantenhäufigkeit.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Moore, M.M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis,* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E. H. Y. and Malling, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 61, 1306-1312.

(3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.,* 94, 467-485.

(4) Moore, M. M., Harington-Brock, K, Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis,* 4, 394-403.

▼B

(5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, Mutation Res., 223, 121-128.

(6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res., 3*12, 235-239.

(7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick. D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.,* 257, 147-204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (198 3), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.,* 115, 225-251.

(9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.,* 196, 17-36.

(10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. R, Riddle, J. C, Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Cuanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.,* 189, 135-141.

(11) Liber, H. L, Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TSC and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.,* 216, 9-17.

(12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and JCR 191-lnduced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.,* 160, 133-147.

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ — $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* Elsevier Science Publishers, New York, 239-268.

(14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.,* 46, 365-373.

(16) Arnes, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res*., 31, 347-364.

▼B

(17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res*., 59, 61-108.

(18) Maron, D. M. and Arnes, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res*., 113, 173-215.

(19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcome, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing,* de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot. R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, 85-88.

(21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents.* New York, Plenum, 91-103.

(22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis,* 5, 795-801.

(23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87.* 51-55.

(24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT) and Mutants of L5178Y/TK Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.,* 151, 161-174.

(25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.,* 229, 89-102.

(26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, Mutagenesis 5, 609-614.

▼B

B.18. **DNS-SCHÄDIGUNG UND -REPARATUR — UNPLANMÄSSIGE DNS-SYNTHESE (UDS) — SÄUGETIERZELLEN — IN VITRO**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Mit dem Test zur unplanmäßigen DNS-Synthese (UDS)-Test wird die DNS-Reparatursynthese nach Ausschneiden und Entfernen des Abschnitts eines DNS-Strangs gemessen, in dem sich die durch chemische und physikalische Agenzien induzierte Schädigung befindet. Der UDS-Test eignet sich zur Ermittlung der „long patch"-Reparatur. Die „short patch" -Reparatur oder Insertion einzelner Nukleotidbasen lässt sich damit nicht oder nur mit einem sehr geringen Empfindlichkeitsgrad feststellen. Der Test beruht auf dem Einbau von tritiummarkiertem Thymidin ($^3$H-TdR) in die DNS von Säugetierzellen, die sich außerhalb der S-Phase des Zellzyklus befinden. Die $^3$H-TdR-Aufnahme lässt sich durch Autoradiografie oder eine Flüssigkeitsszintillationszählung (LSC = Liquid Scintillation Counting) der DNS behandelter Zellen bestimmen. Säugetierzellen in Kultur werden, sofern es sich nicht um primäre Rattenhepatozyten handelt, mit der Prüfsubstanz mit oder ohne Zusatz eines exogenen Stoffwechselaktivierungssystems behandelt. Die UDS lässt sich auch in *In-vivo*-Systemen messen.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen und die Kontroll- oder Bezugssubstanzen sollten in Medien oder in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert werden. Die endgültige Lösungsmittelkonzentration darf die Überlebensrate der Zellen nicht beeinträchtigen.

In diesem Versuch können primäre Kulturen von Rattenhepatozyten, menschlichen Lymphozyten oder etablierten Zelllinien (z. B. menschliche diploide Fibroblasten) verwendet werden.

Die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen.

*Versuchsbedingungen*

Anzahl der Kulturen

Für jeden experimentellen Punkt werden mindestens zwei Zellkulturen für die Autoradiografie verwendet und mindestens sechs Zellkulturen (wenn es wissenschaftlich begründbar ist, können weniger verwendet werden) für das LSC-Verfahren.

▼B

Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Für jeden Versuch sind gleichzeitig Positiv- und (unbehandelte und/-oder Lösungsmittel) Negativkontrollen mit oder ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems anzulegen.

Beispiele für die Positivkontrollen für den Rattenhepatozytenversuch sind: 7,12-Dimethylbenzanthracen (7,12-DMBA) oder 2-Azetylaminofluoren (2-AAF). Werden etablierte Zelllinien verwendet, kann 4-Nitochinolin-N-oxid (4-NAO) als Positivkontrolle für Autoradiografie- und LSC-Versuche ohne Stoffwechselaktivierung dienen. Ein Beispiel für eine Positivkontrolle bei Verwendung von Stoffwechselaktivierungssystemen ist N-Dimethylnitrosamin.

Konzentrationen

Es sind mehrere unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Die höchste Konzentration sollte zytotoxisch wirken. Relativ wasserunlösliche Verbindungen sind bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Konzentration von Fall zu Fall festzulegen.

Zellen

Die Kulturen sind unter geeigneten Bedingungen (Wachstumsmedien, $CO_2$-Konzentration, Temperatur und Feuchtigkeit) zu halten. Etablierte Zelllinien sind periodisch auf Mycoplasmaverunreinigung zu überprüfen. Weiterhin ist eine periodische Überprüfung der Zellen auf Karyotypstabilität ratsam.

Stoffwechselaktivierung

Bei primären Hepatozytenkulturen wird kein exogenes Stoffwechselaktivierungssystem verwendet. Die Behandlung etablierter Zelllinien und Lymphozyten mit der Prüfsubstanz erfolgt sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten exogenen Stoffwechselaktivierungssystems.

*Versuchsdurchführung*

Vorbereitung der Kulturen

Etablierte Zelllinien werden aus Stammkulturen gewonnen (z. B. durch Trypsinierung bzw. Abschütteln), in Kulturgefäße in angemessener Zelldichte überimpft und bei 37 °C inkubiert.

Kurzzeitkulturen von Rattenhepatozyten werden dadurch angelegt, dass man es frisch gewonnenen Hepatozyten ermöglicht, sich in einem geeigneten Medium an die Wachstumsfläche festzuheften.

Kulturen von menschlichen Lymphozyten werden mit geeigneten Verfahren angelegt.

▼B

Behandlung der Kulturen mit der Prüfsubstanz

Primäre Rattenhepatozyten

Frisch isolierte Rattenhepatozyten werden in einem $^{3}$H-TdR enthaltenden Medium während eines angemessenen Zeitraums mit der Prüfsubstanz behandelt. Nach Ende der Behandlung wird das Medium entfernt, die Zellen werden gewaschen, fixiert und getrocknet. Die Objektträger werden in Autoradiografieemulsion getaucht (alternativ dazu können „stripping"-Filme verwendet werden), „belichtet", entwickelt, gefärbt und ausgewertet.

Etablierte Zelllinien und Lymphozyten

Autoradiografieverfahren: Die Zellkulturen werden jeweils während einer angemessenen Zeitdauer mit der Prüfsubstanz behandelt und dann mit $^{3}$H-TdR behandelt. Die Zeiten richten sich nach Art der Substanz, Aktivität des Stoffwechselsystems und Zelltyp. Zur Ermittlung des UDS-Maximums ist $^{3}$H-TdR entweder gleichzeitig mit der Prüfsubstanz oder innerhalb weniger Minuten danach zuzugeben. Für welches dieser beiden Verfahren man sich entscheidet, hängt von der Möglichkeit einer Interaktion zwischen Prüfsubstanz und $^{3}$H-TdR ab. Um zwischen UDS und semikonservativer DNS-Replikation zu unterscheiden, kann letztere z. B. durch Verwendung eines argininfreien Mediums, durch geringen Serumgehalt oder Hydroxyharnstoff im Kulturmedium gehemmt werden.

Messungen der UDS mit dem LSC-Verfahren: Vor Behandlung mit der Prüfsubstanz sollte der Eintritt der Zellen in die S-Phase wie oben beschrieben blockiert werden. Anschließend sind die Zellen wie bei der Autoradiografie beschrieben mit der Prüfsubstanz zu behandeln. Nach Ende der Inkubationszeit extrahiert man die DNS aus den Zellen und bestimmt den gesamten DNS-Gehalt sowie die $^{3}$H-TdR-Einbaurate.

Bei Verwendung nichtstimulierter menschlicher Lymphozyten erübrigen sich die oben genannten Verfahren zur Hemmung der semikonservativen DNS-Replikation.

*Analyse*

*Autoradiografiebestimmung*

Bei der Bestimmung der UDS an Zellen in Kultur werden die S-Phasen-Kerne nicht gezählt. Pro Konzentration sind bei der Zählung mindestens 50 Zellen zu erfassen. Die Objektträger sollten vor der Zählung kodiert werden. Auf jedem Objektträger sind mehrere weit auseinander liegende, nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Felder zu zählen. Das Ausmaß der Hintergrund-Markierung im Zytoplasma ist durch Zählung von drei Bereichen von der Größe eines Kerns im Zytoplasma jeder gezählten Zelle zu bestimmen.

Bestimmungen mit dem LSC-Verfahren

Bei Bestimmungen der UDS mit dem LSC-Verfahren ist eine angemessene Anzahl von Kulturen pro Konzentration und in den Kontrollen zu verwenden.

▼B

Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

2. **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen.

2.1. AUTORADIOGRAFIEBESTIMMUNGEN

Das Ausmaß des $^{3}$H-TdR-Einbaus im Zytoplasma und die Anzahl der Körner über dem Zellkern sind getrennt zu vermerken.

Zur Beschreibung der Verteilung der $^{3}$H-TdR-Hintergrundmarkierung und der Anzahl der Granula pro Kern können Mittelwert, Medianwert und Modalwert verwendet werden.

2.2. BESTIMMUNGEN MIT DEM LSC-VERFAHREN

Bei der Bestimmung mit dem LSC-Verfahren ist der $^{3}$H-TdR-Einbau in dpm/µg DNS anzugeben. Zur Beschreibung der Einbauverteilung kann der Mittelwert für dpm/µg DNS mit Standardabweichung verwendet werden.

Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren erfolgen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— verwendete Zellen, Dichte und Passagenanzahl und Zeitpunkt der Behandlung, Anzahl der Zellkulturen;

— zur Erstellung der Zellkulturen verwendete Verfahren einschließlich Medium, Temperatur und $CO_2$-Konzentrationen;

— Prüfsubstanz, Lösungsmittelkonzentrationen und Begründung für die Wahl der in dem Versuch verwendeten Konzentrationen;

— nähere Angaben zu den Stoffwechselaktivierungssystemen;

— Behandlungsplan;

— Positiv- und Negativkontrollen;

— verwendetes Autoradiografieverfahren;

— zur Blockierung des Eintritts der Zellen in die S-Phase verwendete Verfahren;

— zur DNS-Extraktion und Bestimmung des gesamten DNS-Gehalts im Rahmen des LSC-Verfahrens verwendete Methoden;

— ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;

— statistische Auswertung;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

▼B

3.2. INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

B.19. **IN-VITRO-SCHWESTERCHROMATIDAUSTAUSCH-TEST**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Bei dem Schwesterchromatidaustausch-Test (SCE = Sister Chromatid Exchange) handelt es sich um einen Kurzzeittest zur Ermittlung reziproker Austausche der DNS zwischen zwei Schwesterchromatiden eines sich replizierenden Chromosoms. SCE stellt den Austausch von DNS-Replikationsprodukten an anscheinend homologen Loci dar. Der Austauschprozess umfasst vermutlich Bruch und Reunion der DNS-Stränge, aber über seine Molekulargrundlage ist wenig bekannt. Zur Erkennung des SCE ist es erforderlich, die Schwesterchromatiden unterschiedlich zu markieren, was sich durch Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die Chromosomen-DNS während eines oder zwei Zellzyklen erreichen lässt.

Die Säugetierzellen werden *in vitro* mit und ohne Zusatz eines exogenen Säuger-Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt und während eines oder zweier Replikationszyklen in BrdU enthaltendem Medium kultiviert. Nach Behandlung mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin) zur Akkumulierung der Zellen in einem metaphasenähnlichen Stadium der Mitose (C-Metaphase) werden die Zellen gewonnen und Chromosomenpräparationen hergestellt.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

*Vorbereitung*

— Für diese Versuche können Primärkulturen (z. B. menschliche Lymphozyten) oder etablierte Zelllinien (z. B. Ovarzellen des Chinesischen Hamsters) verwendet werden. Zelllinien sind auf Mycoplasmaverunreinigung zu überprüfen;

— der Versuch ist mit geeigneten Kulturmedien und unter angemessenen Inkubationsbedingungen (z. B. Temperatur, Kulturgefäße, $CO_2$-Konzentration und Feuchtigkeit) durchzuführen;

— die Prüfsubstanzen können in Kulturmedien oder in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert werden, bevor die Behandlung der Zellen beginnt. Die endgültige Konzentration eines Lösungsmittels im Kultursystem darf die Lebensfähigkeit der Zellen bzw. die Wachstumsrate nicht signifikant beeinflussen. Die Beeinflussung der SCE-Häufigkeit ist durch eine Lösungsmittelkontrolle zu überwachen;

▼B

— die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines exogenen Säuger-Metabolierungssystems erfolgen. Werden Zelltypen mit endogener Stoffwechselaktivität verwendet, sollte bekannt sein, dass die Substanzen der entsprechenden chemischen Klasse zu metabolisieren vermögen.

*Versuchsbedingungen*

Anzahl der Kulturen

Für jeden experimentellen Punkt sind mindestens zwei Kulturen zu verwenden.

Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen

Bei jedem Versuch sind Positivkontrollen heranzuziehen sowohl unter Verwendung einer direkt wirksamen Substanz als auch einer Substanz, die eine Stoffwechselaktivierung erfordert. Auch eine Lösungsmittelkontrolle ist zu verwenden.

Folgende Substanzen können beispielsweise als Positivkontrollen verwendet werden:

— direkt wirksame Verbindungen:

  — Ethylmethansulfonat,

— indirekt wirksame Verbindungen:

  — Cyclophosphamid.

Gegebenenfalls kann eine zusätzliche Positivkontrolle mit einer Substanz durchgeführt werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die Prüfsubstanz.

Konzentrationen

Es sind mindestens drei geeignete Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Die höchste Konzentration sollte eine signifikant toxische Wirkung ausüben, muss jedoch noch eine adäquate Zellreplikation zulassen. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Prüfsubstanzkonzentration von Fall zu Fall festzulegen.

*Versuchsdurchführung*

Vorbereitung der Kulturen

Zellen etablierter Zelllinien werden aus Stammkulturen isoliert (z. B. durch Trypsinierung bzw. Abschütteln), in Kulturgefäße in geeigneter Dichte ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Bei einschichtigen Kulturen ist die Anzahl der Zellen pro Kulturgefäß so zu wählen, dass die Kulturen zum Zeitpunkt der Aufarbeitung zu nicht viel mehr als 50 % konfluent sind. Die Zellen können auch in einer Suspensionskultur gehalten werden. Kulturen von menschlichen Lymphozyten werden unter Verwendung geeigneter Verfahren mit heparinisiertem Blut angelegt und bei 37 °C inkubiert.

▼B

Behandlung

Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase werden während einer angemessenen Zeitdauer mit der Prüfsubstanz behandelt. In den meisten Fällen reichen ein bis zwei Stunden aus, doch kann die Behandlungszeit in bestimmten Fällen auf maximal zwei vollständige Zellzyklen verlängert werden. Zellen ohne ausreichende Stoffwechselaktivität sind sowohl mit als auch ohne Zugabe eines geeigneten Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz zu behandeln. Nach Ende der Behandlungszeit wird durch Waschen der Zellen die Prüfsubstanz entfernt. Die Zellen werden während eines oder zweier Replikationszyklen in Anwesenheit von BrdU kultiviert. Alternativ kann die Behandlung der Zellen während der gesamten Kultivierungszeit von zwei Zellzyklen mit der Prüfsubstanz und BrdU gleichzeitig erfolgen.

Kulturen von menschlichen Lymphozyten werden behandelt, während sie sich in semisynchronem Zustand befinden.

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgt zum Zeitpunkt ihrer zweiten Teilung nach der Behandlung, wobei sicherzustellen ist, dass die empfindlichsten Stadien des Zellzyklus mit der Substanz behandelt wurden. An allen Kulturen, denen BrdU beigegeben wurde, sind die entsprechenden Verrichtungen bis zur Gewinnung der Zellen im Dunkeln oder bei entsprechend schwacher Beleuchtung vorzunehmen, um die Fotolyse von BrdU-haltiger DNS so gering wie möglich zu halten.

Gewinnung der Zellen

Ein bis vier Stunden vor der Aufarbeitung werden die Zellkulturen mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin) behandelt. Jede Kultur wird einzeln gewonnen und getrennt zur Chromosomenpräparation aufgearbeitet.

Präparation und Färbung von Chromosomen

Die Chromosomenpräparate werden mit zytogenetischen Standardverfahren angefertigt. Die Färbung der Objektträger zur Darstellung der SCE ist mit verschiedenen Verfahren möglich (z. B. dem Fluoreszensplus-Giemsa-Verfahren).

Analyse

Die Anzahl der zu analysierenden Zellen ist unabhängig von der spontanen SCE-Häufigkeit. Normalerweise werden die SCE in mindestens 25 gut gespreiteten Metaphasen pro Kultur gezählt. Vor der Auswertung werden die Objektträger kodiert. Bei Verwendung menschlicher Lymphozyten wertet man nur die Metaphasen mit 46 Zentromeren aus. Bei Verwendung etablierter Zelllinien werden nur Metaphasen ausgewertet, deren Zentromerzahl dem häufigsten Wert ± 2 entspricht. Er ist anzugeben, ob Farbsprünge im Zentromerbereich als SCE gezählt wurden oder nicht. Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

2. **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Für alle behandelten und Kontrollkulturen sind die SCE-Anzahl pro Metaphase und die SCE-Anzahl pro Chromosom für jede Kultur getrennt anzugeben.

Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren erfolgen.

▼B

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— verwendete Zellen, Zellkulturbedingungen;

— Versuchsbedingungen: verwendete Medien, $CO_2$-Konzentrationen, Konzentration der Prüfsubstanz, verwendete Lösungsmittel, Inkubationstemperatur, Inkubationsdauer, verwendetes Spindelgift (Konzentration und Behandlungsdauer), Typ des verwendeten Säugetier-Metabolisierungssystems, Positiv- und Negativkontrollen;

— Anzahl der Zellkulturen für jeden experimentellen Punkt;

— nähere Angaben über die Herstellung der Chromosomenpräparate;

— Anzahl der analysierten Metaphasen (die Werte sind für jede Kultur getrennt anzugeben);

— SCE-Anzahl pro Metaphase und pro Chromosom (die Werte sind für jede Kultur getrennt anzugeben);

— Kriterien für die Auswertung der SCE;

— Begründung der Dosierungswahl;

— ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;

— statistische Auswertung;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

3.2. INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

B.20. **TEST ZUR ERFASSUNG GESCHLECHTSGEBUNDENER REZESSIVER LETALMUTATIONEN AN *DROSOPHILA MELANOGASTER***

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Mit dem Test zur Erfassung geschlechtsgebundener rezessiver Letalmutationen (sex-linked recessive lethal test = SLRL-Test) an *Drosophila melanogaster* lassen sich Mutationen — sowohl Punktmutationen als auch kleine Deletionen — in der Keimbahn des Insekts feststellen. Es handelt sich um einen Vorwärtsmutationstest, mit dem eine Untersuchung auf Mutationen an etwa 800 Loci auf dem X-Chromosom (etwa 80 % aller X-Chromosom-Loci) möglich ist. Das X-Chromosom enthält etwa ein Fünftel des gesamten haploiden Genoms.

Mutationen im X-Chromosom von Drosophila melanogaster werden in männlichen Trägern des Mutantengens phänotypisch exprimiert. Wenn eine letale Mutation in hemizygotem Zustand vorliegt, fehlt eine der beiden Klassen männlicher Nachkommen, die ein heterozygotes Weibchen normalerweise hervorbringt. Im SLRL-Test erkennt man diese Tatsachen mit Hilfe besonders markierter und angeordneter Chromosomen.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

*Vorbereitung*

Zuchten

Es können Männchen einer genau definierten Wildtypzucht und Weibchen der Zucht Muller-5 verwendet werden. Auch die Verwendung von anderen entsprechend markierten Weibchen mit multiplen invertierten X-Chromosomen ist möglich.

Prüfsubstanz

Die Prüfsubstanzen sind in Wasser zu lösen. Wasserunlösliche Substanzen können in geeigneten Lösungsmitteln (z. B. einer Mischung aus Ethanol und Tween-60 oder 80) gelöst oder suspendiert und dann vor der Verabreichung mit Wasser oder Kochsalzlösung verdünnt werden. Die Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel ist zu vermeiden.

▼B

Anzahl der Tiere

Empfindlichkeit und Signifikanzgrad des Tests sind vorher festzulegen. Die Anzahl der zu analysierenden behandelten Chromosomen hängt in hohem Maß von der spontanen Mutationsrate in entsprechenden Kontrollen ab.

Behandlung

Die Verabreichung kann oral, durch Injektion oder durch Exposition gegenüber Gasen oder Dämpfen erfolgen. Bei oraler Verabreichung kann die Prüfsubstanz in Zuckerlösung gegeben werden. Erforderlichenfalls können die Substanzen in einer 0,7 %igen NaCl-Lösung gelöst und in Thorax oder Abdomen injiziert werden.

Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Negativ-(Vehikel-) und Positivkontrollen sind zu verwenden. Stehen jedoch entsprechende Laborkontrollen zur Verfügung, sind keine gleichzeitigen Kontrollen erforderlich.

Konzentrationen

Es sind drei Konzentrationen zu verwenden. Zur vorläufigen Abschätzung kann eine einzige Konzentration verwendet werden, und zwar entweder die höchste noch verträgliche Konzentration der Prüfsubstanz oder eine Konzentration, die gewisse Toxizitätsanzeichen hervorruft. Bei nichttoxischen Substanzen sollte die Behandlung gegenüber der höchstmöglichen Konzentration erfolgen.

Versuchsdurchführung

Wildtypmännchen (3 bis 5 Tage alt) werden mit der Prüfsubstanz behandelt und einzeln mit mehreren jungfräulichen Weibchen aus der Muller-5-Zucht oder aus einer anderen entsprechend markierten Zucht (mit multiplen invertierten X-Chromosomen) gepaart. Die Weibchen werden alle zwei bis drei Tage durch neue jungfräuliche Tiere ersetzt, um den gesamten Keimzellzyklus abzudecken. Durch die Untersuchung der Nachkommen dieser Weibchen werden Letaleffekte in reifen Spermien, Spermatiden des mittleren oder späten Stadiums, frühen Spermatiden, Spermatozyten und Spermatogonien der behandelten Männchen erfasst.

Heterozygote $F_1$-Weibchen aus den obigen Kreuzungen werden einzeln (d. h. ein Weibchen pro Flasche) mit ihren Brüdern gepaart. In der $F_2$-Generation wird in jeder Kultur festgestellt, ob Wildtypmännchen auftreten oder nicht. Gelangt man aufgrund der Tatsache, dass in einer Kultur keine $F_2$-Männchen mit dem behandelten Chromosom (Wildtyp) beobachtet werden, zu der Annahme, dass das $F_2$-Weibchen Träger eines Letalgens im väterlichen X-Chromosom ist, sind die Töchter dieses Weibchens mit dem gleichen Genotyp zu testen, um festzustellen, ob die Letalität auch in der nächsten Generation wieder auftritt.

2. **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Anzugeben ist die Anzahl der getesteten X-Chromosomen, die Anzahl der unfruchtbaren Männchen und die Anzahl der Letalmutationen für jede Konzentration, für jede Paarungsperiode und jedes behandelte Männchen. Auch sind Cluster verschiedener Größen pro Männchen anzugeben. Die Versuchsergebnisse sind in einem getrennten Versuch zu bestätigen.

▼B

Bei der Auswertung der SLRL-Tests sind geeignete statistische Verfahren zu verwenden. Cluster-Bildung rezessiver Letalmutationen, die von einem Männchen ausgehen, sind mit einem geeigneten statistischen Verfahren zu untersuchen und auszuwerten.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— Zucht: verwendete *Drosophila*-Zuchten oder -Stämme, Alter der Insekten, Anzahl der behandelten Männchen, Anzahl der sterilen Männchen, Anzahl der etablierten $F_2$-Kulturen, Anzahl der $F_2$-Kulturen ohne Nachkommen, Anzahl der in den einzelnen Keimzellstadien festgestellten Chromosomen mit einer Letalmutation;

— Kriterien für die Festlegung der Größe der behandelten Gruppen;

— Versuchsbedingungen: eingehende Beschreibung des Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplans, Expositionskonzentrationen, Toxitätsdaten, ggf. Negativ-(Lösungsmittel-) und Positivkontrollen;

— Kriterien für die Erfassung der Letalmutationen;

— ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;

— statistische Auswertung;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

3.2. INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

B.21. **IN-VITRO-ZELLTRANSFORMATIONSTEST**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

KEINE.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Mit Säugetierzell-Kultursystemen können durch chemische Substanzen induzierte phänotypische Veränderungen *in vitro* ermittelt werden, die mit malignen Transformationen *in vivo* in Zusammenhang gebracht werden. Häufig verwendete Zellen sind: C3H10T 1/2, 3T3, SHE, Fisher-Ratten-Zellen. Die Tests beruhen auf Veränderungen der Zellmorphologie, Fokusbildung oder der Eigenschaft, im Weichagar wachsen zu können. Mit einigen weniger häufig verwendeten Systemen lassen sich andere physiologische oder morphologische Veränderungen der Zellen nach Exposition gegenüber karzinogenen Substanzen feststellen. Für keinen der In-vitro-Test-Endpunkte wurde eine kausale Beziehung zu Krebs nachgewiesen. Mit einigen der Testsysteme lassen sich Tumorpromotoren ermitteln. Die Zytotoxizität kann festgestellt werden anhand der Auswirkung der Prüfsubstanz auf das Koloniebildungsvermögen (Klonierungseffizienz) oder die Wachstumsraten der Kulturen. Durch Ermittlung der Zytotoxizität kann man feststellen, ob die Exposition gegenüber der Prüfsubstanz toxikologisch relevant war, man kann damit jedoch nicht in allen Versuchen die Transformationshäufigkeit berechnen, da bei einigen längere Inkubationszeiten und/oder Neuplattierungen erforderlich sind.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

*Vorbereitung*

Zellen

Je nach verwendetem Transformationstest stehen verschiedene Zelllinien oder primäre Zellen zur Verfügung. Der Untersucher muss sicherstellen, dass die Zellen in dem durchzuführenden Versuch nach der Exposition gegenüber bekannten Karzinogenen die entsprechenden phänotypischen Veränderungen aufweisen und dass Validität und Zuverlässigkeit des Tests in seinem Labor nachgewiesen und dokumentiert wurden.

Medien

Die Medien und Versuchsbedingungen müssen für den durchzuführenden Transformationsversuch geeignet sein.

▼B

Prüfsubstanz

Die Prüfsubstanzen können in einem Kulturmedium oder in geeigneten Vehikeln gelöst oder suspendiert werden, bevor die Behandlung der Zellen beginnt. Die Endkonzentration des Lösungsmittels im Kultursystem darf weder die Überlebensrate noch die Wachstumsrate der Zellen oder die Transformationsinzidenz beeinflussen.

Stoffwechselaktivierung

Die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines exogenen Säugetier-Metabolierungssystems erfolgen. Werden Zelltypen mit endogener Stoffwechselaktivität verwendet, sollte bekannt sein, dass diese Zellen Substanzen der entsprechenden chemischen Klasse zu metabolisieren vermögen.

*Versuchsbedingungen*

Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen

Jeder Versuch sollte Positivkontrollen umfassen unter Verwendung sowohl einer direkt wirkenden Substanz als auch einer Substanz, bei der eine Stoffwechselaktivierung erforderlich ist. Auch eine Negativ-(Vehikel-)Kontrolle sollte angelegt werden.

Folgende Substanzen können beispielsweise als Positivkontrollen dienen:

— Direkt wirksame Verbindungen:

  — Ethylmethansulfonat,

  — β-Propiolacton,

— Verbindungen, bei denen eine Stoffwechselaktivierung erforderlich ist:

  — 2-Acetylaminofluoren,

  — 4-(Dimethylamino)-azobenzol,

  — 7,12-Dimethylbenzanthracen.

Gegebenenfalls ist eine weitere Positivkontrolle erforderlich, die der gleichen chemischen Klasse angehört, wie die zu untersuchende Substanz.

Konzentrationen

Es sind mehrere Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Diese Konzentrationen sollten eine konzentrationsabhängige toxische Wirkung ausüben, wobei die höchste Konzentration eine geringe Überlebensrate ergibt und die Überlebensrate in der niedrigsten Konzentration etwa der in der negativen Kontrolle entspricht. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Prüfkonzentration von Fall zu Fall festzulegen.

▼B

*Versuchsdurchführung*

Die Zellen sind je nach verwendetem Testsystem während einer angemessenen Zeitdauer zu exponieren; bei längerer Exposition kann deshalb eine Neudosierung mit Erneuerung des Mediums (und ggf. des Stoffwechselaktivierungsgemischs) erforderlich werden. Die Behandlung der Zellen ohne ausreichende eigene Stoffwechselaktivität mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen. Nach Ende der Behandlungszeit wird die Prüfsubstanz durch Waschen von den Zellen entfernt. Dann werden die Zellen unter Bedingungen kultiviert, die es ermöglichen, den veränderten Phänotyp zu erfassen. Anschließend wird die Transformationsinzidenz ermittelt. Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

2. **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Je nach Versuch sind zum Beispiel Anzahl der Platten, Platten mit Transformation oder Anzahl der transformierten Zellen anzugeben. Gegebenenfalls ist die Überlebensrate als Prozentsatz der Überlebensrate in den Kontrollkulturen und die Transformationshäufigkeit als Anzahl der transformierten Zellen pro Anzahl der überlebenden Zellen auszudrücken. Die Daten sind unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren abzusichern.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— verwendeter Zelltyp, Anzahl der Zellenkulturen, Zellkulturbedingungen;

— Versuchsbedingungen, Konzentration der Prüfsubstanz, verwendetes Lösungsmittel, Inkubationstemperatur, Inkubationsdauer, Behandlungsdauer und -häufigkeit, Zelldichte während der Behandlung, Art des verwendeten exogenen Stoffwechselaktivierungs-Systems, Positiv- und Negativkontrollen, genaue Beschreibung des zu erfassenden Phänotyps, ggf. verwendetes Selektivsystem, Begründung für die Wahl der Konzentrationen;

— das zur Zählung der lebenden und transformierten Zellen verwendete Verfahren;

— statistische Auswertung;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

3.2. INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

B.22. **SÄUGER-IN-VIVO-DOMINANT-LETAL-TEST**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Dominante Letaleffekte bewirken den Tod des Embryos bzw. des Fötus. Die Induktion dominanter Letalgene durch Behandlung mit einer chemischen Substanz weist darauf hin, dass die Substanz das Keimgewebe der Tierart geschädigt hat. Man geht allgemein davon aus, dass dominante Letalgene auf Chromosomenschäden (strukturelle und numerische Anomalien) zurückgehen. Das Absterben des Embryos in behandelten Weibchen kann auch durch toxische Effekte bedingt sein.

Im Allgemeinen werden die männlichen Tiere mit der Prüfsubstanz behandelt und dann mit unbehandelten jungfräulichen Weibchen gepaart. Die verschiedenen Keimzellstadien können durch Verwendung aufeinander folgender Paarungsintervalle getrennt getestet werden. Die Differenz zwischen der Anzahl der toten Implantate pro Weibchen in der behandelten Gruppe und der Anzahl toter Implantate pro Weibchen in der Kontrollgruppe entspricht dem Postimplantationsverlust. Der Präimplantationsverlust kann abgeschätzt werden auf der Grundlage der *Corpora lutea* oder durch den Vergleich der Gesamtimplantate pro Weibchen in der behandelten und der Kontrollgruppe. Der gesamte dominante Letaleffekt entspricht der Summe der Prä- und Postimplantationsverluste. Die Berechnung des gesamten dominanten Letaleffekts beruht auf einem Vergleich der Zahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Versuchsgruppe mit der Zahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Kontrollgruppe. Eine Verringerung der Implantatenanzahl in bestimmten Paarungsgruppen kann darauf zurückzuführen sein, dass Zellen (z. B. Spermatozyten und/oder Spermatogonien) abgetötet wurden.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen sind möglichst in isotonischer Kochsalzlösung zu lösen oder zu suspendieren. Wasserunlösliche Substanzen können in geeigneten Vehikeln gelöst öder suspendiert werden. Das verwendete Vehikel darf weder die Wirkung der Prüfsubstanz beeinträchtigen noch eine toxische Wirkung ausüben. Es sind frische Lösungs- oder Suspensionsansätze zu verwenden.

▼B

*Versuchsbedingungen*

Verabreichungsweg

Die Prüfsubstanz sollte im Allgemeinen nur einmal verabreicht werden. Wenn toxikologische Gründe dafür sprechen, ist eine wiederholte Behandlung möglich. Die üblichen Verabreichungswege sind per os oder intraperitoneal. Auch andere Verabreichungswege können geeignet sein.

Versuchstiere

Als Versuchstiere werden Ratten oder Mäuse empfohlen. Gesunde, voll geschlechtsreife Tiere werden randomisiert und Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeordnet.

Anzahl und Geschlecht

Man sollte eine ausreichende Anzahl behandelter Männchen verwenden, um der spontanen Variation des auszuwertenden biologischen Merkmals Rechnung zu tragen. Die Entscheidung über die Anzahl sollte auf der vorher festgelegten Erkennungsgenauigkeit und gewünschten Signifikanz-Schranke beruhen. So sollte in einem typischen Versuch die Anzahl der Männchen in jeder Dosierungsgruppe ausreichen, um 30 bis 50 trächtige Weibchen pro Paarungsintervall zu erzielen.

Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Normalerweise sind für jeden Versuch gleichzeitige Positiv- und Negativkontrollen erforderlich. Stehen Ergebnisse von positiven Kontrollen zur Verfügung, die in letzter Zeit im selben Labor erhoben wurden, so können anstelle einer gleichzeitigen Positivkontrolle diese Ergebnisse verwendet werden. Bekannte Mutagene sind als Positivkontrollen mit einer angemessenen niedrigeren Dosierung (z. B. MMS, i. p., mit 10 mg/kg) zum Nachweis der Testempfindlichkeit zu verwenden.

Dosierung

Normalerweise sind drei verschiedene Dosierungen zu verwenden. Die hohe Dosierung sollte Toxizitätsanzeichen oder verringerte Fruchtbarkeit bei den behandelten Tieren hervorrufen. In bestimmten Fällen kann eine einmalige hohe Dosierung ausreichen.

Limit-Test

Nichttoxische Substanzen sind mit 5 g/kg bei einmaliger Verabreichung oder mit 1 g/kg pro Tag bei mehrmaliger Verabreichung zu testen.

*Versuchsdurchführung*

Man kann nach verschiedenen Behandlungsplänen vorgehen. Am weitesten verbreitet ist die einmalige Verabreichung der Prüfsubstanz, doch kann man auch andere Behandlungspläne anwenden.

Einzelne Männchen werden in angemessenen Abständen der Behandlung mit einem oder zwei unbehandelten virginellen Weibchen verpaart. Die Weibchen und Männchen sollten mindestens während der Dauer eines Östruszyklus zusammenbleiben oder so lange, bis die Paarung stattgefunden hat. Eine erfolgte Paarung wird durch Anwesenheit von Sperma in der Vagina oder anhand eines Vaginalpfropfes festgestellt.

▼B

Die Anzahl der Paarungen nach der Behandlung richtet sich nach dem Behandlungsplan; sie muss ausreichen, um alle Keimzellenstadien nach der Behandlung zu erfassen.

Die Weibchen werden in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit getötet. Der Uterusinhalt wird zur Bestimmung der Anzahl toter und lebender Implantate untersucht. Eine Untersuchung der Ovarien zur Bestimmung der Anzahl der *Corpora lutea* ist möglich.

2. **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe der Anzahl der Männchen, der Anzahl der trächtigen Weibchen und der Anzahl nicht trächtiger Weibchen darzustellen. Die Ergebnisse jeder Paarung einschließlich der Identität jedes Männchens und Weibchens sind einzeln durchzuführen. Für jedes Weibchen ist die Paarungswoche, die den Männchen verabreichte Dosis und die Häufigkeit der lebenden und der toten Implantate anzugeben.

Die Berechnung des gesamten dominanten Letaleffekts beruht auf einem Vergleich der Anzahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Versuchsgruppe mit der Anzahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Kontrollgruppe. Eine Analyse des Verhältnisses von toten und lebenden Implantaten aus der behandelten Gruppe verglichen mit dem gleichen Verhältnis aus der Kontrollgruppe ergibt den Postimplantationsverlust.

Werden frühes oder spätes Absterben gesondert erfasst, muss dies aus den Tabellen hervorgehen. Wird der Präimplantationsverlust berechnet, ist er anzugeben. Der Präimplantationsverlust kann als Differenz zwischen der Anzahl der *Corpora lutea* und der Anzahl der Implantate oder als Verringerung der Durchschnittsanzahl der Implantate pro Uterus gegenüber den Kontrollpaarungen berechnet werden.

Die Auswertung der Daten erfolgt mit geeigneten statistischen Verfahren.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— Art, Stamm, Alter und Gewicht der verwendeten Tiere, Anzahl der Männchen und Weibchen in Versuchs- und Kontrollgruppen;

— Prüfsubstanz, Lösungsmittel, getestete Dosierungen und Begründung für die Wahl der Dosierung, Negativ- und Positivkontrollen, Toxizitätsdaten;

— Behandlungsart und -dauer;

— Paarungsplan;

— Verfahren zur Feststellung, ob die Paarung erfolgt ist;

— Zeitpunkt der Tötung;

— Kriterien für die Erfassung der dominanten Letaleffekte;

— ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;

▼B

— statistische Auswertung;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

3.2. INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

B.23. **SPERMATOGONIEN-CHROMOSOMENABERRATIONSTEST BEI SÄUGETIEREN**

1. **METHODE**

Diese Methode entspricht der OECD TG 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. EINLEITUNG

Der In-vivo-Spermatogenientest auf Chromosomenaberrationen bei Säugetieren dient zum Nachweis von Agenzien, die bei Säugetieren strukturelle Chromosomenaberrationen in den Spermatogonien auslösen (1) (2) (3) (4) (5). Dabei ist zwischen strukturellen Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen zu unterscheiden. Bei der Mehrzahl der chemischen Mutagene sind die Aberrationen dem Chromatidentyp zuzuordnen, doch kommen auch Chromosomentypaberrationen vor. Allerdings ist diese Methode nicht zur Messung numerischer Aberrationen bestimmt und wird folglich auch nicht routinemäßig dafür eingesetzt. Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen.

Mit diesem Test werden Chromosomenveränderungen in Spermatogonien ermittelt, so dass Prognosen zur Auslösung vererbbarer Mutationen in Keimzellen möglich sind.

Bei dieser Prüfung werden routinemäßig Nagetiere eingesetzt. Mit diesem zytogenetischen In-vivo-Test werden Chromosomenaberrationen in Mitosen von Spermatogonien ermittelt. Andere Zielzellen sind nicht Gegenstand dieser Methode.

Zum Nachweis von Chromatidentypaberrationen in Spermatogonien ist die erste mitotische Zellteilung nach der Behandlung zu untersuchen, bevor diese Läsionen bei anschließenden Zellteilungen verloren gehen. Die meiotische Chromosomenanalyse der Spermatozyten in der Diakinese-Metaphase I auf Chromosomenaberrationen nach Behandlung der Spermatogoniestammzellen kann weitere nützliche Informationen liefern.

Mit dem In-vivo-Test soll ermittelt werden, ob Mutagene für somatische Zellen auch in Keimzellen aktiv sind. Darüber hinaus ist der Keimzellentest für die Bewertung des mutagenen Risikos von Relevanz, da er die Berücksichtigung von Faktoren des in-vivo-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und der DNA-Reparaturprozesse ermöglicht.

In den Hoden finden sich mehrere Generationen von Spermatogonien mit einem Spektrum der Empfindlichkeit gegenüber chemischer Behandlung. Die festgestellten Aberrationen stellen also eine Gesamtreaktion der behandelten Spermatogoniepopulationen dar, wobei die zahlreicheren differenzierten Spermatogonien dominieren. Je nach ihrer Position im Hoden sind einzelne Generationen von Spermatogonien dem allgemeinen Kreislauf ausgesetzt oder nicht, und zwar wegen der physischen und physiologischen Sertoli-Zellen-Schranke und der Blut-Hoden-Schranke.

Wenn Anzeichen dafür bestehen, dass die Prüfsubstanz oder ein reaktiver Metabolit das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Test nicht geeignet.

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

1.2. DEFINITIONEN

**Chromatidentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion von Chromatiden.

**Chromosomentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch oder Bruch und Reunion beider Chromatiden an gleicher Position.

**Lücke:** achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide und mit minimaler Verlagerung der Chromatiden.

**Numerische Aberration:** Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Tiere charakteristisch ist.

**Polyploidie:** Vorhandensein von mehr als zwei haploiden Chromosomensätzen (n) (z. B. 3n, 4n usw.).

**Strukturelle Aberration:** Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen, intrachromosalen oder reziproken Translokationen.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz mittels einer geeigneten Expositionsform verabreicht und werden zu einem geeigneten Zeitpunkt nach der Behandlung getötet. Vor der Tötung werden die Tiere mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin oder Colcemid®) behandelt. Aus den Keimzellen werden dann Chromosomen präpariert und gefärbt, und die Metaphasezellen werden auf Chromosomenaberrationen untersucht.

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Vorbereitungen**

1.4.1.1. *Versuchstiere*

Gewöhnlich werden männliche chinesische Hamster und Mäuse verwendet, doch kommen auch männliche Tiere anderer geeigneter Säugetierarten in Frage. Es sollten junge gesunde und geschlechtsreife Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert so gering wie möglich sein und nicht mehr als ± 20 % betragen.

1.4.1.2. *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert von 50-60 % anzustreben.

1.4.1.3. *Vorbereitung der Tiere*

Gesunde und geschlechtsreife junge Männchen werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so anzuordnen, dass sich ihre Position möglichst wenig auswirkt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Die Tiere werden vor Beginn der Studie über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

▼B

1.4.1.4. *Vorbereitung der Dosierung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

1.4.2. **Prüfbedingungen**

1.4.2.1. *Lösungsmittel/Vehikel*

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

1.4.2.2. *Kontrollen*

Für jeden Versuch und jedes Geschlecht sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

Die Positivkontrollen sollten in vivo strukturelle Chromosomenaberrationen in Spermatogonien hervorrufen, wenn sie in Expositionskonzentrationen verabreicht werden, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben.

Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, dass die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es ist vertretbar, dass die Positivkontrolle auf anderem Wege als die Prüfsubstanz verabreicht wird und nur eine Probenahme erfolgt. Gegebenenfalls könnte eine zusätzliche Positivkontrolle herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die zu prüfende Substanz. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

| Substanz | CAS-Nummer | EINECS-Nummer |
|---|---|---|
| Cyclophosphamid<br>Cyclophosphamidmonohydrat | 50-18-0<br>6055-19-2 | 200-015-4 |
| Cyclohexylamin | 108-91-8 | 203-629-0 |
| Mitomycin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| Monomeres Acrylamid | 79-06-1 | 201-173-7 |
| Triethylenmelamin | 51-18-3 | 200-083-5 |

Zu jedem Zeitpunkt der Probenahme sind Tiere der Negativkontrolle einzubeziehen, die lediglich ein Lösungsmittel oder Vehikel erhalten und ansonsten ebenso wie die Behandlungsgruppen behandelt werden, soweit nicht aus historischen Kontrolldaten akzeptable Werte zur Variabilität der Tiere und Häufigkeit der Zellen mit Chromosomenaberrationen vorliegen. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrolltiere verwendet werden, soweit nicht historische oder veröffentlichte Kontrolldaten belegen, dass das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

▼B

1.5. VERFAHREN

1.5.1. **Anzahl der Tiere**

Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe muss mindestens 5 analysierbare Tiere umfassen.

1.5.2. **Behandlungsplan**

Die Prüfsubstanzen sind möglichst als Einmal- oder Zweimalgabe zu verabreichen. Die Gabe kann in Form von zwei Teilmengen erfolgen, die am gleichen Tag im Abstand von wenigen Stunden verabreicht werden, wenn es sich um ein großes Materialvolumen handelt. Andere Verabreichungsschemata sollten wissenschaftlich begründet sein.

In der Gruppe mit der höchsten Dosis wird nach der Behandlung zu zwei verschiedenen Zeitpunkten eine Stichprobe entnommen. Da die Zellzykluskinetik von der Prüfsubstanz beeinflusst werden kann, erfolgt eine Probenahme ca. 24 Stunden und die andere ca. 48 Stunden nach der Behandlung. Bei den übrigen Dosen sollte die Probenahme 24 Stunden nach der Behandlung oder nach Ablauf eines Zeitraums erfolgen, der der l,5fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht, wenn nicht ein anderer Zeitpunkt erwiesenermaßen zur Feststellung von Effekten günstiger ist (6).

Für die Probenahme kommen auch andere Zeitpunkte in Frage. Bei Chemikalien, die eine Chromosomenverzögerung bewirken oder S-unabhängige Effekte auslösen können, ist möglicherweise eine Probenahme zu einem früheren Zeitpunkt angebracht (1).

Die Zweckmäßigkeit einer wiederholten Behandlung ist im Einzelfall zu prüfen. Bei wiederholter Behandlung sind die Tiere 24 Stunden (l,5facher Zellzyklus) nach der letzten Gabe zu töten. Ggf. sind zusätzliche Zeiten für die Probenahme vorzusehen.

Vor der Tötung wird den Tieren intraperitoneal eine geeignete Dosis eines Spindelgiftes (z. B. Colcemid® oder Colchicin) verabreicht. Eine Stichprobe wird den Tieren danach zu einem geeigneten Zeitpunkt entnommen. Bei Mäusen beträgt der Zeitabstand ca. 3 bis 5 Stunden, bei chinesischen Hamstern ca. 4 bis 5 Stunden.

1.5.3. **Dosierungen**

Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen (7). Liegt Toxizität vor, so sind zum ersten Zeitpunkt der Probenahme drei Dosisstufen zu verwenden. Die Dosisstufen sollten den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Bei der späteren Probenahme muss nur die Höchstdosis verwendet werden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, dass höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen.

▼B

Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität in den Spermatogonien hervorruft (z. B. eine Reduzierung des Verhältnisses der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase; diese Reduzierung sollte nicht mehr als 50 % betragen).

1.5.4. **Limit-Test**

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Gentoxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen verzichtet werden. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

1.5.5. **Verabreichung**

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde bzw. durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstieres ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von Reizstoffen oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfvolumens dadurch auf ein Mindestmaß zu reduzieren, dass eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

1.5.6. **Chromosomenpräparation**

Unmittelbar nach der Tötung werden aus einem oder beiden Hoden Zellsuspensionen gewonnen, mit hypotoner Lösung behandelt und fixiert. Die Zellen werden dann auf Objektträger aufgetropft und gefärbt.

1.5.7. **Analyse**

Es sind mindestens 100 gut gespreitete Metaphasen je Tier (d. h. mindestens 500 Metaphasen je Gruppe) zu analysieren. Eine zahlenmäßige Reduzierung ist möglich, wenn eine hohe Zahl von Aberrationen beobachtet wird. Alle Objektträger, auch die für die Positiv- und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite zu kodieren. Da es bei der Fixierung häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen unter Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen daher eine Zentromerzahl enthalten, die bei allen Zelltypen der Zahl 2n ± 2 entspricht.

2. **DATEN**

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Versuchseinheit ist das Tier. Für jedes Tier sind die Anzahl der Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen und die Anzahl der Chromosomenaberrationen je Zelle anzugeben. Für die Versuchs- und Kontrollgruppen sind die unterschiedlichen Typen struktureller Chromosomenaberrationen mit Anzahl und Häufigkeit aufzuführen. Lücken werden getrennt erfasst und angegeben, aber in der Regel nicht bei der Gesamthäufigkeit der Aberrationen berücksichtigt.

▼B

Wird Mitose sowie Meiose beobachtet, ist das Verhältnis der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase als Gradmesser der Zytotoxizität bei allen behandelten Tieren und Tieren der Negativkontrolle in einer Gesamtstichprobe von 100 sich teilenden Zellen zu bestimmen, um eine mögliche zytotoxische Wirkung festzustellen. Wird nur Mitose beobachtet, so ist der Mitoseindex für mindestens 1 000 Zellen je Tier zu bestimmen.

2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine dosisbezogene Zunahme der Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen oder eine eindeutige Zunahme der Anzahl der Zellen mit Aberrationen in einer bestimmten Dosisgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt der Probenahme. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (8). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein. Nicht eindeutige Ergebnisse sollten durch weitere Prüfungen abgeklärt werden, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen.

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den oben genannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem Versuch als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, dass sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde des In-vivo-Keimzellentests auf Chromosomenaberrationen deuten darauf hin, dass die Prüfsubstanz in den Keimzellen der untersuchten Spezies Chromosenaberrationen hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine Chromosomenaberrationen in den Keimzellen der untersuchten Spezies hervorruft.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Prüfsubstanz oder ihre Metaboliten in das spezifische Zielgewebe gelangen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel:

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/-Vehikel, falls bekannt.

Versuchstiere:

— Spezies/Stamm;

— Anzahl und Alter der Tiere;

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe.

▼B

Prüfbedingungen:

— Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;

— Begründung der gewählten Dosisstufen;

— Begründung für den Verabreichungsweg;

— Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;

— Begründung für die Tötungszeiten;

— ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);

— Angaben über Futter- und Wasserqualität;

— nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;

— Methoden zur Bestimmung der Toxizität;

— Bezeichnung des Spindelgifts, Konzentration und Behandlungsdauer;

— Methoden zur Präparation des Objektträgers;

— Kriterien zur Bewertung von Aberrationen;

— Anzahl der analysierten Zellen pro Tier;

— Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

— Toxizitätszeichen;

— Mitoseindex;

— Verhältnis der Spermatogenienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase;

— Typ und Anzahl der Aberrationen, für jedes Tier gesondert anzugeben;

— Gesamtzahl der Aberrationen pro Gruppe;

— Anzahl der Zellen mit Aberrationen pro Gruppe;

— nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;

— ggf. statistische Analysen;

— Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen;

— Daten zu historischen Negativkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;

— Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen;

— ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

▼B

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis,* Ramel, C, Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, 477-484.

(2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach,* ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, 275-306.

(3) Evans, E. P.. Breckon. G. and Ford, C. E. (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*. 3. 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A,, Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity* Tests, *UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing.* Report. Part I *revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.,* 52, 207-209.

(6) Adler, I. D., Shelby. M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation* Res., 312, 313-318.

(7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D.)., Gatehouse, D. G., Hodson- Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis,* 7, 313-319.

(8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M, Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 184-232.

▼B

B.24. **IN-VIVO-SÄUGER-FELLFLECKENTEST DER MAUS**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Es handelt sich um einen In-vivo-Test mit Mäusen, bei dem in der Entwicklung befindliche Embryonen in utero mit den Prüfsubstanzen behandelt werden. Die Zielzellen in diesen Embryonen sind die Melanoblasten, die Zielgene diejenigen Gene, die die Pigmentierung der Fellhaare steuern. Die in der Entwicklung befindlichen Embryonen sind heterozygot für eine Anzahl dieser Fellfarbgene. Eine Mutation oder der Verlust (ausgelöst durch verschiedene genetische Ereignisse) des dominanten Allels eines derartigen Gens in einem Melanoblasten führt zur Expression des rezessiven Phänotyps. Im Fell der aus dem Embryo entstandenen Maus ist an einer Stelle ein Fleck mit einer anderen Farbe zu sehen. Die Anzahl der Nachkommen mit andersfarbigen Flecken wird erfasst. Ihre Häufigkeit wird mit der Häufigkeit beim Nachkommen aus der Lösungsmittelkontrolle verglichen. Mit dem „Mouse Spot Test“ lassen sich mutmaßliche somatische Mutationen in fetalen somatischen Zellen feststellen.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen sind möglichst in isotonischer Kochsalzlösung zu lösen oder zu suspendieren. Wasserunlösliche Substanzen werden in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert. Das verwendete Lösungsmittel darf weder die Wirkung der Prüfsubstanz beeinträchtigen noch eine toxische Wirkung ausüben. Es sind frische Lösungen oder Suspensionen der Prüfsubstanz zu verwenden.

Versuchstiere

Mäuse des Teststammes T (nonagouti, a/a; Chinchilla, pink eye, $c^{ch}$ p/$c^{ch}$ p; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) werden entweder mit dem Harwell-Test-Stamm HT (pallid, nonagouti, brachypodi, pa a bp/pa a bp; leaden, fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) oder mit C57 BL (nonagouti, a/a) gepaart. Auch andere geeignete Kreuzungen, wie zwischen NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) und DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d), können verwendet werden, sofern die nonagouti-Nachkommen hervorbringen.

▼B

Anzahl und Geschlecht

Es sind so viele trächtige Weibchen zu behandeln, dass für jede verwendete Dosierung eine geeignete Anzahl Nachkommen geboren wird. Welche Stichprobengröße angemessen ist, hängt von der an den behandelten Mäusen beobachteten Fleckenrate und der Größe der Kontrolldaten ab. Ein negatives Ergebnis ist nur dann annehmbar, wenn mindestens 300 Nachkommen von Weibchen, die mit der höchsten Dosierung behandelt wurden, erfasst worden sind.

Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Es sollten gleichzeitig erhobene Kontrolldaten von Mäusen, die nur mit dem Lösungsmittel behandelt wurden (negative Kontrollen), verfügbar sein. Zur Erhöhung der Testempfindlichkeit können die Daten der in der Vergangenheit im selben Labor durchgeführten Kontrollen zusammengefasst werden, sofern sie homogen sind. Lässt sich eine Mutagenität der Prüfsubstanz nicht feststellen, sollten Positivkontrolldaten zur Verfügung stehen, die in letzter Zeit im selben Labor mit einer Substanz ermittelt wurden, deren Mutagenität sich nachweislich mit diesem Test feststellen lässt.

Verabreichungsweg

Normalerweise wird die Prüfsubstanz den trächtigen Weibchen per os oder intraperitoneal verabreicht. Ggf. erfolgt die Exposition durch Inhalation, oder es wird eine andere Verabreichung verwendet.

Dosierung

Es kommen mindestens zwei Dosierungen zur Anwendung, von denen eine Anzeichen von Toxizität hervorruft oder eine verringerte Wurfgröße bewirkt. Bei nichttoxischen Substanzen sollte die Behandlung mit der höchstmöglichen Dosierung erfolgen.

*Versuchsdurchführung*

Normalerweise erfolgt eine einmalige Behandlung an Tag 8, 9 oder 10 der Trächtigkeit, wobei als Tag 1 der Tag gewählt wird, an dem der Vaginalpfropf festgestellt wird. Diese Tage entsprechen 7,25, 8,25 und 9,25 Tagen nach Empfängnis. Es können sukzessive Behandlungen an diesen Tagen durchgeführt werden.

Analyse

Die Nachkommen werden kodiert und drei bis vier Wochen nach der Geburt auf Fellflecken untersucht. Man unterscheidet zwischen drei Kategorien von Flecken:

a) weiße Flecken im Bereich von 5 mm um die mittlere Ventrallinie, die vermutlich auf das Abtöten von Zellen zurückzuführen sind (WMVS);

b) gelbe, agouti-ähnliche Flecken im Mamma-, Genitalien-, vorderen Hals-, Axillar- und Inguinalbereich sowie auf der Mitte der Stirn, die vermutlich durch Fehldifferenzierung bedingt sind (MDS);

c) über das gesamte Fell verteilt auftretende pigmentierte und weiße Flecken, die vermutlich auf somatische Mutationen zurückgehen (RS).

▼B

Alle drei Kategorien werden quantitativ erfasst, doch ist nur die letzte, die Kategorie RS, von genetischer Relevanz. Probleme bei der Unterscheidung zwischen MDS und RS lassen sich durch Fluoreszenzmikroskopie von Haarproben lösen.

Deutliche makroskopische morphologische Abnormalitäten der Nachkommen sind zu vermerken.

2. **DATEN**

Anzugeben ist die Gesamtzahl der erfassten Nachkommen und die Anzahl der Nachkommen, die einen oder mehrere, vermutlich durch somatische Mutationen bedingte Flecken aufweisen. Die Daten, bezogen auf die Wurfgröße, sollten ebenfalls angegeben werden. Die Behandlungs- und Negativkontrolldaten werden mit geeigneten statistischen Verfahren verglichen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— die zur Kreuzung verwendeten Stämme;

— Anzahl der trächtigen Weibchen in den Versuchs- und Kontrollgruppen;

— die durchschnittliche Wurfgröße in den Versuchs- und Kontrollgruppen bei der Geburt und beim Absetzen;

— Dosierung(en) der Prüfsubstanz;

— verwendetes Lösungsmittel;

— Tag der Trächtigkeit, an dem die Behandlung durchgeführt wurde;

— Verabreichungsweg;

— Gesamtzahl der erfassten Nachkommen und Anzahl der Nachkommen mit MWVS, MDS und RS in den Versuchs- und Kontrollgruppen;

— makroskopische morphologische Abnormitäten;

— ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung für RS;

— statistische Auswertung;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

3.2. INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

B.25. **IN-VIVO-SÄUGER-TRANSLOKATIONSTEST**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Mit dem Translokationstest der Maus lassen sich strukturelle und numerische Chromosomenveränderungen, die in Säugetier-Keimzellen auftreten, unter Nachkommen der ersten Generation ermitteln. Bei den beobachteten Chromosomenveränderungen handelt es sich um reziproke Translokationen und — bei weiblichen Nachkommen — um X-Chromosomenverlust. Träger von Translokationen und XO-Weibchen weisen eine verringerte Fertilität auf, die man zur Auswahl von $F_1$-Nachkommen für die zytogenetische Analyse nutzt. Bestimmte Translokationstypen (X-Autosomentranslokation und Zentromer-/Telomer-Translokation) verursachen vollständige Sterilität. Translokationen werden zytogenetisch in meiotischen Zellen in der Diakinese-Metaphase I männlicher Tiere (entweder $F_1$-Männchen oder Söhne von $F_1$-Weibchen) beobachtet. Die XO-Weibchen lassen sich zytogenetisch aufgrund der Anwesenheit von 39 statt 40 Chromosomen in Knochenmarksmitosen identifizieren.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

*Vorbereitung*

Die Prüfsubstanz wird in isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Wasserunlösliche Substanzen werden in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert. Es sind frisch zubereitete Lösungen oder Suspensionen der Prüfsubstanzen zu verwenden. Wird zur Erleichterung der Dosierung ein Lösungsmittel verwendet, darf dieses weder die Wirkung der Prüfsubstanz beeinträchtigen noch eine toxische Wirkung ausüben.

Verabreichungsweg

Die Prüfsubstanz wird normalerweise per os oder intraperitoneal verabreicht. Auch andere Verabreichungswege können geeignet sein.

Versuchstiere

Die Versuche werden an Mäusen durchgeführt, da deren Zucht und zytologische Untersuchung relativ einfach sind. Ein bestimmter Stamm ist nicht vorgeschrieben.

Bei Anwendung der Fertilitätsuntersuchung sollte jedoch die durchschnittliche Wurfgröße des verwendeten Stammes mehr als acht Junge betragen und relativ konstant sein. Es werden gesunde, geschlechtsreife Tiere verwendet.

▼B

Anzahl der Tiere

Die erforderliche Anzahl der Versuchstiere hängt von der spontanen Translokationshäufigkeit und der für ein positives Ergebnis erforderlichen Erhöhung der Translokationshäufigkeit ab.

Normalerweise umfasst der Test die Untersuchung der männlichen $F_1$-Nachkommen. Pro Dosierungsgruppe sind mindestens 500 männliche $F_1$-Nachkommen zu testen. Werden auch weibliche $F_1$-Nachkommen berücksichtigt, sind 300 Männchen und 300 Weibchen erforderlich.

Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Geeignete Daten gleichzeitig durchgeführter und historischer Kontrollen sollten vorliegen. Stehen Ergebnisse von Positivkontrollen zur Verfügung, die in letzter Zeit im selben Labor erhoben wurden, so können diese Ergebnisse anstelle einer gleichzeitigen Positivkontrolle verwendet werden.

Dosierung

Getestet wird eine Dosierung. Dabei handelt es sich normalerweise um die höchste Dosis, die eine minimale toxische Wirkung ausübt, ohne jedoch das reproduktive Verhalten oder die Überlebensrate der behandelten Tiere zu beeinträchtigen. Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung sind zwei zusätzliche niedrigere Dosierungen erforderlich. Bei nichttoxischen Substanzen sollte die Behandlung mit der höchstmöglichen Dosierung erfolgen.

*Versuchsdurchführung*

Behandlung und Paarung

Es stehen zwei Behandlungspläne zur Verfügung. Am häufigsten wird die einmalige Verabreichung der Prüfsubstanz gewählt. Auch die Verabreichung an 7 Tagen/Woche während 35 Tagen ist möglich. Die Anzahl der Paarungen nach der Behandlung richtet sich nach dem gewählten Behandlungsplan; es ist sicherzustellen, dass alle behandelten Keimzellstadien erfasst werden. Nach dem Ende der Paarungsperiode werden die Weibchen einzeln in Käfigen untergebracht. Für jeden Wurf werden Geburtsdatum, Wurfgröße und Geschlecht der Jungen aufgezeichnet. Alle männlichen Jungen werden abgesetzt, alle weiblichen Jungen ausgesondert, sofern sie nicht in dem Versuch verwendet werden.

Untersuchung auf Translokationsheterozygotie

Es stehen zwei Verfahren zur Auswahl:

— Fertilitätsuntersuchung der $F_1$-Nachkommen und anschließende Ermittlung möglicher Translokationsträger durch zytogenetische Analyse,

— zytogenetische Analyse aller männlichen $F_1$-Nachkommen ohne vorherige Auswahl der Fertilitätsuntersuchung.

a) Fertilitätsuntersuchung

Die verringerte Fertilität eines $F_1$-Tieres lässt sich durch Beobachtung der Wurfgröße bzw. Analyse des Uterusinhalts des mit diesem Tier gepaarten Weibchens feststellen.

Die Kriterien für die Bestimmung der normalen und reduzierten Fertilität sind jeweils für den verwendeten Mäusestamm festzulegen.

▼B

*Beobachtung der Wurfgröße:* Die zu untersuchenden $F_1$-Männchen werden einzeln mit Weibchen aus dem gleichen Versuch oder aus der Kolonie gepaart. Die Käfige werden ab dem 18. Tag nach der Paarung täglich inspiziert. Wurfgröße und Geschlecht der $F_2$-Nachkommen werden bei der Geburt aufgezeichnet; die Würfe werden danach ausgesondert. Bei der Untersuchung weiblicher $F_1$-Nachkommen behält man die $F_2$-Nachkommen kleiner Würfe zur weiteren Untersuchung. Weibliche Translokationsträger werden durch zytogenetischen Nachweis einer Translokation in wenigstens einem ihrer männlichen Nachkommen identifiziert. XO-Weibchen erkennt man daran, dass sich bei ihren Nachkommen das Geschlechtsverhältnis von 1:1 zu 1:2 (Männchen; Weibchen) ändert. Bei einem sequenziellen Verfahren werden normale $F_1$-Tiere nicht weiter untersucht, wenn der erste $F_2$-Wurf einen vorher festgelegten Normalwert erreicht oder überschreitet. Anderenfalls wird ein zweiter oder dritter $F_2$-Wurf untersucht.

$F_1$-Tiere, die nach Inspektion von bis zu drei $F_2$-Würfen nicht als normal eingestuft werden können, werden entweder durch Analyse des Uterusinhaltes der mit ihnen gepaarten Weibchen weiter untersucht oder direkt einer zytogenetischen Analyse unterzogen.

Analyse des Uterusinhalts: Die Verringerung der Wurfgröße bei Translokationsträgern ist auf das Absterben von Embryonen zurückzuführen. Eine hohe Anzahl toter Implantate weist also auf eine Translokation in dem Versuchstier hin. Die zu untersuchenden $F_1$-Männchen werden jeweils mit zwei oder drei Weibchen gepaart. Ob eine Empfängnis stattgefunden hat, wird durch tägliche Untersuchung auf Vaginalpfropf zwischen 8 und 10 Uhr morgens festgestellt. 14 bis 16 Tage danach werden die Weibchen getötet; die Anzahl der lebenden und toten Implantate in ihren Uteri wird aufgezeichnet.

b) Zytogenetische Analyse

Es werden luftgetrocknete Hodenpräparate hergestellt. Translokationsträger lassen sich durch das Vorhandensein von Multivalentkonfigurationen in der Diakinese-Metaphase I in primären Spermatozyten identifizieren. Werden mindestens zwei Zellen mit Translokationsmultivalenten beobachtet, ist damit der erforderliche Nachweis erbracht, dass es sich bei dem untersuchten Tier um einen Translokationsträger handelt.

Erfolgt keine Zuchtauswahl, werden $F_1$-Männchen zytogenetisch untersucht. Mindestens 25 Diakinese-Metaphasen I pro Männchen sind mikroskopisch auszuwerten. Bei $F_1$-Männchen mit kleinen Hoden und Zusammenbruch der Meiose vor der Diakinese oder bei $F_1$-Weibchen, bei denen XO-Verdacht besteht, ist eine Untersuchung der mitotischen Metaphasen in Spermatogonien oder im Knochenmark erforderlich. Das Vorhandensein eines ungewöhnlich langen und/oder kurzen Chromosoms in jeder von 10 Zellen beweist, dass eine bestimmte, für Männchen steril wirkende Translokation (Typ c/t) vorliegt. Einige X-Autosomentranslokationen, die männliche Sterilität verursachen, lassen sich nur durch Bandenanalyse mitotischer Chromosomen ermitteln. Das Vorhandensein von 39 Chromosomen in jeder von 10 Mitosen ist ein Beweis dafür, dass es sich um ein XO-Weibchen handelt.

2. **DATEN**

Die Daten werden in tabellarischer Form dargestellt.

Für jeden Paarungsabschnitt sind die durchschnittliche Wurfgröße und das Geschlechtsverhältnis bei der Geburt und beim Absetzen anzugeben.

▼B

Die Angaben der Fertilitätsuntersuchung von $F_1$-Tieren müssen die durchschnittliche Wurfgröße aus allen normalen Paarungen und die jeweiligen Wurfgrößen bei $F_1$-Translokationsträgern umfassen. Zur Analyse des Uterininhalts sind die durchschnittliche Anzahl der lebenden und toten Implantate aus normalen Paarungen und die Anzahl der lebenden und toten Implantate aus jeder Paarung von $F_1$-Translokationsträgern anzugeben.

Die Angaben zur zytogenetischen Analyse der Diakinese-Metaphase I sollten für jeden Translokationsträger die Anzahl der Multivalentkonfigurationstypen sowie die Gesamtzahl der Zellen umfassen.

Für sterile $F_1$-Tiere sind die Gesamtzahl der Paarungen und die Dauer der Paarungsperiode anzugeben, ebenso die Hodengewichte und nähere Einzelheiten über die zytogenetische Analyse.

Für XO-Weibchen sind die durchschnittliche Wurfgröße, das Geschlechtsverhältnis unter den $F_2$-Nachkommen und die Ergebnisse der zytogenetischen Analyse aufzuführen.

Erfolgt eine Vorauswahl möglicher $F_1$-Translokationsträger aufgrund von Fertilitätsuntersuchungen, müssen die Tabellen auch Angaben darüber enthalten, bei wie vielen dieser Tiere die Translokationsheterozygotie bestätigt wurde.

Auch die Daten aus Negativkontrollen und die Positivkontrollversuche sind anzuführen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— Mäusestamm, Alter der Tiere, Gewicht der behandelten Tiere;

— Anzahl der Elterntiere beiderlei Geschlechts in Versuchs- und Kontrollgruppen;

— Prüfbedingungen, genaue Beschreibung der Behandlung, Dosierungen, Lösungsmittel, Paarungsplan;

— Anzahl und Geschlecht der Jungen pro Weibchen, Anzahl und Geschlecht der zur Translokationsanalyse aufgezogenen Jungen;

— Zeitpunkt der und Kriterien für die Translokationsanalyse;

— Anzahl und eingehende Beschreibung der Translokationsträger einschließlich Zuchtdaten und ggf. Daten über den Uterusinhalt;

— Zytogenetische Verfahren und nähere Angaben über die mikroskopische Analyse, möglichst mit Abbildungen;

— statistische Auswertung;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

▼B

3.2. INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einhaltung zu Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

B.26. **PRÜFUNG AUF SUBCHRONISCHE ORALE TOXIZITÄT — 90-TAGE-TOXIZITÄTSSTUDIE BEI WIEDERHOLTER ORALER VERABREICHUNG AN NAGETIEREN**

1. **METHODE**

Diese Methode zur Prüfung auf subchronische orale Toxizität entspricht der OECD TG 408 (1998).

1.1. EINLEITUNG

Bei der Beurteilung und Bewertung der toxischen Merkmale eines chemischen Stoffs kann die Bestimmung der subchronischen Toxizität bei wiederholter oraler Verabreichung von Wirkstoffgaben durchgeführt werden, nachdem erste Toxizitätsdaten anhand von Prüfungen auf akute Toxizität oder 28-Tage-Tests auf Toxizität bei wiederholter Verabreichung erzielt wurden. Die 90-Tage-Studie liefert Informationen über mögliche gesundheitliche Schädigungen, die durch wiederholte Exposition über einen längeren Zeitraum, einschließlich der Entwicklung nach dem Abstillen bis zum Erwachsensein, entstehen können. Die Studie liefert ferner Informationen über die wichtigsten toxischen Wirkungen, zeigt die Zielorgane und eine mögliche Akkumulation auf und kann zur Ableitung einer NOAEL (NOAEL — Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung) beitragen, die zur Wahl der Dosierungen für Untersuchungen der chronischen Toxizität und zur Festlegung von Sicherheitskriterien für die Humanexposition herangezogen werden kann.

Die Methode legt außerdem den Schwerpunkt auf neurologische Endpunkte und liefert Hinweise auf immunologische und fortpflanzungsspezifische Wirkungen. Ferner wird die Notwendigkeit sorgfältiger klinischer Beobachtung der Tiere hervorgehoben, um möglichst umfangreiche Informationen zu erhalten. Durch diese Studie sollten chemische Stoffe mit potenzieller neurotoxischer und immunologischer Wirkung sowie Wirkung auf die Fortpflanzungsorgane ermittelt werden, die gegebenenfalls weitergehende Untersuchungen erforderlich machen.

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

**Dosis** ist die Menge der verabreichten Prüfsubstanz. Die Dosis wird als Gewicht (g, mg) oder als Gewicht der Prüfsubstanz je Gewichtseinheit des Versuchstiers (z. B. mg/kg) oder als konstante Futterkonzentration (ppm) ausgedrückt.

**Dosierung** ist ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, ihre Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung umfasst.

**NOAEL** ist die Abkürzung für „no-observed-adverse-effect level“ und entspricht der höchsten Dosis, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

1.3. PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird täglich über einen Zeitraum von 90 Tagen in abgestuften Dosen an mehrere Gruppen von Versuchstieren verabreicht, und zwar eine Dosisstufe je Gruppe. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere sorgfältig auf Toxizitätsanzeichen beobachtet. Während der Prüfung verendete oder getötete Tiere werden seziert. Am Ende der Prüfung werden alle noch lebenden Tiere getötet und ebenfalls seziert.

▼B

1.4. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.4.1. **Vorbereitung der Tiere**

Zu verwenden sind gesunde Tiere, die mindestens fünf Tage an die Laborbedingungen gewöhnt und bisher nicht für Tierversuche verwendet wurden. Von den Versuchstieren sollten Art, Stamm, Herkunft, Geschlecht, Gewicht und/oder Alter festgestellt werden. Die Tiere werden nach dem Zufallsprinzip in Kontroll- und Behandlungsgruppen eingeteilt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige durch den Standort bedingte Auswirkungen so gering wie möglich sind. Jedes Versuchstier sollte zur sicheren Identifizierung eine eigene Nummer erhalten.

1.4.2. **Zubereitung der Dosen**

Die Prüfsubstanz wird über eine Magensonde, mit der Nahrung oder dem Trinkwasser verabreicht. Die Methode der oralen Verabreichung hängt von dem Zweck der Studie und den physikalischen/-chemischen Eigenschaften des Prüfmaterials ab.

Die Prüfsubstanz wird über eine Magensonde, mit der Nahrung oder dem Trinkwasser verabreicht. Die Methode der oralen Verabreichung hängt von dem Zweck der Studie und den physikalischen/-chemischen Eigenschaften des Prüfmaterials ab.

1.4.3. **Prüfbedingungen**

1.4.3.1. *Versuchstiere*

Die bevorzugte Nagetierart ist die Ratte, doch können als Versuchstiere auch andere Nagetierarten, z. B. die Maus, verwendet werden. Es sind junge, gesunde und ausgewachsene Tiere üblicher Laborstämme zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Mit der Dosierung sollte möglichst bald nach der Entwöhnung begonnen werden, auf jeden Fall jedoch, bevor die Tiere neun Wochen alt sind. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede der Tiere möglichst gering sein und ± 20 % des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts nicht überschreiten. Wenn die Studie als Vorstudie für eine Langzeitstudie über chronische Toxizität durchgeführt wird, sollten in beiden Studien Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden.

1.4.3.2. *Zahl und Geschlecht der Versuchstiere*

Für jede Dosisstufe sind mindestens 20 Tiere (10 weibliche und 10 männliche) zu verwenden. Sollen im Verlauf der Prüfung Tiere getötet werden, ist die Zahl der Tiere um die Zahl zu erhöhen, die bereits vor Abschluss der Studie getötet werden sollen. Aufgrund bereits bekannter Wirkungen des chemischen Stoffs oder eines eng verwandten Analogons sollte darüber hinaus für die Kontrollgruppe und die Gruppe mit der höchsten Dosis die Aufnahme einer Satellitengruppe von 10 Tieren (fünf jeden Geschlechts) zwecks Behandlung und anschließender Beobachtung der Reversibilität oder Persistenz etwaiger toxischer Wirkungen erwogen werden. Die Dauer dieses Zeitraums nach der Behandlung sollte den beobachteten Wirkungen angemessen sein.

▼B

1.4.3.3. *Dosierung*

Es sollten mindestens drei Dosierungen und eine gleichzeitige Kontrolle verwendet werden, es sei denn, ein Limit-Test wird durchgeführt (siehe 1.4.3.4). Die Dosierungen können auf der Grundlage der Ergebnisse von Studien mit wiederholter Verabreichung oder Studien zur Ermittlung des Dosisbereichs festgelegt werden und sollten sämtliche für die Prüfsubstanz oder verwandte Materialien verfügbaren toxikologischen und toxikokinetischen Daten berücksichtigen. Außer wenn dies wegen der physikalisch-chemischen Eigenschaften oder der biologischen Wirkungen der Prüfsubstanz unmöglich ist, sollte die höchste Dosierung gewählt werden, um Toxizität, jedoch nicht Tod oder schweres Leiden der Tiere zu induzieren. Zum Nachweis dosisabhängiger Reaktionen und einer NOAEL bei niedrigster Dosierung, sollten die Dosierungen in absteigender Folge verabreicht werden. Zwei- bis vierfache Abstände haben sich oft als optimale Dosisabstufungen erwiesen, auch ist meist eine vierte Testgruppe der Anwendung sehr großer Dosisabstände (z. B. mehr als ein Faktor von ca. 6-10) vorzuziehen.

Die Kontrollgruppe sollte eine unbehandelte Gruppe oder eine Vehikelkontrollgruppe sein, sofern ein Vehikel zur Verabreichung der Prüfsubstanz verwendet wird. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfsubstanz sollten die Tiere der Kontrollgruppe identisch mit denen der Testgruppen behandelt werden. Wird ein Vehikel verwendet, erhält die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten verwendeten Volumen. Wird eine Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht, und führt dies zu einer verminderten Futteraufnahme, kann eine paarweise gefütterte Kontrollgruppe nützlich sein, wobei zwischen einer verminderten Futteraufnahme aus geschmacklichen Gründen oder wegen toxikologischer Veränderungen im Prüfmodell unterschieden wird.

Zu berücksichtigen sind gegebenenfalls folgende Merkmale des Vehikels und anderer Additive: Wirkungen auf die Absorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Retention der Prüfsubstanz; Wirkungen auf die chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, die zur Änderung von toxischen Eigenschaften führen können; ferner Wirkungen auf die Futter- oder Wasseraufnahme oder den Ernährungszustand der Versuchstiere.

1.4.3.4. *Limit-Test*

Ergibt eine Prüfung bei einer einzigen Dosis von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag unter Anwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine adversen Effekte und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen gegebenenfalls verzichtet werden. Der Limit-Test ist anzuwenden, außer wenn die Expositionswirkungen beim Menschen die Prüfung bei einer höheren Dosis erforderlich erscheinen lässt.

1.5. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

1.5.1. **Verabreichung der Dosen**

Die Versuchstiere erhalten die Prüfsubstanz an sieben Tagen der Woche über einen Zeitraum von 90 Tagen. Jede Abweichung von diesem Dosierungsplan, z. B. fünf Tage je Woche, ist zu begründen. Wird die Prüfsubstanz über eine Sonde verabreicht, so sollte dies in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Magensonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier mit einer Gabe verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 1 ml/100g Körpergewicht nicht überschreiten, außer bei wässrigen Lösungen, von denen 2 ml/100g Körpergewicht gegeben werden können. Außer für Reizungen auslösende oder ätzende Stoffe, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine Verschlimmerung bewirken, sollte die Variabilität des Prüfvolumens durch Anpassung der Konzentration möglichst gering gehalten werden, um ein konstantes Volumen bei allen Dosen zu gewährleisten.

▼B

Für mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichte Stoffe ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfsubstanz die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht wird, können entweder eine konstante Futterkonzentration (ppm) oder eine konstante Dosierung in Relation zum Körpergewicht des Versuchstiers verwendet werden. Die angewandte Alternative ist zu spezifizieren. Eine mit einer Magensonde verabreichte Dosis sollte jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und so angepasst werden, dass eine konstante Dosis in Relation zum Körpergewicht aufrechterhalten wird. Wird eine 90-Tage-Studie als Vorstudie für eine Langzeitstudie über chronische Toxizität verwendet, sollte in beiden Studien die gleiche Nahrung gegeben werden.

1.5.2. **Beobachtungen**

Der Beobachtungszeitraum sollte mindestens 90 Tage betragen. Tiere einer Satellitengruppe, die für Nachfolgebeobachtungen vorgesehen sind, sollten für einen angemessenen Zeitraum ohne Behandlung bleiben, um festzustellen, ob die toxischen Wirkungen fortbestehen oder sich als reversibel erweisen.

Allgemeine klinische Beobachtungen sollten mindestens einmal täglich, vorzugsweise zur selben Tageszeit, unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist, vorgenommen werden. Der klinische Zustand der Tiere ist zu dokumentieren. Alle Tiere sind mindestens zweimal täglich, in der Regel morgens und abends, auf Anzeichen von Morbidität und Mortalität hin zu untersuchen.

Mindestens einmal vor der ersten Exposition (für intraindividuelle Vergleiche) und danach einmal pro Woche sollten bei allen Tieren eingehende klinische Beobachtungen vorgenommen werden. Diese Beobachtungen sollten außerhalb des Käfigs erfolgen, in dem die Tiere gehalten werden, und zwar vorzugsweise in einem Standardgehege jeweils zu denselben Zeiten. Sie sind sorgfältig zu dokumentieren, am besten nach einer speziell vom Prüflabor entwickelten Bewertungsskala. Es ist dafür zu sorgen, dass die Beobachtungsbedingungen möglichst konstant bleiben. Die Beobachtungen sollten sich insbesondere beziehen auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, auf Sekrete und Exkrete sowie auf autonome Reaktionen (z. B. Tränenfluss, Piloerektion, Pupillengröße, anormale Atmung). Gang- und Haltungsstörungen, ferner Reaktionen auf den Umgang mit den Tieren sowie etwaige klonische oder tonische Bewegungen, Stereotypien (z. B. übermäßiges Putzen, wiederholte Kreisbewegungen) oder abnormes Verhalten (z. B. Selbstverstümmelung, Rückwärtsgehen) sollten auch dokumentiert werden (1).

Ophthalmologische Untersuchungen unter Verwendung eines Ophthalmoskops oder eines entsprechenden geeigneten Geräts sollten vorgenommen werden, bevor die Prüfsubstanz verabreicht wird, sowie zum Abschluss der Studie, vorzugsweise an allen Tieren, doch zumindest in den höchstdosierten Gruppen und den Kontrollgruppen. Sofern Veränderungen an den Augen beobachtet werden, sollten alle Tiere untersucht werden.

Zum Ende des Expositionszeitraums, jedenfalls nicht früher als in der 11. Woche, sollten sensorische Reaktionen auf Reize verschiedener Art (1) (z. B. akustische, visuelle und propriozeptive Reize) (2) (3) (4) sowie die Greifstärke (5) und die motorische Aktivität (6) erfasst werden. Weitere Einzelheiten zu den möglichen Untersuchungen finden sich in der Literatur. Allerdings können auch andere als dort genannte Verfahren angewendet werden.

Funktionelle Beobachtungen zum Abschluss der Studie können entfallen, wenn Daten über funktionelle Beobachtungen aus anderen Studien vorliegen und die täglichen klinischen Beobachtungen keine Funktionsdefizite aufweisen.

▼B

In Ausnahmefällen können funktionelle Beobachtungen auch bei Gruppen entfallen, die so starke sonstige Toxizitätsanzeichen aufweisen, dass die Leistungen in Funktionstests dadurch signifikant beeinträchtigt würden.

1.5.2.1. *Körpergewicht und Futter-/Wasseraufnahme*

Alle Tiere sollten mindestens einmal wöchentlich gewogen werden. Messungen der Futteraufnahme sollten mindestens wöchentlich vorgenommen werden. Wenn die Prüfsubstanz über das Trinkwasser verabreicht wird, sollte auch die Wasseraufnahme mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Die Wasseraufnahme kann auch in Fütterungsstudien oder in Studien mit Sondenapplikation berücksichtigt werden, bei denen sich das Trinkverhalten ändern kann.

1.5.2.2. *Hämatologische und klinisch-biochemische Untersuchungen*

Die Blutproben sind an einer zu benennenden Stelle zu entnehmen und möglichst unter geeigneten Bedingungen zu lagern. Am Ende des Prüfzeitraums werden bei den Versuchstieren Blutproben kurz vor der Tötung oder als Teil des Tötungsvorgangs entnommen.

Folgende hämatologische Untersuchungen sind am Ende des Prüfzeitraums und bei etwaigen zwischenzeitlich entnommenen Blutproben durchzuführen: Hämatokritwert, Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl (Gesamt- und Differenzialblutbild), Thrombozytenzahl und Messung der Blutgerinnungszeit/-Blutgerinnungsfähigkeit.

Klinisch-biochemische Bestimmungen zur Untersuchung der wichtigsten toxischen Wirkungen in Geweben, insbesondere der Wirkungen auf Nieren und Leber, sind an Blutproben durchzuführen, die von jedem Tier unmittelbar vor der Tötung oder als Teil des Tötungsvorgangs entnommen werden (dies gilt nicht für Tiere, die sterbend aufgefunden und/oder zwischenzeitlich getötet werden). Vergleichbar zu den hämatologischen Untersuchungen können klinisch-biochemische Untersuchungen bei den zwischenzeitlich entnommenen Blutproben durchgeführt werden. Es empfiehlt sich eine Futterkarenz der Tiere über Nacht, bevor die Blutproben entnommen werden ([1]). Die Plasma- oder Serumbestimmungen umfassen die Parameter Natrium, Kalium, Glukose, Gesamtcholesterin, Harnstoff, Harnstoff-Stickstoff im Blut, Kreatinin, Gesamtprotein und Albumin sowie mehr als zwei Enzyme, die auf hepatozelluläre Wirkungen (wie Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, alkalische Phosphatase, Gammaglutamyl-Transpeptidase und Sorbitoldehydrogenase) schließen lassen. Ferner kann die Bestimmung weiterer Enzyme (der Leber oder sonstiger Organe) und der Gallensäuren, die unter bestimmten Bedingungen ebenfalls nützliche Informationen liefern, durchgeführt werden.

Optional können in der letzten Woche der Studie am Urin, der zu festgelegten Zeiten gesammelt wird, folgende Analysebestimmungen durchgeführt werden: Aussehen, Volumen, Osmolalität oder spezifisches Gewicht, pH-Wert, Eiweiß, Glukose und Blut/Blutzellen.

Darüber hinaus sollten Untersuchungen zur Bestimmung von Serummarkern für eine allgemeine Gewebsschädigung erwogen werden. Des Weiteren sollten, wenn die bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz die entsprechenden Stoffwechselprofile beeinträchtigen können oder wenn mit einer solchen Beeinträchtigung zu rechnen ist, die Parameter Calcium, Phosphor, Nüchtern-triglyzeride, spezifische Hormone, Methämoglobin und Cholinesterase bestimmt werden. Die jeweiligen Parameter sind je nach Prüfsubstanzklasse bzw. von Fall zu Fall zu bestimmen.

([1]) Für eine Reihe von Serum- und Plasmabestimmungen, insbesondere der Glukose, ist eine Futterkarenz der Tiere über Nacht zu empfehlen. Der Hauptgrund dafür ist, dass die bei fehlender Futterkarenz unweigerlich zunehmende Variabilität zu einer Maskierung subtilerer Wirkungen führen und die Interpretation erschweren konnte. Andererseits könnte jedoch eine nächtliche Futterkarenz den allgemeinen Stoffwechsel der Tiere, insbesondere in Futterstudien, die tägliche Exposition gegenüber der Prüfsubstanz beeinträchtigen. Wenn man sich für die nächtliche Futterkarenz entscheidet, sollten die klinisch-biochemischen Parameter nach Durchführung der funktionellen Beobachtungen der Studie bestimmt werden.

▼B

Insgesamt jedoch ist je nach der Versuchstierart und den beobachteten und/oder erwarteten Wirkungen der Prüfsubstanz mit der entsprechenden Flexibilität vorzugehen.

Bei unzureichender Datenlage zu den Normalwerten sollte die Bestimmung hämatologischer und klinisch-biochemischer Parameter gegebenenfalls auch vor Verabreichung der Prüfsubstanz erwogen werden. In der Regel empfiehlt es sich nicht, diese Daten vor der Behandlung zu bestimmen (7).

1.5.2.3. *Autopsie*

Alle an der Studie beteiligten Tiere müssen einer vollständigen, eingehenden Autopsie unterzogen werden, die die sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel-, Brust- und Bauchhöhlen und ihres Inhalts umfasst. Leber, Nieren, Nebennieren, Hoden, Nebenhoden, Uterus, Eierstöcke, Thymus, Milz, Gehirn und Herz aller Tiere (außer der tot aufgefundenen und/oder zwischenzeitlich getöteten Tiere) sind in angemessener Form von anhaftendem Gewebe zu befreien, und ihr Nassgewicht ist so rasch wie möglich nach der Sektion festzustellen, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die folgenden Gewebe sind in dem für Gewebsarten und die vorgesehene nachfolgende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmedium aufzubewahren: alle Gewebe mit makroskopischen Läsionen, Gehirn (repräsentative Bereiche, insbesondere Cerebrum, Cerebellum und Medulla/Pons), Rückenmark (auf drei Ebenen: cervical, mittlerer Thoraxbereich, und lumbar), Hypophyse, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Thymusdrüse, Speiseröhre, Speicheldrüsen, Magen, Dünn- und Dickdarm (einschließlich Peyer'schen Platten), Leber, Bauchspeicheldrüse, Nieren, Nebennieren, Milz, Herz, Luftröhre und Lungen (durch Inflation mit Fixiermittel und anschließende Immersion konserviert), Aorta, Gonaden, Uterus akzessorische Geschlechtsorgane, weibliche Brustdrüsen, Prostata, Harnblase, Gallenblase (Maus), Lymphknoten (vorzugsweise ein Lymphknoten des Verabreichungsweges und ein weiterer vom Verabreichungsweg entfernter Lymphknoten, um systemische Wirkungen abzudecken), periphere Nerven (N. ischiadicus oder N. tibialis), vorzugsweise in der Nähe des Muskels, ein Knochenmarksschnitt (und/oder ein frisches Knochenmark-Aspirat) Haut und Augen (sofern bei den ophthalmologischen Untersuchungen Veränderungen beobachtet wurden). Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebsuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz als wahrscheinliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden.

1.5.2.4. *Histopathologische Untersuchungen*

Bei allen Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosis sowie bei den Tieren der Kontrollgruppe ist eine umfassende histopathologische Untersuchung der konservierten Organe und Gewebe durchzuführen. Diese Untersuchungen sind auch auf die Tiere aller anderen Dosisgruppen auszudehnen, wenn behandlungsbedingte Veränderungen in der Gruppe mit der höchsten Dosis festgestellt werden.

Alle makroskopischen Läsionen sind zu untersuchen.

Umfasst eine Prüfung auch eine Satellitengruppe, sind bei den Tieren dieser Gruppe die Gewebe und Organe histopathologisch zu untersuchen, bei denen in den Behandlungsgruppen toxische Wirkungen aufgetreten sind.

▼B

2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

2.1. DATEN

Es sollten Daten für jedes einzelne Tier vorgelegt werden. Außerdem sollten alle Daten in Tabellenform zusammengefasst werden, aus denen für jede Prüfgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Zahl der Tiere bei Beginn der Prüfung und die Zahl der während der Prüfung tot aufgefundenen oder aus Gründen des Tierschutzes getöteten Tiere, ferner der Zeitpunkt des eingetretenen Todes oder der aus Tierschutzgründen vorgenommenen Tötung, die Zahl der Tiere, die Anzeichen von Toxizität aufweisen, eine Beschreibung der beobachteten Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen erstmalig aufgetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Zahl der Tiere mit Läsionen, die Art der Läsionen und der Prozentsatz der davon betroffenen Tiere.

Wenn möglich sind die numerischen Daten durch eine geeignete allgemein annehmbare statistische Methode auszuwerten. Die statistischen Methoden und die zu analysierenden Daten sollten bei der Planung der Studie festgelegt werden.

2.2. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

2.2.1. **Prüfsubstanz**

— Physikalische Beschaffenheit, Reinheit und physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Identifizierungsdaten;

— Vehikel (sofern zutreffend): Begründung der Wahl des Vehikel, sofern anders als Wasser.

2.2.2. **Versuchstierart**

— Tierart und Stamm;

— Zahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— individuelles Gewicht der Tiere zu Beginn der Prüfung.

2.2.3. **Prüfbedingungen**

— Begründung der Wahl der Dosisstufen;

— Einzelheiten der Formulierung der Prüfsubstanz/-Futterzubereitung, erzielte Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;

— tatsächliche Dosen (mg/kg Körpergewicht/Tag) und, sofern zutreffend, Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Trinkwasser (ppm) in die tatsächliche Dosis;

— Einzelheiten der Futter- und Wasserqualität.

2.2.4. **Ergebnisse**

— Körpergewicht und Änderungen des Körpergewichts;

— gegebenenfalls Angaben zur Futter- und Wasseraufnahme;

— Daten der toxischen Wirkung nach Geschlecht und Dosis, einschließlich Toxizitätsanzeichen;

▼B

— Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);

— Ergebnisse aus der ophthalmologischen Untersuchung;

— Bewertung der Sensorik, Greifstärke und motorische Aktivität (sofern zutreffend);

— hämatologische Tests mit entsprechenden Normalwerten;

— klinisch-biochemische Tests mit entsprechenden Normalwerten;

— terminales Körpergewicht, Organgewichte und Verhältnis Organ-/Körpergewicht;

— Sektionsbefunde;

— ausführliche Beschreibung aller histopathologischen

— Befunde;

— statistische Auswertung der Ergebnisse, wenn möglich.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

3. **LITERATUR**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

(4) Moser. V. C, Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol 108, 267-283.

(5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, 233-236.

(6) Crofton K. M., Howard J. L., Moser V. C, Gill M. W., Reiter L. W., Tilson H. A., MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: lmplication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol, 13, 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies“, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, 198-201.

▼B

B.27. **PRÜFUNG AUF SUBCHRONISCHE ORALE TOXIZITÄT — 90-TAGE-TOXIZITÄTSSTUDIE BEI WIEDERHOLTER ORALER VERABREICHUNG AN NICHT-NAGETIEREN**

1. **METHODE**

Diese Methode zur Prüfung auf subchronische orale Toxizität entspricht der OECD TG 409 (1998).

1.1. EINLEITUNG

Bei der Beurteilung und Bewertung der toxischen Merkmale eines chemischen Stoffs kann die Bestimmung der subchronischen Toxizität bei wiederholter oraler Verabreichung von Wirkstoffgaben durchgeführt werden, nachdem erste Toxizitätsdaten anhand von Prüfungen auf akute Toxizität oder 28-Tage-Tests auf Toxizität bei wiederholter Verabreichung erzielt wurden. Die 90-Tage-Studie liefert Informationen über mögliche gesundheitliche Schädigungen, die durch wiederholte Exposition über einen Zeitraum des schnellen Wachstums bis zum frühen Stadium des Erwachsenseins entstehen können. Die Studie liefert ferner Informationen über die wichtigsten toxischen Wirkungen, zeigt die Zielorgane und eine mögliche Akkumulation auf und kann zur Ableitung einer NOAEL (NOAEL — Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung) beitragen, die zur Wahl der Dosierungen für Untersuchungen der chronischen Toxizität und zur Festlegung von Sicherheitskriterien für die Humanexposition herangezogen werden kann.

Die Prüfmethode soll dazu beitragen, die schädigenden Wirkungen einer Exposition gegenüber Chemikalien bei Nicht-Nagetieren festzustellen und sollte nur in folgenden Fällen angewandt werden:

— wenn in anderen Studien beobachtete Wirkungen eine Klärung/Charakterisierung an einer zweiten Tierart, den Nicht-Nagetieren, erforderlich machen;

— wenn toxikokinetische Studien darauf hindeuten, dass die Verwendung einer spezifischen Art von Nicht-Nagetieren die relevanteste Wahl von Versuchstieren ist, oder

— wenn andere spezifische Gründe die Verwendung einer Nicht-Nagetierart rechtfertigen.

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

**Dosis** ist die Menge der verabreichten Prüfsubstanz. Die Dosis wird als Gewicht (g, mg) oder als Gewicht der Prüfsubstanz je Gewichtseinheit des Versuchstiers (z. B. mg/kg) oder als konstante Futterkonzentration (ppm) ausgedrückt.

**Dosierung** ist ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, ihre Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung umfasst.

**NOAEL** ist die Abkürzung für *no-observed-adverse-effect level* und entspricht der höchsten Dosis, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

1.3. PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird täglich über einen Zeitraum von 90 Tagen in abgestuften Dosen an mehrere Gruppen von Versuchstieren verabreicht, und zwar eine Dosisstufe je Gruppe, Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere sorgfältig auf Toxizitätsanzeichen beobachtet. Während der Prüfung verendete oder getötete Tiere werden seziert. Am Ende der Prüfung werden alle noch lebenden Tiere getötet und ebenfalls seziert.

▼B

1.4. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.4.1. **Auswahl von Versuchstierarten**

Die am häufigsten verwendete Nicht-Nagetierart ist der Hund, der einer bestimmten Rasse angehören sollte. Häufig wird der Beagle verwendet. Ferner können Tierarten wie Schwein oder Minischwein verwendet werden. Primaten werden nicht empfohlen, und ihre Verwendung ist zu begründen. Es sollten junge und gesunde Tiere verwendet werden. Bei Hunden sollte mit der Dosierung vorzugsweise im Alter von vier bis sechs Monaten, jedoch nicht später als neun Monaten begonnen werden. Wird die Studie als Vorstudie für eine Langzeitstudie über chronische Toxizität durchgeführt, sollten in beiden Studien dieselbe Art/Rasse verwendet werden.

1.4.2. **Vorbereitung der Tiere**

Zu verwenden sind gesunde Jungtiere, die an die Laborbedingungen gewöhnt und bisher nicht für Tierversuche verwendet wurden. Die Dauer der Gewöhnung hängt von der für die Prüfung gewählten Art und der Herkunft der Tiere ab. Empfohlen werden mindestens fünf Tage für Hunde oder für speziell zu diesem Zweck gezüchtete Schweine aus einer internen Kolonie und mindestens zwei Wochen für Tiere externer Herkunft. Von den Versuchstieren sollten Art, Stamm, Herkunft, Geschlecht, Gewicht und/oder Alter festgestellt werden. Die Tiere werden nach dem Zufallsprinzip in Kontroll- und Behandlungsgruppen eingeteilt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige durch den Standort bedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Jedes Versuchstier sollte zur sicheren Identifizierung eine eigene Nummer erhalten.

1.4.3. **Zubereitung der Dosen**

Die Prüfsubstanz wird mit dem Futter oder im Trinkwasser über eine Magensonde oder in Kapseln verabreicht. Die Methode der oralen Verabreichung hängt von dem Zweck der Studie und den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Prüfmaterials ab.

Bei Bedarf wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Medium gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension, sodann eine Lösung/Emulsion in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in anderen Medien in Betracht zu ziehen. Bei anderen Medien als Wasser müssen seine toxischen Merkmale bekannt sein. Die Stabilität der Prüfsubstanz unter den Verabreichungsbedingungen ist festzustellen.

1.5. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

1.5.1. **Zahl und Geschlecht der Versuchstiere**

Für jede Dosisstufe sind mindestens acht Tiere (vier weibliche und vier männliche) zu verwenden. Sollten im Verlauf der Prüfung Tiere getötet werden, ist die Zahl der Tiere um die Zahl zu erhöhen, die bereits vor Abschluss der Studie getötet werden sollen. Die Zahl der Tiere bei Beendigung der Studie muss für eine sinnvolle Bewertung der toxischen Wirkungen angemessen sein. Aufgrund bereits bekannter Wirkungen der Substanz oder eines eng verwandten Analogons sollte darüber hinaus für die Kontrollgruppe und die Gruppe mit der höchsten Dosis die Aufnahme einer Satellitengruppe von acht Tieren (vier jeden Geschlechts) zwecks Behandlung und anschließender Beobachtung der Reversibilität oder Persistenz etwaiger toxischer Wirkungen erwogen werden. Die Dauer dieses Zeitraums nach der Behandlung sollte den beobachteten Wirkungen angemessen sein.

▼B

1.5.2. **Dosierung**

Es sollten mindestens drei Dosierungen und eine gleichzeitige Kontrolle verwendet werden, es sei denn, ein Limit-Test wird durchgeführt (siehe 1.4.3.4). Die Dosierungen können auf der Grundlage der Ergebnisse von Studien mit wiederholter Verabreichung oder Studien zur Ermittlung des Dosisbereichs festgelegt werden und sollten sämtliche für die Prüfsubstanz oder verwandte Materialien verfügbaren toxikologischen und toxikokinetischen Daten berücksichtigen. Außer wenn dies wegen der physikalisch-chemischen Eigenschaften oder der biologischen Wirkungen der Prüfsubstanz unmöglich ist, sollte die höchste Dosierung gewählt werden, um Toxizität, jedoch nicht Tod oder schweres Leiden der Tiere zu induzieren. Zum Nachweis dosis-abhängiger Reaktionen und einer NOAEL bei niedrigster Dosierung sollten die Dosierungen in absteigender Folge verabreicht werden. Zwei- bis vierfache Abstände haben sich oft als optimale Dosisabstufungen erwiesen, auch ist meist eine vierte Testgruppe der Anwendung sehr großer Dosisabstände (z. B. mehr als ein Faktor von ca. 6-10) vorzuziehen.

Die Kontrollgruppe sollte eine unbehandelte Gruppe oder eine Vehikelkontrollgruppe sein, sofern ein Vehikel zur Verabreichung der Prüfsubstanz verwendet wird. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfsubstanz sollten die Tiere der Kontrollgruppe identisch mit denen der Testgruppen behandelt werden. Wird ein Vehikel verwendet, erhält die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten verwendeten Volumen. Wird eine Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht, und führt dies zu einer verminderten Futteraufnahme, kann eine paarweise gefütterte Kontrollgruppe nützlich sein, wobei zwischen einer verminderten Futteraufnahme aus geschmacklichen Gründen oder wegen toxikologischer Veränderungen im Prüfmodell unterschieden wird.

Zu berücksichtigen sind gegebenenfalls folgende Merkmale des Vehikels und anderer Additive: Wirkungen auf die Absorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Retention der Prüfsubstanz; Wirkungen auf die chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, die zur Änderung von toxischen Eigenschaften führen können; ferner Wirkungen auf die Futter- oder Wasseraufnahme oder den Ernährungszustand der Versuchstiere.

1.5.3. **Limit-Test**

Ergibt eine Prüfung bei einer einzigen Dosis von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag unter Anwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine adversen Effekte und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen gegebenenfalls verzichtet werden. Der Limit-Test ist anzuwenden, außer wenn die Expositionswirkungen beim Menschen die Prüfung bei einer höheren Dosis erforderlich erscheinen lässt.

1.5.4. **Verabreichung der Dosen**

Die Versuchstiere erhalten die Prüfsubstanz an sieben Tagen der Woche über einen Zeitraum von 90 Tagen. Jede Abweichung von diesem Dosierungsplan, z. B. fünf Tage je Woche, ist zu begründen. Wird die Prüfsubstanz über eine Sonde verabreicht, so sollte dies in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Magensonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier mit einer Gabe verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Generell sollte das Volumen möglichst gering sein. Außer für Reizungen auslösende oder ätzende Stoffe, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine Verschlimmerung bewirken, sollte die Variabilität des Prüfvolumens durch Anpassung der Konzentration möglichst gering gehalten werden, um ein konstantes Volumen bei allen Dosen zu gewährleisten.

▼B

Für mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichte Stoffe ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfsubstanz die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht wird, können entweder eine konstante Futterkonzentration (ppm) oder eine konstante Dosierung in Relation zum Körpergewicht verwendet werden. Jede angewandte Alternative ist zu spezifizieren. Eine mit einer Magensonde oder in Kapseln verabreichte Substanz sollte jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und so angepasst werden, dass eine konstante Dosis in Relation zum Körpergewicht aufrechterhalten bleibt. Wird eine 90-Tage-Studie als Vorstudie für eine Langzeitstudie über chronische Toxizität verwendet, sollte in beiden Studien die gleiche Nahrung verabreicht werden.

1.5.5. **Beobachtungen**

Der Beobachtungszeitraum sollte mindestens 90 Tage betragen. Tiere einer Satellitengruppe, die für Nachfolgebeobachtungen vorgesehen sind, sollten für einen angemessenen Zeitraum ohne Behandlung bleiben, um festzustellen, ob die toxischen Wirkungen fortbestehen oder sich als reversibel erweisen.

Allgemeine klinische Beobachtungen sollten mindestens einmal täglich, vorzugsweise zur selben Tageszeit, unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist, vorgenommen werden. Der klinische Zustand der Tiere ist zu dokumentieren. Alle Tiere sind mindestens zweimal täglich, in der Regel morgens und abends, auf Anzeichen von Morbidität und Mortalität hin zu untersuchen.

Mindestens einmal vor der ersten Exposition (für intraindividuelle Vergleiche) und danach einmal pro Woche sollten bei allen Tieren umfassende klinische Beobachtungen vorgenommen werden. Diese Beobachtungen sollten, sofern praktisch durchführbar, außerhalb des Käfigs erfolgen, in dem die Tiere gehalten werden, und zwar vorzugsweise in einem Standardgehege jeweils zu denselben Zeiten. Die Beobachtungsbedingungen sollten möglichst konstant sein. Anzeichen von Toxizität sind sorgfältig zu dokumentieren, insbesondere Beginn, Schweregrad und Dauer. Die Beobachtungen sollten sich insbesondere beziehen auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, auf Sekrete und Exkrete sowie auf autonome Reaktionen (z. B. Tränenfluss, Piloerektion, Pupillengröße, anormale Atmung). Gang- und Haltungsstörungen, ferner Reaktionen auf den Umgang mit den Tieren sowie etwaige klonische oder tonische Bewegungen, Stereotypien (z. B. übermäßiges Putzen, wiederholte Kreisbewegungen) oder abnormes Verhalten (z. B. Selbstverstümmelung, Rückwärtsgehen) sollten auch dokumentiert werden.

Ophthalmologische Untersuchungen unter Verwendung eines Ophthalmoskops oder eines entsprechenden geeigneten Geräts sollten vorgenommen werden, bevor die Prüfsubstanz verabreicht wird, sowie zum Abschluss der Studie, vorzugsweise an allen Tieren, zumindest jedoch in den höchstdosierten Gruppen und den Kontrollgruppen. Sofern behandlungsbedingte Veränderungen an den Augen beobachtet werden, sollten alle Tiere untersucht werden.

1.5.5.1. *Körpergewicht und Futter-/Wasseraufnahme*

Alle Tiere sollten mindestens einmal wöchentlich gewogen werden. Messungen der Futteraufnahme sollten mindestens wöchentlich vorgenommen werden. Wenn die Prüfsubstanz über das Trinkwasser verabreicht wird, sollte auch die Wasseraufnahme mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Die Wasseraufnahme kann auch in Fütterungsstudien oder in Studien mit Sondenapplikation berücksichtigt werden, bei denen sich das Trinkverhalten ändern kann.

▼B

1.5.5.2. *Hämatologische und klinisch-biochemische Untersuchungen*

Die Blutproben sind an einer zu benennenden Stelle zu entnehmen und möglichst unter geeigneten Bedingungen zu lagern. Am Ende des Prüfzeitraums werden bei den Versuchstieren Blutproben kurz vor der Tötung oder als Teil des Tötungsvorgangs entnommen.

Hämatologische Untersuchungen sind zu Beginn der Studie und anschließend entweder monatlich oder zur Halbzeit und schließlich am Ende des Prüfzeitraums vorzunehmen: Hämatokritwert, Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl (Gesamt- und Differenzialblutbild), Thrombozytenzahl und Bestimmung des Gerinnungspotenzials, wie Gerinnungszeit, Prothrombinzeit oder Thromboplastinzeit.

Klinisch-biochemische Bestimmungen zur Untersuchung der wichtigsten toxischen Wirkungen in Geweben, insbesondere der Wirkungen auf Nieren und Leber, sind an Blutproben durchzuführen, die von jedem Tier zu Beginn und anschließend entweder monatlich oder zur Halbzeit und schließlich am Ende des Prüfzeitraums entnommen werden. Die Prüfungen sollten folgende Bereiche abdecken: Elektrolythaushalt, Kohlehydratstoffwechsel sowie Leber- und Nierenfunktion. Die Wahl der spezifischen Prüfungen hängt von den Beobachtungen über die Wirkungsweise der Prüfsubstanz ab. Vor der Blutentnahme empfiehlt sich eine der Tierart angemessene Futterkarenz. Es wird empfohlen, Bestimmungen insbesondere für folgende Parameter durchzuführen: Calcium, Phosphor, Chlor, Natrium, Kalium, Nüchternglukose, Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Ornithindecarboxylase, Gammaglutamyl-Transpeptidase, Harnstoff-Stickstoff, Albumin, Blutkreatinin, Gesamtbilirubin und Messungen des Serum-Gesamtproteins.

Untersuchungen zur Urinanalyse sind zumindest zu Beginn, anschließend zur Halbzeit und schließlich zum Abschluss der Studie an zu festgelegten Zeiten gesammeltem Urin durchzuführen: Aussehen, Volumen, Osmolarität oder spezifisches Gewicht, pH-Wert, Glukose und Blut/Blutzellen. Sofern erforderlich, können zusätzliche Parameter verwendet werden, um die Untersuchung beobachteter Wirkungen zu erweitern.

Darüber hinaus sollten Untersuchungen zur Bestimmung von Serummarkern für eine allgemeine Gewebsschädigung erwogen werden. Sonstige Bestimmungen, die für eine angemessene toxikologische Bewertung erforderlich sein können, umfassen Analysen von Lipiden, Hormonen, Säure-/Basengleichgewicht, Methämoglobin und Cholinesteraseinhibitation. Weitere klinisch-biochemische Untersuchungen können, sofern erforderlich, durchgeführt werden, um die Untersuchung der beobachteten Wirkungen zu erweitern. Die jeweiligen Parameter sind je nach Prüfsubstanzklasse bzw. von Fall zu Fall zu bestimmen.

Insgesamt ist je nach Versuchstierart und den beobachteten und/oder erwarteten Wirkungen der Prüfsubstanz mit der entsprechenden Flexibilität vorzugehen.

1.5.5.3. *Autopsie*

Alle an der Studie beteiligten Tiere müssen einer vollständigen, eingehenden Autopsie unterzogen werden, die die sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel-, Brust- und Bauchhöhlen und ihres Inhalts umfasst. Leber und Gallenblase, Nieren, Nebennieren, Hoden, Nebenhoden, Uterus, Eierstöcke, Schilddrüse, (mit Nebenschilddrüse), Thymus, Milz, Gehirn und Herz aller Tiere (außer der tot aufgefundenen und/oder zwischenzeitlich getöteten Tiere) sind in angemessener Form von anhaftendem Gewebe zu befreien, und ihr Nassgewicht ist so rasch wie möglich nach der Sektion festzustellen, um ein Austrocknen zu verhindern.

▼B

Die folgenden Gewebe sind in dem für Gewebsarten und die vorgesehene nachfolgende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmedium aufzubewahren: alle Gewebe mit makroskopischen Läsionen, Gehirn (repräsentative Bereiche, insbesondere Cerebrum, Cerebellum und Medulla/Pons), Rückenmark (auf drei Ebenen: cervical, mittlerer Thoraxbereich, und lumbar), Hypophyse, Augen, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Thymusdrüse, Speiseröhre, Speicheldrüsen, Magen, Dünn- und Dickdarm (einschließlich Peyer'schen Platten), Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse, Nieren, Nebennieren, Milz, Herz, Luftröhre und Lungen, Aorta, Gonaden, Uterus, akzessorische Geschlechtsorgane, weibliche Brustdrüsen, Prostata, Harnblase, Lymphknoten (vorzugsweise ein Lymphknoten des Verabreichungswegs und ein weiterer vom Verabreichungsweg entfernter, um systemische Wirkungen abzudecken), periphere Nerven (N. ischiadicus oder N. tibialis), vorzugsweise in der Nähe des Muskels, ein Knochenmarksschnitt (und/oder ein frisches Knochenmark-Aspirat) und Haut. Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebsuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz als mögliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden.

1.5.5.4. *Histopathologische Untersuchungen*

Bei allen Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosis sowie bei den Tieren der Kontrollgruppe ist eine umfassende histopathologische Untersuchung der konservierten Organe und Gewebe durchzuführen. Diese Untersuchungen sind auch auf die Tiere aller Dosisgruppen auszudehnen, wenn behandlungsbedingte Veränderungen in der Gruppe mit der höchsten Dosis festgestellt werden.

Alle makroskopischen Läsionen sind zu untersuchen.

Umfasst eine Prüfung auch eine Satellitengruppe, sind bei den Tieren dieser Gruppe die Gewebe und Organe histopathologisch zu untersuchen, bei denen in den Behandlungsgruppen Wirkungen aufgetreten sind.

2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

2.1. DATEN

Es sollten Daten für jedes einzelne Tier vorgelegt werden. Außerdem sollten alle Daten in Tabellenform zusammengefasst werden, aus denen für jede Prüfgruppe folgende Daten hervorgehen: die Zahl der Tiere bei Beginn der Prüfung und die Zahl der während der Prüfung tot aufgefundenen oder aus Gründen des Tierschutzes getöteten Tiere, ferner der Zeitpunkt des eingetretenen Todes oder der aus Tierschutzgründen vorgenommenen Tötung, die Zahl der Tiere, die Anzeichen von Toxizität aufweisen, eine Beschreibung der beobachteten Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen erstmalig aufgetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Zahl der Tiere mit Läsionen, die Art der Läsionen und der Prozentsatz der davon betroffenen Tiere.

Wenn möglich, sind die numerischen Daten durch eine geeignete allgemein annehmbare statistische Methode auszuwerten. Die statistischen Methoden und die zu analysierenden Daten sollten bei der Planung der Studie festgelegt werden.

2.2. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

▼B

2.2.1. **Prüfsubstanz**

— Physikalische Beschaffenheit, Reinheit und physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Identifizierungsdaten;

— Vehikel (sofern zutreffend): Begründung der Wahl des Vehikels, sofern anders als Wasser.

2.2.2. **Versuchstierart**

— Tierart und Stamm:

— Zahl, Alter und Geschlecht der Tiere:

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— individuelles Gewicht der Tiere zu Beginn der Prüfung.

2.2.3. **Prüfbedingungen**

— Begründung der Wahl der Dosisstufen;

— Einzelheiten der Formulierung der Prüfsubstanz/Futterzubereitung, erzielte Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;

— tatsächliche Dosen (mg/kg Körpergewicht/Tag) und, sofern zutreffend, Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Trinkwasser (ppm) in die tatsächliche Dosis;

— Einzelheiten der Futter- und Wasserqualität.

2.2.4. **Ergebnisse**

— Körpergewicht und Änderungen des Körpergewichts;

— gegebenenfalls Angaben zur Futter- und Wasseraufnahme;

— Daten der toxischen Wirkung nach Geschlecht und Dosis, einschließlich Toxizitätsanzeichen;

— Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);

— Ergebnisse aus der ophthalmologischen Untersuchung;

— hämatologische Tests mit entsprechenden Normalwerten;

— klinisch-biochemische Tests mit entsprechenden Normalwerten;

— terminales Körpergewicht, Organgewichte und Verhältnis Organ-/Körpergewicht;

— Sektionsbefunde;

— ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;

— Absorptionsdaten, sofern zutreffend;

— statistische Bearbeitung der Ergebnisse, wenn möglich.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen

▼B

B.28. **PRÜFUNG AUF SUBCHRONISCHE TOXIZITÄT NACH DERMALER APPLIKATION — 90-TAGE-TEST MIT NAGERN**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird mehreren Versuchstiergruppen täglich in abgestuften Dosierungen auf die Haut aufgetragen, und zwar eine Dosierung je Gruppe über einen Zeitraum von 90 Tagen. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich auf Vergiftungserscheinungen beobachtet. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden seziert.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

**Vorbereitung**

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt. Kurz vor Beginn des Tests wird das Rückenfell der Versuchstiere geschoren. Ein Abrasieren des Fells ist ebenfalls möglich, sollte jedoch etwa 24 Stunden vor dem Versuch erfolgen. Das Scheren oder Rasieren muss normalerweise wöchentlich wiederholt werden. Es ist darauf zu achten, dass dabei die Haut nicht verletzt wird. Mindestens 10 % der Körperoberfläche wird für die Applikation der Prüfsubstanz vorbereitet. Bei der Bestimmung des zu scherenden Bereichs und der Applikationsfläche ist das Gewicht der Tiere zu berücksichtigen. Werden Versuche mit festen Stoffen durchgeführt, die ggf. pulverisiert werden können, sollte die Prüfsubstanz ausreichend mit Wasser oder, falls erforderlich, mit einem geeigneten Vehikel angefeuchtet werden, um einen guten Kontakt mit der Haut zu gewährleisten. Flüssige Prüfsubstanzen werden gewöhnlich unverdünnt angewendet. Die Applikation erfolgt normalerweise an fünf bis sieben Tagen pro Woche.

*Versuchsbedingungen*

Versuchstiere

Es können erwachsene Ratten, Kaninchen oder Meerschweinchen verwendet werden. Andere Tierarten sind ebenfalls geeignet, jedoch muss ihre Verwendung begründet werden. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung im Körpergewicht nicht mehr als ± 20 % vom Mittelwert betragen. Wird eine subchronische dermale Toxizitätsstudie einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollten in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

▼B

Anzahl und Geschlecht

Mindestens 20 Tiere (10 weibliche und 10 männliche) mit gesunder Haut sind für jede Dosierung zu verwenden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muss die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 20 Tieren (10 Tiere pro Geschlecht) über 90 Tage mit der höchsten Dosierung behandelt werden, um während eines Zeitraums von 28 Tagen nach der Behandlung auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen achten zu können.

Dosierungen

Es sind mindestens drei Dosisgruppen und eine Kontrollgruppe und — sofern ein Vehikel benutzt wird — eine Vehikelkontrollgruppe erforderlich. Die Applikation der Prüfsubstanz sollte täglich zur gleichen Zeit und in festgesetzten Intervallen (wöchentlich oder 14-tägig) erfolgen, um ein in Relation zum Körpergewicht des Tieres konstantes Dosierungsniveau zu gewährleisten. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere. Wird zur Erleichterung der Verabreichung ein Vehikel benutzt, so ist dieses der entsprechenden Kontrollgruppe in gleicher Weise zu verabreichen wie den behandelten Tieren und zwar in der Menge, die die Gruppe mit der höchsten Dosierung erhält. Die höchste Dosierung ist so zu wählen, dass auf jeden Fall toxische Wirkungen eintreten, die Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Dosierung darf keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Liegen brauchbare Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so sollte die niedrigste Dosierung diesen Wert nicht überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Dosierung nur geringe toxische Wirkungen verursachen. Werden mehrere Zwischendosierungen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, dass sich eine graduelle Abstufung der toxischen Wirkungen ergibt. In den Gruppen mit niedriger und mittlerer Dosierung sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl von Todesfällen gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

Führt die Applikation der Prüfsubstanz zu schweren Hautreizungen, sollten die Konzentrationen herabgesetzt werden, was bei hoher Dosierung zu einer Verminderung oder einem Ausbleiben weiterer toxischer Wirkungen führen dürfte. Wurde die Haut stark beschädigt, ist es unter Umständen notwendig, den Versuch abzubrechen und mit einer niedrigeren Konzentration erneut zu beginnen.

Limit-Test

Hat im Rahmen einer Vorstudie die Verabreichung einer Dosis von 1 000 mg/kg bzw. einer höheren Dosis, die einer bekannten Exposition beim Menschen entspricht, keine toxischen Auswirkungen, so ist eine weitere Prüfung nicht erforderlich.

Beobachtungszeitraum

Alle Tiere sind täglich auf Vergiftungssymptome zu beobachten. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungssymptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

▼B

Versuchsdurchführung

Die Tiere sind in Einzelkäfigen zu halten; die Prüfsubstanz wird ihnen vorzugsweise an 7 Tagen pro Woche während eines Zeitraums von 90 Tagen verabreicht.

Tiere einer Satellitengruppe, die für eine Nachbeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 28 Tage ohne Behandlung gehalten werden, um die Reversibilität von toxischen Effekten bzw. deren Fortbestehen festzustellen. Die Expositionszeit beträgt 6 Stunden pro Tag.

Die Prüfsubstanz ist gleichmäßig auf einen Bereich, der etwa 10 % der Körperoberfläche entspricht, aufzutragen. Bei hochtoxischen Substanzen kann die behandelte Oberfläche kleiner sein, es sollte jedoch ein möglichst großer Bereich mit einer möglichst dünnen und einheitlichen Schicht bedeckt werden.

Die Prüfsubstanz ist während der Expositionszeit mittels eines porösen Mullverbandes und eines hautschonenden Pflasters in Kontakt mit der Haut zu halten. Die Versuchsfläche ist außerdem auf eine geeignete Art abzudecken, um den Mullverband und die Prüfsubstanz zu fixieren und sicherzustellen, dass die Tiere die Prüfsubstanz nicht verschlucken können. Zu diesem Zweck können ggf. Mittel zur Einschränkung der Bewegungsfreiheit angewendet werden; eine vollständige Immobilisierung ist jedoch nicht zu empfehlen.

Nach Ablauf der Expositionszeit entfernt man — soweit möglich — den Rest der Prüfsubstanz mit Hilfe von Wasser oder eines anderen geeigneten Hautreinigungsverfahrens.

Alle Tiere müssen täglich beobachtet und Vergiftungssymptome sowie deren Beginn, Grad und Dauer aufgezeichnet werden. Die Beobachtungen sollten sich insbesondere auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufssystems, des autonomen und zentralen Nervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Futteraufnahme und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt. Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um sicherzustellen, dass sich der Bestand an Tieren während der Studie nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe bzw. Fehler beim Umsetzen der Tiere verringert. Nach Abschluss der Studie werden alle überlebenden Tiere, mit Ausnahme der Tiere der Satellitengruppe, seziert. Moribunde Tiere sollten ausgesondert, getötet und seziert werden.

Bei allen Tieren, einschließlich der Kontrolltiere, sind üblicherweise folgende Untersuchungen durchzuführen:

a) Eine ophthalmologische Untersuchung mit Hilfe eines Ophthalmoskops oder eines gleichwertigen geeigneten Geräts sollte vor der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz und zum Abschluss der Studie — vorzugsweise bei allen Tieren, zumindest jedoch in der Gruppe mit der höchsten Dosierung und in der Kontrollgruppe — durchgeführt werden. Sind bei Versuchsende Veränderungen der Augen feststellbar, sind alle Tiere zu untersuchen.

b) Am Ende des Versuchs sind hämatologische Untersuchungen, einschließlich Hämatokritwert und Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Differenzialblutbild, Messungen der Gerinnungsfähigkeit, z. B. Gerinnungszeit, Prothrombinzeit, Thromboplastinzeit oder Thrombozytenzahl, durchzuführen.

▼B

c) Am Ende des Versuchs sind ebenfalls klinisch-chemische Untersuchungen des Blutes durchzuführen. Für diese Untersuchungen eignen sich folgende Analysen: Elektrolytbilanz, Kohlenhydratstoffwechsel, Leber- und Nierenfunktion. Die Durchführung spezifischer Analysen richtet sich nach der festgestellten Wirkungsweise der Prüfsubstanz. Vorgeschlagen werden folgende Bestimmungen: Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchternglukose (mit auf die Tierart abgestimmter Fastenperiode), Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase ([1]), Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase ([2]), Ornithin-Dekarboxylase, Gamma-Glutamyl-transpeptidase, Harnstickstoff, Albumin, Blutkreatinin, Gesamtbilirubin- und -serumeiweißmessungen. Weitere Analysen, die gegebenenfalls für eine geeignete toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen: Lipide, Hormone, Säuren-Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität. Zusätzliche klinisch-chemische Analysen können erforderlich sein, um die Untersuchung der beobachteten Wirkungen zu vertiefen.

d) In der Regel ist eine Urinanalyse nicht notwendig, erscheint jedoch erforderlich, sofern eine toxische Wirkung zu erwarten oder zu beobachten ist.

Erweisen sich Daten aus vorangegangenen Versuchen als ungeeignet, sollte eine Bestimmung hämatologischer und klinisch-chemischer Parameter vor Versuchsbeginn in Betracht gezogen werden.

Autopsie

Bei allen im Versuch befindlichen Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen, einschließlich einer Untersuchung der Körperoberfläche, aller Körperöffnungen, sowie der Schädel, Brust- und Bauchhöhle einschließlich der jeweiligen Organe. Leber, Nieren, Nebennieren und Hoden werden so bald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die folgenden Organe und Gewebe sind für eine eventuelle spätere histopathologische Untersuchung in einem geeigneten Medium aufzubewahren: alle Organe mit makroskopischen Veränderungen, Gehirn, einschließlich Medulla/Pons, der Kleinhirn- und Großhirnrinde, der Hypophyse, der Schilddrüse/Nebenschilddrüse, des Thymusgewebes, von Trachea und Lungen, Herz, Aorta, (Speicheldrüse), Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Pankreas, Gonaden, Uterus, akzessorische Geschlechtsorgane, Gallenblase (sofern vorhanden), Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Coecum, Kolon, Rektum, Harnblase, repräsentative Lymphknoten (weibliche Brustdrüse), (Oberschenkelmuskulatur), Nerven des peripheren Systems, Brustbein mit Knochenmark (Augen), (Femur, einschließlich Gelenkoberfläche), (Wirbelsäule in drei Ebenen: Hals-, mittlerer Thorax- und Lendenbereich) sowie (extraorbitale Tränendrüse). Die in Klammern angegebenen Gewebe sind nur bei Anzeichen von Toxizität oder bei Einbeziehung des Zielorgans zu untersuchen.

Histopathologische Untersuchung

a) Bei allen Tieren der Kontrollgruppe und den Tieren mit der höchsten Dosis ist eine vollständige histopathologische Untersuchung der behandelten und der unbehandelten Hautflächen sowie der Organe und Gewebe durchzuführen.

b) Alle Organe mit makroskopischen Veränderungen sind zu untersuchen.

([1]) Neuerdings als Serum-Alanin-Aminotransferase bezeichnet.
([2]) Neuerdings als Serum-Aspartat-Aminotransferase bezeichnet.

▼B

c) Die Zielorgane der Tiere der anderen Dosisgruppen sind zu untersuchen.

d) Werden Ratten benutzt, sind die Lungen der Tiere in der Gruppe mit niedriger und mittlerer Dosierung zur Feststellung einer möglichen Infektion histopathologisch so zu untersuchen, dass eine geeignete Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere möglich ist. Weitere histopathologische Untersuchungen der Tiere dieser Gruppen sind routinemäßig nicht erforderlich, müssen jedoch bei den Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosierung stets für alle geschädigten Organe durchgeführt werden.

e) Bei den Tieren der Satellitengruppe sind jene Organe und Gewebe histopathologisch zu untersuchen, die in den behandelten Gruppen auf die Prüfsubstanz reagierten.

2. **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muss für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit Veränderungen, die Art der Veränderungen sowie der Prozentsatz der Tiere für jede Art der Veränderung hervorgehen. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;

— Versuchsbedingungen;

— Dosierungen (ggf. Vehikel) und Konzentrationen;

— Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;

— nichttoxische Dosis, sofern möglich;

— Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;

— Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen;

— Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;

— Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;

— ophthalmologische Befunde;

— hämatologische Tests und deren Ergebnisse;

— klinisch-chemische Tests und deren Ergebnisse (einschließlich Ergebnis einer evtl. Urinanalyse);

— Sektionsbefunde;

▼B

— detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;

— statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

3.2. INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼M4

## B.29 PRÜFUNG AUF SUB-CHRONISCHE TOXIZITÄT NACH INHALATION — 90-TAGE-TEST

ZUSAMMENFASSUNG

Diese überarbeitete Prüfmethode B.29 wurde entwickelt, um die Toxizität der Prüfsubstanz nach Inhalation über einen subchronischen Zeitraum (90 Tage) umfassend zu beschreiben und um robuste Daten für die quantitative Bewertung des Inhalationsrisikos zu gewinnen. Gruppen von zehn männlichen und zehn weiblichen Nagern werden über einen Zeitraum von 90 Tagen (13 Wochen) 6 Stunden am Tag a) der Prüfsubstanz in drei oder mehr Konzentrationsstufen, b) gefilterter Luft (negative Kontrolle) und/oder c) dem Vehikel (Vehikelkontrolle) ausgesetzt. Im Allgemeinen werden die Tiere der Prüfsubstanz an fünf Tagen pro Woche ausgesetzt, aber auch sieben Tage pro Woche sind zulässig. Es werden immer männliche und weibliche Tiere geprüft, aber sie können unterschiedlichen Konzentrationsstufen ausgesetzt werden, wenn bekannt ist, dass ein Geschlecht empfindlicher auf eine bestimmte Prüfsubstanz reagiert als das andere. Bei dieser Methode hat der Studienleiter die Möglichkeit, Satellitengruppen (Reversibilitätsprüfung) aufzunehmen, Tiere im Verlauf der Studie zu töten, sowie eine bronchoalveoläre Lavage (BAL), neurologische Tests, zusätzliche klinische Pathologieuntersuchungen und histopathologische Untersuchungen durchzuführen, um die Toxizität einer Prüfsubstanz besser beschreiben zu können.

### EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie 413 (2009). Die ursprüngliche Prüfrichtlinie 413 (TG 413) zur subchronischen Inhalation wurde 1981 angenommen (1). Diese Prüfmethode B.29 (die der überarbeiteten TG 413 (2009) entspricht), wurde aktualisiert, um dem neuesten Stand der Wissenschaft Rechnung zu tragen und derzeitige und künftige Regulierungsanforderungen zu erfüllen.

2. Prüfungen auf subchronische Toxizität nach Inhalation haben hauptsächlich den Zweck, die in Vorschriften festzusetzenden Konzentration zu bestimmen, nach denen das Risiko für Arbeitnehmer im beruflichen Umfeld beurteilt wird. Sie werden auch verwendet, um das mit einer Exposition verbundene Risiko für den Menschen am Wohnort, im Verkehr und in der Umwelt zu beurteilen. Diese Methode ermöglicht die Beschreibung der schädlichen Wirkungen nach wiederholter täglicher inhalativer Exposition gegen eine Prüfsubstanz für einen Zeitraum von 90 Tagen (etwa 10 % der Lebenszeit einer Ratte). Die in Prüfungen auf subchronische Toxizität nach Inhalation gewonnenen Daten können für quantitative Risikobewertungen und für die Auswahl von Konzentrationen für chronische Prüfungen verwendet werden. Diese Prüfmethode ist nicht speziell für die Prüfung von Nanomaterialien bestimmt. Die im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe werden am Ende dieses Kapitels und im Guidance Document (GD 39 (2)) definiert.

### AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

3. Um die Qualität der Studie zu verbessern und möglichst wenig Versuchstiere zu verwenden, sollte das Prüflabor vor Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz berücksichtigen. Für die Auswahl der am besten geeigneten Prüfkonzentrationen könnten u. a. Informationen wie die Identität, die chemische Struktur und die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, Ergebnisse jeglicher In-vitro- oder In-vivo-Toxizitätsprüfungen, vorgesehene Verwendungen und die Möglichkeit der Exposition des Menschen, (Q)SAR-Daten und toxikologische Daten über strukturverwandte Substanzen sowie Daten aus anderen Studien mit wiederholter Exposition herangezogen werden. Falls Neurotoxizität erwartet oder im Verlauf der Studie beobachtet wird, kann der Studienleiter beschließen, geeignete Untersuchungen wie eine FOB (functional observational battery) und die Messung der motorischen Aktivität aufzunehmen. Obwohl die Expositionszeit bei bestimmten Untersuchungen ein kritischer Aspekt sein kann, darf die Durchführung dieser zusätzlichen Versuche die Auslegung der Hauptstudie nicht beeinträchtigen.

▼M4

4. Verdünnungen ätzender oder reizender Prüfsubstanzen können in Konzentrationen geprüft werden, die den gewünschten Toxizitätsgrad erzielen. Weitere Informationen sind GD 39 (2) zu entnehmen. Wenn Versuchstiere diesen Stoffen ausgesetzt werden, sollten die Zielkonzentrationen so niedrig sein, dass sie keine starken Schmerzen oder Leiden verursachen; sie sollten aber ausreichen, um die Konzentrations-Wirkungs-Kurve so zu erweitern, dass das regulatorische und wissenschaftliche Ziel der Prüfung erreicht wird. Diese Konzentrationen sollten von Fall zu Fall festgelegt werden, möglichst auf Basis einer entsprechend ausgelegten Dosisfindungsstudie, die Informationen über den kritischen Endpunkt, eine etwaige Reizschwelle und den Zeitpunkt des Einsetzens der Wirkung liefert (siehe Nummern 11, 12 und 13). Die Wahl der Konzentration ist zu begründen.

5. Moribunde Tiere oder Tiere, die Anzeichen starker und andauernder Qualen zeigen, sollten tierschutzgerecht getötet werden. Moribunde Tiere werden auf die gleiche Weise gewertet wie während des Tests gestorbene Tiere. Kriterien für die Entscheidung, moribunde oder schwer leidende Tiere zu töten, sowie Hinweise zur Erkennung des absehbaren oder bevorstehenden Todes sind Gegenstand des OECD Guidance Document on Humane Endpoints (3).

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Auswahl von Versuchstierarten**

6. Es sind junge, gesunde, adulte Nagetiere aus üblicherweise eingesetzten Laborstämmen zu verwenden. Bevorzugtes Versuchstier ist die Ratte. Wird eine andere Tierart eingesetzt, ist dies zu begründen.

**Vorbereitung der Tiere**

7. Die weiblichen Tiere dürfen weder bereits geworfen haben noch momentan trächtig sein. Am Tag der Randomisierung sollten die jungen, adulten Tiere 7 bis 9 Wochen alt sein; ihr Körpergewicht sollte innerhalb von ± 20 % des mittleren Gewichts für jedes Geschlecht liegen. Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zur individuellen Identifizierung markiert und vor Beginn der Prüfung für einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen gewöhnt.

**Tierhaltung**

8. Um die Beobachtungen zu erleichtern und Verwechslungen auszuschließen, sollten die Tiere möglichst mit einem subkutanen Transponder einzeln gekennzeichnet werden. Die Temperatur in dem Raum, in dem die Versuchstiere gehalten werden, sollte 22 ± 3 °C betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte im Idealfall im Bereich zwischen 30 und 70 % liegen; bei Verwendung von Wasser als Vehikel könnte dies jedoch unmöglich sein. Die Tiere sollten vor und nach den Expositionen im Allgemeinen nach Geschlecht und Konzentration in Käfigen gruppiert werden, wobei aber die Anzahl der Tiere pro Käfig noch eine genaue Beobachtung der einzelnen Tiere ermöglichen muss und Verluste aufgrund von Kannibalismus oder Kämpfen minimiert werden sollten. Wenn die Tiere der Prüfsubstanz nur mit der Nase ausgesetzt werden sollen, müssen sie möglicherweise an die Restrainer gewöhnt werden. Die Restrainer sollten die Tiere weder körperlich noch in Bezug auf Wärme oder Fixierung übermäßig beeinträchtigen. Die Fixierung kann physiologische Endpunkte wie Körpertemperatur (Hyperthermie) und/oder das Atemminutenvolumen beeinflussen. Wenn generische Daten zeigen, dass keine derartigen Veränderungen in nennenswertem Ausmaß vorkommen, ist eine Eingewöhnung an die Restrainer nicht erforderlich. Bei der Ganzkörperexposition gegen ein Aerosol sollten die Tiere während der Exposition einzeln untergebracht sein, damit sie die Prüfsubstanz nicht durch das Fell ihrer Käfiggenossen filtriert einatmen. Außer während der Exposition kann herkömmliches und zertifiziertes Labortierfutter verwendet werden bei uneingeschränkter Versorgung mit Trinkwasser. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln.

▼M4

**Inhalationskammern**

9. Bei der Auswahl einer Inhalationskammer sind die Art der Prüfsubstanz und der Gegenstand der Prüfung zu berücksichtigen. Das bevorzugte Verfahren ist die „Nose-only"-Exposition (dieser Begriff umfasst „nur Kopf", „nur Nase" oder „nur Schnauze"). Für die Untersuchung von Flüssigkeits- oder Feststoffaerosolen und für Dämpfe, die zu Aerosolen kondensieren können, wird im Allgemeinen die „Nose-only"-Exposition bevorzugt. Besondere Ziele der Untersuchung können möglicherweise mit einer Ganzkörperexposition besser erreicht werden, doch dies sollte im Prüfbericht begründet werden. Um bei Verwendung einer Ganzkörperkammer die Stabilität der Atmosphäre sicherzustellen, sollte das Gesamtvolumen der Versuchstiere 5 % des Volumens der Kammer nicht übersteigen. Die Grundzüge der „Nose-only"- und der Ganzkörperexposition sowie ihre jeweiligen Vor- und Nachteile sind in GD 39 (2) beschrieben.

TOXIZITÄTSSTUDIEN

**Grenzkonzentrationen**

10. Anders als bei Studien zur akuten Toxizität gibt es bei Prüfungen auf subchronische Toxizität nach Inhalation keine festgelegten Grenzkonzentrationen. Bei der Festlegung der maximalen Prüfkonzentration ist Folgendes zu beachten: 1) die höchste erreichbare Konzentration, 2) das maximale Expositionsniveau von Menschen (‚worst case), 3) die Notwendigkeit, eine ausreichende Sauerstoffversorgung aufrechtzuerhalten, und 4) Tierschutzerwägungen. Gibt es keine auf Daten basierenden Grenzwerte, können die akuten Grenzwerte der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (13) zugrunde gelegt werden (d. h. bis zu einer Höchstkonzentration von 5 mg/l bei Aerosolen, 20 mg/l bei Dämpfen und 20 000 ppm bei Gasen); siehe GD 39 (2). Wenn diese Grenzen bei der Prüfung von Gasen oder hochflüchtigen Prüfsubstanzen (z. B. Kältemitteln) überschritten werden müssen, ist dies zu begründen. Die Grenzkonzentration muss eine eindeutige Toxizität hervorrufen, ohne den Tieren übermäßigen Stress zu bereiten oder ihre Lebensdauer zu beeinträchtigen (3).

**Dosisfindungsstudie**

11. Vor Beginn der Hauptstudie muss in der Regel eine Dosisfindungsstudie durchgeführt werden. Diese ist umfassender als eine Vorstudie, weil sie nicht auf die Wahl der Konzentration begrenzt ist. Die in einer Dosisfindungsstudie gewonnenen Erkenntnisse können zu einer erfolgreichen Hauptstudie führen. Sie kann z. B. technische Informationen zu den Analysemethoden, zur Partikelgröße, zur Erkennung toxischer Mechanismen, klinische Pathologiedaten und histopathologische Daten sowie Schätzungen möglicher NOAEL- und MTC-Konzentrationen in einer Hauptstudie liefern. Der Studienleiter kann entscheiden, mithilfe der Dosisfindungsstudie die Schwelle für die Reizung der Atemwege (z. B. durch histopathologische Untersuchung der Atemwege, Lungenfunktionsprüfung oder bronchoalveoläre Lavage), die höchste Konzentration, die von den Tieren ohne übermäßigen Stress toleriert wird, und die Parameter, die die Toxizität der Prüfsubstanz am besten beschreiben, zu identifizieren.

12. Eine Dosisfindungsstudie kann aus einer oder mehreren Konzentrationsstufen bestehen. Auf jeder Konzentrationsstufe sollten je nach den gewählten Endpunkten drei bis sechs männliche und drei bis sechs weibliche Tiere der Prüfsubstanz ausgesetzt werden. Eine Dosisfindungsstudie sollte mindestens fünf Tage und im Allgemeinen nicht mehr als 28 Tage dauern. Die Wahl der Konzentrationen für die Hauptstudie ist im Prüfbericht zu begründen. Ziel der Hauptstudie ist es, nachzuweisen, dass eine Beziehung zwischen der Konzentration und der Wirkung besteht, die am voraussichtlich empfindlichsten Endpunkt auftritt. Die niedrigste Konzentration sollte im Idealfall eine Konzentration sein, bei der keine zu beobachtenden schädlichen Wirkungen auftreten, und die höchste Konzentration sollte eine eindeutige Toxizität hervorrufen, ohne den Tieren übermäßigen Stress zu bereiten oder ihre Lebensdauer zu beeinträchtigen (3).

▼M4

13. Bei der Auswahl der Konzentrationsstufen für die Dosisfindungsstudie sollten alle verfügbaren Informationen berücksichtigt werden, einschließlich der Struktur-Wirkungs-Beziehungen und der Daten über ähnliche Stoffe (siehe Nummer 3). Eine Dosisfindungsstudie kann bestätigen/widerlegen, welche Endpunkte nach mechanistischen Kriterien als die empfindlichsten Endpunkte angesehen werden, z. B. die Cholinesterasehemmung durch Organophosphate, die Methämoglobinbildung durch für Erythrozyten toxische Stoffe, Schilddrüsenhormone ($T_3$, $T_4$) im Fall von thyrotoxischen Stoffen, Proteine, LDH oder Neutrophile in bronchoalveolärer Lavage im Fall schwach löslicher unschädlicher Partikel oder lungenreizender Aerosole.

**Hauptstudie**

14. Die Hauptstudie zur Prüfung auf subchronische Toxizität umfasst im Allgemeinen drei Konzentrationsstufen sowie, falls erforderlich, eine gleichzeitige negative (Luft-)Kontrolle und/oder eine Vehikelkontrolle (siehe Nummer 18). Die Festlegung der geeigneten Expositionsstufen sollte sich auf alle verfügbaren Daten stützen, einschließlich der Ergebnisse systemischer Toxizitätsprüfungen, des Metabolismus und der Kinetik (hohe Konzentrationsstufen, die kinetische Prozesse sättigen, sind zu vermeiden). Jede Prüfgruppe umfasst zehn männliche und zehn weibliche Nager, die der Prüfsubstanz für einen Zeitraum von 13 Wochen an fünf Tagen in der Woche jeweils 6 Stunden pro Tag ausgesetzt werden (Gesamtdauer der Prüfung 90 Tage). Die Tiere können auch an sieben Tagen in der Woche exponiert werden (z. B. wenn inhalierte Arzneimittel geprüft werden). Ist bekannt, dass ein Geschlecht empfindlicher auf eine bestimmte Prüfsubstanz reagiert, können die Geschlechter unterschiedlichen Konzentrationsstufen ausgesetzt werden, um die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung genauer zu bestimmen (siehe Nummer 15). Wenn für eine „Nose-only"-Exposition andere Nagetierarten als Ratten verwendet werden, kann die maximale Expositionsdauer angepasst werden, um artenspezifisches Leiden zu minimieren. Eine Expositionsdauer von weniger als 6 Stunden/Tag oder die Notwendigkeit einer Ganzkörperexpositionsstudie mit Langzeitexposition (z. B. 22 Stunden/Tag) ist zu begründen (siehe GD 39 (2). Während der Exposition sollte kein Futter verabreicht werden, es sei denn die Exposition dauert länger als 6 Stunden. Wasser kann während einer Ganzkörperexposition jederzeit angeboten werden.

15. Die gewählten Zielkonzentrationen sollen es ermöglichen, die Zielorgane zu identifizieren und eine deutliche Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zu belegen:

— Die hohe Konzentrationsstufe sollte toxische Wirkungen hervorrufen, aber keine anhaltenden Symptome oder Todesfälle verursachen, die eine Auswertung der Ergebnisse beeinträchtigen würden.

— Der Abstand zwischen den mittleren Konzentrationsstufen muss eine Abstufung der toxischen Wirkungen zwischen der niedrigen und der hohen Konzentration ermöglichen.

— Die untere Konzentrationsstufe sollte praktisch keine Toxizitätszeichen hervorrufen.

**Tötungen im Verlauf der Studie**

16. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muss die Zahl der Tiere jeder Expositionsstufe um die Zahl der Tiere erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Tötungen im Verlauf der Studie sind zu begründen und in den statistischen Analysen entsprechend zu berücksichtigen.

▼M4

**Satellitenstudie (Reversibilität)**

17. Es kann eine Satellitenstudie durchgeführt werden, um die Tiere für einen angemessenen Zeitraum nach der Behandlung (mindestens 14 Tage) auf Reversibilität, Persistenz oder ein verzögertes Auftreten von Toxizität zu beobachten. Satellitengruppen bestehen aus zehn männlichen und zehn weiblichen Tieren, die der Prüfsubstanz gleichzeitig mit den Versuchstieren der Hauptstudie ausgesetzt werden. Dabei sollten sie der Prüfsubstanz auf der höchsten Konzentrationsstufe ausgesetzt werden, und erforderlichenfalls sollte es gleichzeitige Luft- und/oder Vehikelkontrollen geben (siehe Nummer 18).

**Kontrolltiere**

18. Eine gleichzeitige negative (Luft-)Kontrollgruppe ist genauso zu behandeln wie die Prüfgruppe, außer dass die Tiere nicht der Prüfsubstanz, sondern gefilterter Luft ausgesetzt werden. Wenn die Prüfatmosphäre mithilfe von Wasser oder einem anderen Stoff erzeugt wird, ist statt der negativen (Luft-)Kontrollgruppe eine Vehikelkontrollgruppe zu verwenden. Wenn möglich sollte Wasser als Vehikel benutzt werden. In diesem Fall sind die Tiere Luft mit derselben relativen Luftfeuchtigkeit auszusetzen wie die exponierten Gruppen. Das geeignete Vehikel ist auf der Grundlage einer geeigneten Vorstudie oder von historischen Daten auszuwählen. Ist die Toxizität eines Vehikels unklar, kann der Studienleiter beschließen, sowohl eine negative (Luft-)Kontrolle als auch eine Vehikelkontrolle zu verwenden; hiervon wird jedoch dringend abgeraten. Wenn historische Daten belegen, dass ein Vehikel nicht toxisch ist, besteht keine Notwendigkeit für eine negative (Luft-)Kontrollgruppe und es sollte nur eine Vehikelgruppe verwendet werden. Ergibt eine Vorstudie einer in einem Vehikel formulierten Prüfsubstanz, dass keine Toxizität vorliegt, ist das Vehikel folglich in der geprüften Konzentration nicht toxisch, und diese Vehikelkontrolle sollte verwendet werden.

EXPOSITIONSBEDINGUNGEN

**Verabreichung der Konzentrationen**

19. Die Tiere werden der Prüfsubstanz in Form von Gas, Dampf, Aerosol oder einer Kombination dieser Formen ausgesetzt. Der zu prüfende Aggregatzustand hängt von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, den gewählten Konzentrationen und/oder der physikalischen Form ab, in der die Prüfsubstanz bei der Handhabung und Verwendung am wahrscheinlichsten vorliegt. Hygroskopische und chemisch reaktive Prüfsubstanzen sollten bei geringer Luftfeuchtigkeit geprüft werden. Dabei ist darauf zu achten, dass keine explosionsfähigen Konzentrationen erzeugt werden. Bei Partikeln kann die Partikelgröße durch mechanische Prozesse verringert werden. GD 39 (2) enthält nähere Hinweise.

**Partikelgrößenverteilung**

20. Bei allen Aerosolen und bei Dämpfen, die zu Aerosolen kondensieren können, sollte die Partikelgröße bestimmt werden. Damit alle relevanten Regionen der Atemwege der Prüfsubstanz ausgesetzt werden, werden mittlere aerodynamische Massendurchmesser (Mass Median Aerodynamic Diameter — MMAD) von 1 bis 3 μm mit einer geometrischen Standardabweichung ($\sigma_g$) von 1,5 bis 3,0 empfohlen (4). Wenngleich nach Möglichkeit versucht werden sollte, diese Werte zu erreichen, ist Fachwissen erforderlich, falls sie nicht erzielt werden können. Metalldampfpartikel liegen z. B. unter diesen Werten, geladene Partikel und Fasern dagegen können diese Werte überschreiten.

▼M4

**Vorbereitung der Prüfsubstanz in einem Vehikel**

21. Im Idealfall sollte die Prüfsubstanz ohne ein Vehikel geprüft werden. Wenn für die Erzeugung einer geeigneten Prüfsubstanzkonzentration oder Partikelgröße ein Vehikel verwendet werden muss, ist Wasser zu bevorzugen. Wird eine Prüfsubstanz in einem Vehikel gelöst, so ist seine Stabilität nachzuweisen.

ÜBERWACHUNG DER EXPOSITIONSBEDINGUNGEN

**Luftstrom in der Inhalationskammer**

22. Der Luftstrom durch die Kammer sollte während jeder Exposition sorgfältig geregelt, kontinuierlich überwacht und mindestens stündlich protokolliert werden. Die Echtzeit-Überwachung der Konzentration (oder zeitlichen Stabilität) der Prüfatmosphäre ist eine integrale Messung aller dynamischen Parameter und gibt indirekt die Möglichkeit, alle relevanten dynamischen Inhalationsparameter zu messen. Wenn die Konzentration in Echtzeit überwacht wird, kann die Frequenz der Messung der Luftströme auf eine einzige Messung je Exposition und Tag reduziert werden. Es sollte besonders darauf geachtet werden, das erneute Einatmen in „Nose-only"-Expositionskammern zu vermeiden. Die Sauerstoffkonzentration sollte mindestens 19 % betragen, und die Kohlendioxidkonzentration sollte 1 % nicht überschreiten. Gibt es Grund zu der Annahme, dass diese Werte nicht eingehalten werden können, sind die Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen zu messen. Wenn die Messungen am ersten Expositionstag die richtigen Werte dieser Gase bestätigen, sollten keine weiteren Messungen erforderlich sein.

**Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit in der Inhalationskammer**

23. Die Temperatur in der Inhalationskammer sollte 22 ± 3 °C betragen. Sowohl bei der „Nose-only"- als auch bei der Ganzkörperexposition sollte die relative Luftfeuchtigkeit im Atembereich der Tiere kontinuierlich überwacht und während jeder Exposition möglichst stündlich dokumentiert werden. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte möglichst zwischen 30 und 70 % liegen, was jedoch möglicherweise nicht erreichbar ist (z. B. bei der Prüfung von wasserbasierten Mischungen) oder wegen chemischer Interferenz mit der Prüfmethode nicht gemessen werden kann.

**Prüfsubstanz: nominale Konzentration**

24. Die nominale Konzentration in der Expositionskammer sollte möglichst berechnet und protokolliert werden. Die nominale Konzentration ist die Masse der erzeugten Prüfsubstanz dividiert durch das Gesamtvolumen der durch die Inhalationskammer geleiteten Luft. Sie wird nicht zur Beschreibung der Exposition der Tiere verwendet; vielmehr gibt ein Vergleich der nominalen Konzentration und der tatsächlichen Konzentration Aufschluss über die Effizienz des Prüfsystems bei der Erzeugung der Prüfkonzentration und kann daher für die Aufdeckung von Problemen bei dieser Erzeugung verwendet werden.

**Prüfsubstanz: tatsächliche Konzentration**

25. Die tatsächliche Konzentration ist die Konzentration der Prüfsubstanz im Atembereich der Tiere in einer Inhalationskammer. Die tatsächlichen Konzentrationen können entweder durch spezifische Methoden (z. B. direkte Probenahme, adsorptive Methoden oder chemische Reaktionsverfahren mit anschließender analytischer Charakterisierung) oder durch unspezifische Methoden wie Gravimetrie bestimmt werden. Die gravimetrische Methode ist lediglich für Aerosole mit nur einem Bestandteil in Pulverform oder Aerosole von Flüssigkeiten mit geringer Flüchtigkeit akzeptabel und sollte sich auf geeignete, vor der Studie zu erstellende und für die Prüfsubstanz spezifische Beschreibungen stützen. Die Konzentration von Aerosolen mit mehreren Bestandteilen in Pulverform kann ebenfalls gravimetrisch bestimmt werden. Hierzu muss jedoch mit Analysedaten belegt werden, dass die

▼M4

Schwebstoffe eine ähnliche Zusammensetzung haben wie das Ausgangsmaterial. Liegen diese Angaben nicht vor, muss die Prüfsubstanz (im Idealfall im Schwebezustand) möglicherweise im Verlauf der Studie in regelmäßigen Abständen neu analysiert werden. Bei aerosolisierten Agenzien, die verdunsten oder sublimieren können, sollte gezeigt werden, dass alle Phasen von der gewählten Methode erfasst wurden.

26. Für die gesamte Dauer der Studie sollte möglichst eine Partie der Prüfsubstanz verwendet werden; die Probe sollte unter Bedingungen aufbewahrt werden, die ihre Reinheit, Homogenität und Stabilität gewährleisten. Die Prüfsubstanz sollte vor Beginn der Studie mit Angaben zur Reinheit und, falls technisch machbar, zur Identität sowie zu Mengen identifizierter Schadstoffe und Verunreinigungen beschrieben werden. Hierzu können unter anderem die folgenden Daten verwendet werden: Retentionszeit und relative Peakfläche, durch Massenspektrometrie oder Gaschromatographie bestimmtes Molekulargewicht oder andere Werte. Das Prüflabor ist zwar nicht für die Identität der Probe verantwortlich, doch es kann ratsam sein, dass es die Beschreibung des Auftraggebers zumindest in gewissen Grenzen (z. B. Farbe, physikalische Beschaffenheit usw.) überprüft.

27. Die Expositionsatmosphäre ist so konstant wie möglich zu halten. Um die Stabilität der Expositionsbedingungen nachzuweisen, kann ein Echtzeitüberwachungsgerät verwendet werden, z. B. ein Aerosol-Photometer für Aerosole oder ein Gesamtkohlenwasserstoff-Analysator (THC) für Dämpfe. Die tatsächliche Konzentration in der Kammer sollte an jedem Expositionstag für jede Expositionsstufe mindestens dreimal gemessen werden. Falls dies wegen geringer Luftdurchflussraten oder niedriger Konzentrationen nicht möglich ist, reicht eine Probe je Expositionsperiode. Im Idealfall sollte diese Probe dann über die gesamte Expositionszeit gewonnen werden. Die einzelnen Proben der Konzentration in der Kammer sollten bei Gasen und Dämpfen nicht mehr als ± 10 % und bei Flüssig- oder Feststoffaerosolen nicht mehr als ± 20 % von der mittleren Kammerkonzentration abweichen. Die Zeit bis zum Erreichen eines Gleichgewichts in der Kammer ($t_{95}$) ist zu berechnen und zu dokumentieren. Die Expositionsdauer erstreckt sich über den Zeitraum, in dem die Prüfsubstanz erzeugt wird. Dies schließt die Zeiten zur Erreichung des Gleichgewichts in der Kammer ($t_{95}$) und zum Abbau der Konzentrationen ein. GD 39 (2) enthält Hinweise zur Einschätzung von $t_{95}$.

28. Bei sehr komplexen Mischungen aus Gasen/Dämpfen und Aerosolen (z. B. Verbrennungsatmosphären und Prüfsubstanzen, die aus hierzu bestimmten Endverbraucherprodukten/-geräten gesprüht werden), kann sich jede Phase in einer Inhalationskammer anders verhalten. Daher sollte mindestens eine Indikatorsubstanz (Analyt), normalerweise der wichtigste Wirkstoff in der Mischung, von jeder Phase (Gas/Dampf und Aerosol) ausgewählt werden. Wenn die Prüfsubstanz eine Mischung ist, sollte die Analysekonzentration für die gesamte Mischung und nicht nur für den Wirkstoff oder die Indikatorsubstanz (Analyt) dokumentiert werden. Weitere Informationen zu tatsächlichen Konzentrationen sind in GD 39 (2) zu finden.

**Prüfsubstanz: Partikelgrößenverteilung**

29. Die Partikelgrößenverteilung von Aerosolen sollte auf jeder Konzentrationsstufe mindestens wöchentlich mit einem Kaskaden-Impaktor oder einem anderen Messgerät wie einem APS bestimmt werden. Kann nachgewiesen werden, dass die mit einem Kaskaden-Impaktor und dem alternativen Messgerät erzielten Ergebnisse gleichwertig sind, so kann das alternative Instrument während der gesamten Studie verwendet werden.

▼M4

30. Parallel zum Hauptinstrument ist ein zweites Gerät wie ein Gravimetriefilter oder eine Gaswaschflasche zu verwenden, um den Abscheidegrad des Hauptinstruments zu bestätigen. Die durch die Partikelgrößenanalyse bestimmte Massenkonzentration sollte innerhalb vertretbarer Grenzen um die durch die Filteranalyse bestimmte Massenkonzentration liegen [siehe GD 39 (2)]. Wenn die Gleichwertigkeit bei allen geprüften Konzentrationen zu Beginn der Studie nachgewiesen werden kann, kann auf weitere bestätigende Messungen verzichtet werden. Aus Tierschutzgründen sollten Vorkehrungen getroffen werden, um unklare Daten zu minimieren, die dazu führen könnten, dass eine Exposition wiederholt werden muss.

31. Wenn die Möglichkeit besteht, dass Dampfkondensation zur Bildung eines Aerosols führen kann, oder wenn in einer Dampfatmosphäre mit dem Potenzial für gemischte Phasen Partikel nachgewiesen werden, sollte eine Partikelgrößenbestimmung für Dämpfe vorgenommen werden.

BEOBACHTUNGEN

32. Die Tiere sollten vor, während und nach der Exposition auf klinische Zeichen beobachtet werden. Je nach Reaktion der Tiere während der Exposition können häufigere Beobachtungen angezeigt sein. Wenn die Beobachtung der Tiere durch die Verwendung von Restrainern, wegen schlecht beleuchteter Ganzkörperkammern oder getrübter Atmosphäre erschwert ist, sind die Tiere nach der Exposition sorgfältig zu beobachten. Durch Beobachtungen vor der Exposition am folgenden Tag kann beurteilt werden, ob toxische Wirkungen sich zurückgebildet oder verschlimmert haben.

33. Sämtliche Beobachtungen werden in Einzelprotokollen dokumentiert, die für jedes Tier geführt werden. Wenn Tiere aus humanen Gründen getötet werden oder ihr Tod festgestellt wird, sollte der Todeszeitpunkt so genau wie möglich registriert werden.

34. Die Beobachtungen der Tiere sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des Nervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Besonderes Augenmerk ist auf Tremor, Konvulsionen, Salivation, Diarrhö, Lethargie, Schlaf und Koma zu richten. Die Messung der Rektaltemperatur kann zusätzliche Belege für mit der Behandlung oder Unterbringung zusammenhängende Reflex-Bradypnoe oder Hypo-/Hyperthermie liefern. Darüber hinaus können zusätzliche Aspekte wie Kinetik, Biomonitoring, Lungenfunktion, Retention schlecht löslicher Stoffe, die im Lungengewebe akkumulieren, und Verhaltensstörungen in das Studienprotokoll aufgenommen werden.

KÖRPERGEWICHT

35. Das Körpergewicht der einzelnen Tiere sollte kurz vor der ersten Exposition (Tag 0), danach zweimal wöchentlich (z. B. freitags und montags, um die Erholung während eines expositionsfreien Wochenendes nachzuweisen, oder in einem Zeitintervall, das die Beurteilung der systemischen Toxizität ermöglicht) und zum Zeitpunkt des Todes oder der Tötung dokumentiert werden. Treten in den ersten vier Wochen keine Wirkungen auf, kann das Körpergewicht während der restlichen Studiendauer wöchentlich gemessen werden. Satellitentiere (Reversibilitätsprüfung) (falls verwendet) sollten während der gesamten Erholungsphase weiterhin wöchentlich gewogen werden. Am Ende der Studie sollten alle Tiere kurz vor der Tötung gewogen werden, um eine objektive Berechnung der Organ-Körpergewicht-Verhältnisse zu ermöglichen.

FUTTER- UND WASSERAUFNAHME

36. Die Futteraufnahme sollte wöchentlich gemessen werden. Auch die Wasseraufnahme kann gemessen werden.

▼M4

KLINISCHE PATHOLOGIE

37. An allen Tieren, auch an Kontroll- und Satellitentieren (Reversibilitätsprüfung) sollten klinische Pathologieuntersuchungen durchgeführt werden, wenn sie getötet werden. Der Zeitraum zwischen dem Ende der Exposition und der Blutentnahme ist zu protokollieren, insbesondere wenn der betreffende Endpunkt rasch zu seinem ursprünglichen Wert zurückkehrt. Für Parameter mit einer kurzen Plasmahalbwertszeit (z. B. COHb, CHE und MetHb) ist die Probenahme nach Ende der Exposition angezeigt.

38. In Tabelle 1 sind die im Allgemeinen für alle Toxikologiestudien erforderlichen klinischen Pathologieparameter aufgeführt. In der Regel ist eine Urinanalyse nicht notwendig, kann aber durchgeführt werden, wenn sie wegen erwarteter oder festgestellter Toxizität für nützlich gehalten wird. Der Studienleiter kann beschließen, zusätzliche Parameter zu bestimmen, um die Toxizität einer Prüfsubstanz genauer zu beschreiben (z. B. Cholinesterase, Lipide, Hormone, Säure-Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin oder Heinz-Körper, Creatin-Kinase, Verhältnis von myeloiden zu erythroiden Zellen, Troponin, arterielle Blutgase, Lactatdehydrogenase, Sorbitdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase und γ-Glutamyltranspeptidase).

*Tabelle 1*

**Klinische Standardpathologieparameter**

| Hämatologische Untersuchung | |
|---|---|
| Erythrozytenzahl | Gesamtleukozytenzahl |
| Hämatokrit | Differentialleukozytenzahl |
| Hämoglobinkonzentration | Thrombozytenzahl |
| Mittleres korpuskuläres Hämoglobin | Gerinnungsfähigkeit (einen Wert wählen): |
| Mittleres Erythrozyteneinzelvolumen | — Prothrombinzeit |
| Mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration | — Blutgerinnungszeit |
| Retikulozyten | — Partielle Thromboplastinzeit |
| **Klinische Chemie** | |
| Glucose (*) | Alanin-Aminotransferase |
| Gesamtcholesterin | Aspartat-Aminotransferase |
| Triglyceride | Alkalische Phosphatase |
| Harnstoff-N | Kalium |
| Gesamtbilirubin | Natrium |
| Kreatinin | Calcium |
| Gesamteiweiß | Phosphor |
| Albumin | Chlorid |
| Globulin | |
| **Urinuntersuchung (fakultativ)** | |
| Aussehen (Farbe und Trübung) | Gesamtprotein |
| Menge | Glucose |
| Spezifisches Gewicht oder Osmolarität | Blut/Blutzellen |
| pH-Wert | |

(*) Da ein längerer Futterentzug die Glucosemessungen bei den behandelten gegenüber den Kontrolltieren verzerren kann, sollte der Studienleiter entscheiden, ob eine Futterkarenz angezeigt ist. Die Dauer des Futterentzugs muss auf die verwendete Art abgestimmt sein; bei der Ratte kann sie 16 Stunden betragen (nächtliche Futterkarenz). Der Nüchternglucosewert kann nach nächtlicher Futterkarenz in der letzten Expositionswoche oder nach nächtlicher Futterkarenz vor der Nekropsie (in letzterem Fall zusammen mit allen anderen klinischen Pathologieparametern) bestimmt werden.

▼M4

39. Gibt es Anhaltspunkte dafür, dass die unteren Atemwege (d. h. die Alveolen) die Hauptablagerungs- und Retentionsorte sind, kann die bronchoalveoläre Lavage (BAL) die Methode der Wahl sein, um hypothesenbasierte Dosis-Wirkungs-Parameter quantitativ zu analysieren, wobei Alveolitis, Lungenentzündung und Phospholipidose im Vordergrund stehen. Auf diese Weise können Veränderungen der Dosis-Wirkungs-Beziehung und des zeitlichen Verlaufs alveolärer Läsionen angemessen untersucht werden. Die BAL-Flüssigkeit kann auf Gesamt- und Differenzialleukozytenzahl, Gesamtprotein und Laktatdehydrogenase analysiert werden. In Betracht gezogen werden können auch Parameter, die auf lysosomale Schäden, Phospholipidose, Fibrose und reizende oder allergische Entzündung hindeuten; dazu kann auch die Bestimmung entzündungsfördernder Zytokine/Chemokine gehören. BAL-Messungen dienen im Allgemeinen zur Ergänzung der Ergebnisse histopathologischer Untersuchungen, können sie aber nicht ersetzen. GD 39 (2) enthält eine Anleitung zur Durchführung der Lungenlavage.

OPHTHALMOLOGISCHE UNTERSUCHUNG

40. Mit einem Ophthalmoskop oder einem gleichwertigen Gerät werden vor der Verabreichung der Prüfsubstanz bei allen Tieren und nach Abschluss der Prüfung bei allen Hochkonzentrations- und Kontrollgruppen der Augenhintergrund, die brechenden Medien, die Iris und die Bindehaut untersucht. Werden Veränderungen der Augen festgestellt, sind alle Tiere in den anderen Gruppen, einschließlich der Satellitengruppe (Reversibilität) ebenfalls zu untersuchen.

MAKROSKOPISCHE PATHOLOGIE UND ORGANGEWICHTE

41. Alle Versuchstiere, einschließlich der Tiere, die während der Prüfung sterben oder aus Tierschutzgründen getötet und aus der Studie genommen werden, sind (falls möglich) vollständig zu entbluten und auf makroskopische Veränderungen zu untersuchen. Der Zeitabstand zwischen dem Ende der letzten Exposition des Tiers und seiner Tötung ist zu dokumentieren. Kann die Nekropsie nicht unmittelbar nach Auffinden eines toten Tieres erfolgen, sollte der Körper auf eine Temperatur gekühlt (nicht eingefroren) werden, die tief genug ist, um die Autolyse zu minimieren. Die Nekropsie ist baldmöglichst, in der Regel innerhalb von einem oder zwei Tagen durchzuführen. Alle makroskopischen Veränderungen sollten für jedes Tier protokolliert werden, wobei besonders auf Veränderungen der Atemwege zu achten ist.

42. In Tabelle 2 sind die Organe und Gewebe aufgeführt, die bei der Sektion zur histopathologischen Untersuchung in einem geeigneten Medium aufbewahrt werden sollten. Die Aufbewahrung der in **[**Klammern**]** gesetzten Organe und Gewebe sowie aller sonstigen Organe und Gewebe liegt im Ermessen des Studienleiters. Die durch **Fettdruck** hervorgehobenen Organe sind so bald wie möglich nach der Sektion von anhaftendem Gewebe zu befreien und feucht zu wiegen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Schilddrüse und die Nebenhoden sind nur zu wiegen, wenn dies notwendig ist, da ihre Befreiung von anhaftendem Gewebe die histopathologische Bewertung erschweren kann. Gewebe und Organe sind unmittelbar nach der Nekropsie und je nach verwendetem Fixierungsmittel mindestens 24-48 Stunden vor der Befreiung von anhaftendem Gewebe in 10 %ig gepuffertem Formalin oder einem anderen geeigneten Fixierungsmittel zu fixieren.

▼M4

*Tabelle 2*

**Bei der Nekropsie aufbewahrte Organe und Gewebe**

| | |
|---|---|
| **Nebennieren** | Speiseröhre |
| Aorta | [Riechkolben] |
| Knochenmark (und/oder frisches Aspirat) | **Ovarien** |
| **Gehirn** (mit Schnitten von Cerebrum, Cerebellum und Medulla/Pons) | Pankreas |
| Caecum | Nebenschilddrüsen |
| Kolon | Periphere Nerven (N. ischiadicus oder N. tibialis, vorzugsweise in der Nähe des Muskels) |
| Duodenum | Hypophyse |
| [**Nebenhoden**] | Prostata |
| [Augen (Netzhaut, Sehnerv) und Lider] | Rectum |
| Femur und Kniegelenk | Speicheldrüsen |
| Gallenblase (falls vorhanden) | Samenbläschen |
| [Hardersche Drüsen] | Haut |
| **Herz** | Rückenmark (zervical, mittlerer Thoraxbereich und lumbar) |
| Ileum | **Milz** |
| Jejunum | Brustbein |
| **Nieren** | Magen |
| [Tränendrüsen (extraorbital)] | Zähne |
| Larynx (3 Ebenen einschließlich der Basis der Epiglottis) | **Hoden** |
| **Leber** | **Thymus** |
| **Lunge** (alle Lungenlappen auf einer Ebene, einschließlich der Hauptbronchien) | **Schilddrüse** |
| Lymphknoten aus der Hilusregion der Lunge, insbesondere bei schlecht löslichen Prüfsubstanzen, die in Partikelform vorliegen. Für gründlichere Untersuchungen und/oder Studien mit immunologischem Schwerpunkt können zusätzliche Lymphknoten in Betracht gezogen werden, z. B. aus der mediastinalen, der cervicalen/submandibulären und/oder der aurikularen Region. | [Zunge] |
| Lymphknoten (distal vom Eingangsort) | Trachea (mindestens 2 Ebenen mit einem Längsschnitt durch die Carina und 1 Querschnitt) |
| Brustdrüsen (weibliche) | [Harnleiter] |
| Muskel (Oberschenkel) | [Harnröhre] |
| Nasopharyngeale Gewebe (mindestens 4 Ebenen; 1 Ebene muss den Nasen-Rachen-Gang und das Lymphgewebe des Nasen-Rachen-Raums (NALT) umfassen. | Harnblase |
| | **Uterus** |
| | Zielorgane |
| | Alle makroskopischen Läsionen und Massen |

▼M4

43. Die Lungen sind in intaktem Zustand zu entfernen, zu wiegen und mit einem geeigneten Fixierungsmittel bei einem Druck von 20-30 cm Wasser zu behandeln, damit die Lungenstruktur erhalten bleibt (5). Die Schnitte werden bei allen Lungenlappen auf einer Ebene einschließlich der Hauptbronchien hergestellt; wenn eine Lungenlavage durchgeführt wird, ist der nicht gewaschene Lappen jedoch auf drei Ebenen zu schneiden (keine seriellen Schnitte).

44. Mindestens vier Ebenen der nasopharyngealen Gewebe sind zu untersuchen; eine der Ebenen sollte den Nasen-Rachen-Gang umfassen (5, 6, 7, 8, 9), damit das Plattenepithel, das (nicht Zilien-tragende respiratorische) Übergangsepithel, das (Zilien-tragende respiratorische) Flimmerepithel und das Riechepithel sowie das Lymphgewebe (NALT; 10,11) gründlich untersucht werden können. Drei Ebenen des Larynx sind zu untersuchen; eine dieser Ebenen sollte die Basis der Epiglottis enthalten (12). Mindestens zwei Ebenen der Trachea sind zu untersuchen, darunter ein Längsschnitt durch die Carina der Bifurkation der extrapulmonalen Bronchien und ein Querschnitt.

HISTOPATHOLOGIE

45. Die in Tabelle 2 aufgeführten Organe und Gewebe der Tiere in der Kontrollgruppe und der Gruppe mit der höchsten Konzentration und aller während der Studie gestorbenen oder getöteten Tiere sollten histopathologisch untersucht werden. Besonderes Augenmerk ist auf Atemwege, Zielorgane und makroskopische Veränderungen zu richten. Die Organe und Gewebe, die in der Gruppe mit der höchsten Konzentration makroskopische Veränderungen aufweisen, sollten in allen Gruppen untersucht werden. Der Studienleiter kann beschließen, histopathologische Untersuchungen bei zusätzlichen Gruppen durchzuführen, um eine eindeutige Konzentrationswirkung nachzuweisen. Umfasst eine Prüfung auch eine Satellitengruppe (Reversibilitätsprüfung), sind alle Gewebe und Organe histopathologisch zu untersuchen, bei denen in den Behandlungsgruppen Wirkungen aufgetreten sind. Treten in der Gruppe mit der höchsten Konzentration übermäßig viele frühzeitige Todesfälle oder andere Probleme auf, die die Signifikanz der Daten beeinträchtigen, so ist die nächstniedrigere Konzentration histopathologisch zu untersuchen. Man sollte versuchen, die makroskopischen Befunde mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchung zu korrelieren.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Daten**

46. Körpergewichte, Futteraufnahme, Ergebnisse der klinischen Pathologie, makroskopische Befunde, Organgewichte und Ergebnisse der Histopathologie sind für die einzelnen Tiere anzugeben. Die Daten der klinischen Beobachtung sollten in tabellarischer Form zusammengefasst werden. Daraus müssen für jede Prüfgruppe die Anzahl der verwendeten Tiere, die Anzahl der Tiere mit spezifischen Toxizitätszeichen, die Anzahl der Tiere, die während der Prüfung tot aufgefunden oder vorzeitig getötet wurden, der Todeszeitpunkt der einzelnen Tiere, eine Beschreibung und der zeitliche Verlauf der toxischen Wirkungen und deren Reversibilität sowie die Sektionsbefunde ersichtlich sein. Sowohl die quantitativen als auch die gelegentlich erzielten Ergebnisse sind anhand eines geeigneten statistischen Verfahrens zu bewerten. Hierzu ist eine allgemein anerkannte Statistikmethode heranzuziehen; die Statistikmethoden sind bei der Auslegung der Studie festzulegen.

**Prüfbericht**

47. Der Prüfbericht sollte, soweit zutreffend, die folgenden Informationen enthalten:

*Versuchstiere und Tierhaltung*

— Beschreibung der Haltungsbedingungen mit Angaben zu Anzahl (oder Veränderung der Anzahl) der Tiere je Käfig, Einstreu, Umgebungstemperatur und relativer Luftfeuchtigkeit, Photoperiode und Futter,

▼M4

— Art/Stamm und Begründung für die Verwendung einer anderen Art als der Ratte; Daten zur Herkunft der Tiere und historische Daten können angegeben werden, wenn sie Tiere mit ähnlichen Expositions-, Unterbringungs- und Futterkarenzbedingungen betreffen,

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere,

— Randomisierungsmethode,

— Beschreibung etwaiger Vorbereitung vor der Prüfung, einschließlich Ernährung, Quarantäne und Behandlung von Krankheiten.

*Prüfsubstanz*

— physikalische Beschaffenheit, Reinheit und, wenn maßgeblich, physikalisch-chemische Eigenschaften (einschließlich Isomerisierung),

— Angaben zur Identifikation und CAS-Nummer (Chemical Abstract Services), falls bekannt.

*Vehikel*

— Begründung für die Verwendung eines Vehikels sowie für die Wahl des Vehikels (falls nicht Wasser),

— historische oder parallel erzeugte Daten, die belegen, dass das Vehikel keinen Einfluss auf das Ergebnis der Studie hat.

*Inhalationskammer*

— ausführliche Beschreibung der Inhalationskammer mit Angabe des Volumens sowie ein Diagramm,

— Herkunft und Beschreibung der für die Exposition der Tiere sowie für die Erzeugung der Atmosphäre verwendeten Ausrüstung,

— Ausrüstung für die Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Partikelgröße und tatsächlicher Konzentration,

— Herkunft der Luft und Klimatisierungssystem,

— für die Kalibrierung der Ausrüstung verwendete Methoden, um eine homogene Prüfatmosphäre sicherzustellen,

— Druckunterschied (positiv oder negativ),

— Expositions-Öffnungen je Kammer („Nose-only"-Exposition); Anordnung der Tiere in der Kammer (Ganzkörperexposition),

— Stabilität der Prüfatmosphäre,

— Lage von Temperatur- und Feuchtigkeitssensoren und Ort der Probenahme der Prüfatmosphäre in der Kammer,

— Behandlung der zugeführten/entzogenen Luft,

— Luftdurchflussraten, Luftdurchflussrate/Expositions-Öffnung („Nose-only"-Exposition) oder Anzahl der Tiere je Kammer (Ganzkörperexposition),

— Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts in der Inhalationskammer ($t_{95}$),

— Zahl der Volumenänderungen pro Stunde,

— Messgeräte (falls zutreffend).

*Expositionsdaten*

— Begründung für die Wahl der Zielkonzentration in der Hauptstudie,

▼**M4**

— nominale Konzentrationen (Gesamtmasse der in die Inhalationskammer eingeleiteten Prüfsubstanz dividiert durch das Volumen der durch die Kammer geleiteten Luft),

— im Atembereich der Tiere ermittelte tatsächliche Konzentrationen der Prüfsubstanz; bei Gemischen mit heterogenen physikalischen Formen (Gase, Dämpfe, Aerosole) kann jede Form getrennt analysiert werden,

— alle Luftkonzentrationen sollten in Masseneinheiten (z. B. mg/l, $mg/m^3$ usw.) und nicht in Volumeneinheiten (z. B. ppm, ppb usw.) angegeben werden,

— Partikelgrößenverteilung, mittlerer aerodynamischer Massendurchmesser (MMAD) und geometrische Standardabweichung (σg), einschließlich der Berechnungsmethoden. Einzelne Partikelgrößenanalysen sind zu protokollieren.

*Prüfbedingungen*

— Angaben zur Vorbereitung der Prüfsubstanz, einschließlich Angaben zu den Verfahren zur Reduzierung der Partikelgröße von Feststoffen oder zur Herstellung von Lösungen der Prüfsubstanz,

— eine Beschreibung (möglichst mit Diagramm) der Ausrüstung, die zur Erzeugung der Prüfatmosphäre und zur Exposition der Tiere gegen die Prüfatmosphäre verwendet wurde,

— Angaben zur Ausrüstung, die für die Überwachung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftstrom in der Kammer verwendet wird (Erstellung einer Kalibrationskurve),

— Angaben zur Ausrüstung, mit der die Proben zur Bestimmung der Konzentration in der Kammer und der Partikelgrößenverteilung genommen werden,

— Angaben zur verwendeten chemischen Analysemethode und zur Validierung der Methode (einschließlich der Effizienz der Wiederfindung der Prüfsubstanz im Medium),

— Randomisierungsmethode für die Einteilung der Tiere in Prüf- und Kontrollgruppen,

— Angaben über Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Wasserquelle),

— Begründung für die Wahl der Prüfkonzentrationen.

*Ergebnisse*

— tabellarische Darstellung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftstrom in der Kammer,

— tabellarische Darstellung von Daten zur nominalen und tatsächlichen Konzentration in der Kammer,

— tabellarische Darstellung der Partikelgrößendaten einschließlich Daten zur analytischen Probenahme, Partikelgrößenverteilung und Berechnung des MMAD und der $\sigma_g$,

— tabellarische Erfassung der erhobenen Daten und der Konzentration für jedes einzelne Tier (d. h. Tiere, die Anzeichen für Toxizität zeigen, einschließlich Mortalität, sowie Art, Schweregrad, Zeitpunkt des Einsetzens und Dauer der Wirkungen),

▼M4

— tabellarische Darstellung des Körpergewichts der einzelnen Tiere,

— tabellarische Darstellung der Futteraufnahme,

— tabellarische Darstellung der klinischen Pathologieparameter,

— Sektionsbefunde und histopathologische Ergebnisse für jedes einzelne Tier, falls vorhanden.

*Diskussion und Auswertung der Ergebnisse*

— Besondere Aufmerksamkeit sollte der Beschreibung der Methoden gelten, die verwendet wurden, um die Kriterien dieser Prüfmethode zu erfüllen, z. B. die Grenzkonzentration oder die Partikelgröße.

— Die Lungengängigkeit von Partikeln vor dem Hintergrund der Gesamtbefunde sollte behandelt werden, insbesondere, wenn die Partikelgrößenkriterien nicht erfüllt werden konnten.

— Die Kohärenz der Methoden zur Bestimmung der nominalen und der tatsächlichen Konzentration sowie die Beziehung der tatsächlichen Konzentration zur nominalen Konzentration sind in die Gesamtbewertung der Studie aufzunehmen.

— Die wahrscheinliche Todesursache und die vorherrschende Wirkungsweise (systemisch oder lokal) sollten behandelt werden.

— Falls Tiere, die unter Schmerzen litten oder Zeichen für schweres und anhaltendes Leiden aufwiesen, auf humane Weise getötet werden mussten, ist eine Erklärung auf der Grundlage der Kriterien im OECD Guidance Document on Humane Endpoints (3) zu geben.

— Die Zielorgane sollten identifiziert werden.

— Der NOAEL und der LOAEL sollten bestimmt werden.

*LITERATUR:*

1. OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

2. OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

3. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

4. Whalan E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5. Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material,* Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

6. Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

7. Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

8. Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

9. Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

10. Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

11. Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

12. Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

13. Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

▼**M4**

*Anlage 1*

DEFINITION

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

▼M4

## B.30 PRÜFUNGEN AUF CHRONISCHE TOXIZITÄT

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 452 (2009). Die ursprüngliche TG 452 wurde 1981 angenommen. Die Entwicklung dieser überarbeiteten Prüfmethode B.30 wurde für notwendig gehalten, um neueren Entwicklungen auf dem Gebiet des Tierschutzes sowie Regulierungsanforderungen Rechnung zu tragen (1) (2) (3) (4). Diese Prüfmethode B.30 wurde parallel zur Überarbeitung von Kapitel B.32 dieses Anhang „Prüfungen auf Kanzerogenität“ und Kapitel B.33 dieses Anhangs „Kombinierte Studien zur Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität“ aktualisiert mit dem Ziel, zusätzliche Informationen von den in der Untersuchung verwendeten Tieren und detailliertere Angaben zur Wahl der Dosis zu gewinnen. Diese Prüfmethode ist dazu ausgelegt, für die Prüfung eines breiten Spektrums von chemischen Stoffen, einschließlich Pestiziden und Industriechemikalien, verwendet zu werden.

2. Bei den meisten Prüfungen auf chronische Toxizität werden Nagetierarten verwendet; diese Prüfmethode gilt daher hauptsächlich für Prüfungen an diesen Arten. Wenn solche Prüfungen an Nichtnagern erforderlich sind, können die in dieser Prüfmethode beschriebenen Grundsätze und Verfahren in Kombination mit denen des Kapitels B.27 dieses Anhangs „Prüfung auf subchronische orale Toxizität — 90-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter Verabreichung an Nicht-Nagetieren“ (5), mit entsprechenden Änderungen, wie im OECD Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies (6) beschrieben, ebenfalls angewendet werden.

3. Bei Prüfungen auf chronische Toxizität finden im Wesentlichen die orale, die dermale und die inhalative Verabreichung Anwendung. Die Wahl des Verabreichungswegs hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz und der vorherrschenden Art der Exposition beim Menschen ab. Zusätzliche Informationen zur Wahl des Expositionswegs sind im OECD Guidance Document No. 116 (6) enthalten.

4. Bei dieser Prüfmethode steht die Exposition auf oralem Weg im Vordergrund. Dies ist der bei Prüfungen auf chronische Toxizität am häufigsten verwendete Expositionsweg. Zwar sind Prüfungen auf Langzeittoxizität mit Exposition über die Haut oder durch Inhalation möglicherweise auch notwendig, um das Risiko für die menschliche Gesundheit zu beurteilen, und/oder im Rahmen bestimmter Regelungen vorgeschrieben, aber diese beiden Expositionswege sind aus technischer Sicht außerordentlich komplex. Derartige Prüfungen sind von Fall zu Fall zu konzipieren, wobei die hier beschriebene Prüfmethode für die Bewertung und Evaluierung chronischer Toxizität bei oraler Verabreichung allerdings mit Bezug auf Empfehlungen für Behandlungszeiten, klinische und Pathologieparameter usw. als Grundlage für ein Protokoll für Inhalations- und/oder dermale Prüfungen dienen könnte. Es gibt OECD-Leitlinien für die Verabreichung von Prüfsubstanzen durch Inhalation (6) (7) und über die Haut (6). Bei der Konzeption länger dauernder Prüfungen mit Exposition durch Inhalation sind insbesondere Kapitel B.8 dieses Anhangs (8) und Kapitel B.29 dieses Anhangs (9) sowie das OECD Guidance Document über Prüfungen auf akute Toxizität nach Inhalation (7) zu berücksichtigen. Bei Prüfungen mit dermaler Applikation ist Kapitel B.9 dieses Anhangs (10) zu beachten.

▼M4

5. Die Prüfung auf chronische Toxizität liefert Informationen über mögliche gesundheitliche Schädigungen, die durch wiederholte Exposition über einen beträchtlichen Teil der Lebensdauer der verwendeten Art entstehen können. Sie liefert Informationen über die toxischen Wirkungen der Prüfsubstanz und gibt Hinweise auf Zielorgane und die Möglichkeit der Akkumulation. Außerdem kann sie zur Ableitung eines NOAEL-Werts (Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung) beitragen, der zur Festlegung von Sicherheitskriterien für die Humanexposition herangezogen werden kann. Ferner wird die Notwendigkeit sorgfältiger klinischer Beobachtung der Tiere hervorgehoben, damit so viele Informationen wie möglich gewonnen werden können.

6. Zu den Zielen von Prüfungen nach dieser Prüfmethode gehören

— die Feststellung der chronischen Toxizität einer Prüfsubstanz,

— die Identifizierung von Zielorganen,

— die Beschreibung der Dosis-Wirkungs-Beziehung,

— die Bestimmung eines NOAEL-Werts (Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung) oder eines Ausgangspunkts für die Festlegung einer Benchmark-Dosis (BMD),

— die Vorhersage der Wirkungen chronischer Toxizität beim Expositionsniveau von Menschen,

— die Gewinnung von Daten zur Prüfung von Hypothesen über die Wirkungsweise (6).

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

7. Bei der Beurteilung und Bewertung der toxikologischen Eigenschaften einer Prüfsubstanz sollte das Prüflabor vor Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz berücksichtigen, damit die Studienauslegung auf eine effizientere Prüfung des Potenzials für chronische Toxizität ausgerichtet und die Verwendung von Versuchstieren minimiert werden kann. Für die Auslegung der Studie könnten u. a. Informationen wie die Identität, die chemische Struktur und die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, sämtliche Informationen über die Wirkungsweise, Ergebnisse jeglicher In-vitro- oder In-vivo-Toxizitätsprüfungen, vorgesehene Verwendungen und die Möglichkeit der Exposition des Menschen, (Q)SAR-Daten und toxikologische Daten über strukturverwandte Substanzen, toxikokinetische Daten (Kinetik bei Einzel- und Mehrfachdosierung) sowie Daten aus anderen Studien mit wiederholter Exposition herangezogen werden. Die chronische Toxizität sollte erst bestimmt werden, wenn erste Informationen über die Toxizität aus Toxizitätsprüfungen mit wiederholter Gabe über 28 Tage und/oder 90 Tage vorliegen. Im Rahmen der Gesamtbewertung der potenziellen schädlichen Wirkungen einer bestimmten Prüfsubstanz auf die Gesundheit sollte bei der Prüfung auf chronische Toxizität etappenweise vorgegangen werden (11) (12) (13) (14).

8. Vor Beginn der Prüfung ist festzulegen, welche Statistikmethoden angesichts der Versuchsauslegung und der Ziele am besten für die Analyse der Ergebnisse geeignet sind. Dabei ist unter anderem festzulegen, ob bei der statistischen Auswertung Anpassungen in Bezug auf die Überlebensrate zu berücksichtigen sind und welche Art der Analyse bei vorzeitigem Tod der Tiere einer oder mehrerer Gruppen durchzuführen ist. Hinweise zu den geeigneten statistischen Analysen und wichtige Literaturverweise zu international anerkannten Statistikmethoden sind im Guidance Document No. 116 (6) sowie im Guidance Document No. 35 on the analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies (15) zu finden.

▼M4

9. Bei der Durchführung einer Prüfung auf chronische Toxizität sind stets die im OECD Guidance Document No. 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation (16), insbesondere in Absatz 62, genannten Grundsätze und Erwägungen zu befolgen. In diesem Absatz heißt es: *Wenn ein Tier in Studien mit wiederholter Verabreichung progressive klinische Anzeichen für eine fortschreitende Verschlechterung seines Zustands aufweist, ist eine informierte Entscheidung zu treffen, ob das Tier tierschutzgerecht getötet werden sollte oder nicht. Bei dieser Entscheidung sind Faktoren wie der Wert der Informationen, die bei Verbleiben des Tiers in der Studie gewonnen werden können, und der allgemeine Gesundheitszustand des Tiers gegeneinander abzuwägen. Wird beschlossen, das Tier in der Studie zu belassen, ist es entsprechend den Erfordernissen häufiger zu beobachten. Zur Linderung von Schmerzen oder Qualen kann auch die Verabreichung der Prüfsubstanz unterbrochen oder die Dosis verringert werden, sofern dabei der Zweck der Prüfung nicht beeinträchtigt wird.*

10. Ausführliche Informationen und eine Diskussion der Prinzipien der Dosiswahl bei Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität sind im Guidance Document No. 116 (6) sowie in zwei Veröffentlichungen des International Life Sciences Institute (17) (18) zu finden. Die grundlegende Strategie der Dosiswahl hängt von den Hauptzielen der Studie ab (Nummer 6). Bei der Auswahl der geeigneten Dosisstufen ist ein Gleichgewicht zwischen Gefahrenidentifizierung einerseits und der Beschreibung von Wirkungen bei geringer Dosierung und ihrer Relevanz andererseits herzustellen. Dieses Gleichgewicht ist bei einer kombinierten Studie zur Prüfung auf chronische Toxizität und auf Kanzerogenität (Kapitel B.33 dieses Anhangs) besonders wichtig (Nummer 11).

11. Es sollte in Betracht gezogen werden, statt der getrennten Durchführung einer Prüfung auf chronische Toxizität (diese Prüfmethode B.30) und einer Prüfung auf Kanzerogenität (Kapitel B.32 dieses Anhangs) eher eine kombinierte Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität (Kapitel B.33 dieses Anhangs) durchzuführen. Die kombinierte Methode ist zeit- und kosteneffizienter als zwei getrennte Studien, ohne dass dabei die Qualität der Daten der chronischen Komponente oder der Kanzerogenitätskomponente beeinträchtigt würde. Bei Durchführung einer kombinierten Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität (Kapitel B.33 dieses Anhangs) sind die Grundsätze der Dosiswahl (Nummer 9 und Nummern 20-25) jedoch genau zu beachten. Es wird allerdings anerkannt, dass im Rahmen bestimmter Regelungen möglicherweise getrennte Prüfungen vorgeschrieben sind.

12. Die im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe werden am Ende dieses Kapitels und im Guidance Document 116 (6) definiert.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

13. Die Prüfsubstanz wird mehreren Gruppen von Versuchstieren täglich in abgestuften Dosen verabreicht, und zwar normalerweise über einen Zeitraum von 12 Monaten, wobei je nach Regulierungsanforderungen (siehe Nummer 33) auch eine längere oder kürzere Dauer gewählt werden kann. Die Dauer sollte ausreichend lang sein, damit sich etwaige Wirkungen kumulativer Toxizität manifestieren können, ohne dass sich die verzerrenden Wirkungen geriatrischer Veränderungen bemerkbar machen. Abweichungen von der 12-monatigen Expositionsdauer sind zu begründen, insbesondere wenn eine kürzere Dauer gewählt wird. Die Prüfsubstanz wird in der Regel oral verabreicht, aber auch die Verabreichung durch Inhalation oder auf dermalem Weg kann angebracht sein. Die Studienauslegung kann auch eine oder mehrere zwischenzeitliche Tötungen vorsehen, z. B. nach 3 und 6 Monaten; außerdem können zu diesem Zweck auch zusätzliche Gruppen von Versuchstieren aufgenommen werden (siehe Nummer 19). Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere sorgfältig auf Toxizitätszeichen beobachtet. Tiere, die im Verlauf der Prüfung sterben, und vorzeitig getötete Tiere werden seziert; die nach Abschluss der Prüfung überlebenden Tiere werden getötet und ebenfalls seziert.

▼M4

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Auswahl von Versuchstierarten**

14. Diese Prüfmethode betrifft hauptsächlich die Bewertung und Evaluierung chronischer Toxizität bei Nagetieren (Nummer 2). Bestimmte Regelungen können jedoch ähnliche Studien an Nichtnagern vorschreiben. Die Wahl der Tierart ist zu begründen. Wenn Prüfungen auf chronische Toxizität bei Nichtnagern erforderlich sind, sollten Auslegung und Durchführung der Versuche auf den Grundsätzen der vorliegenden Prüfmethode sowie denen von Kapitel B.27 dieses Anhangs — Prüfung auf subchronische orale Toxizität — 90-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter Verabreichung an Nicht-Nagetieren (5) basieren. Zusätzliche Informationen zur Wahl der Tierart und des Stamms sind im Guidance Document No. 116 (6) enthalten.

15. Bei dieser Prüfmethode ist die Ratte die bevorzugte Nagetierart, doch können auch andere Nagetierarten, z. B. die Maus, verwendet werden. Ratten und Mäuse sind wegen ihrer relativ kurzen Lebenszeit, der weit verbreiteten Verwendung in pharmakologischen und toxikologischen Studien, ihrer Anfälligkeit für die Entstehung von Tumoren und der Verfügbarkeit ausreichend beschriebener Stämme die bevorzugten Versuchsmodelle. Daher liegen über ihre Physiologie und Pathologie umfangreiche Informationen vor. Es sind junge, gesunde, adulte Tiere aus üblicherweise eingesetzten Laborstämmen zu verwenden. Für die Prüfung auf chronische Toxizität sollten Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden wie für die kürzere(n) Toxizitätsvorstudie(n). Die weiblichen Tiere dürfen weder bereits geworfen haben noch trächtig sein.

**Haltungs- und Fütterungsbedingungen**

16. Die Tiere können entweder einzeln oder in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen in Käfigen untergebracht werden. Eine Einzelunterbringung ist nur in Betracht zu ziehen, wenn sie wissenschaftlich gerechtfertigt ist (19) (20) (21). Die Käfige sollten so angeordnet werden, dass etwaige Einflüsse der Käfigplatzierung minimiert werden. Die Temperatur im Versuchstierraum sollte 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte mindestens 30 % betragen und — außer beim Reinigen des Raums — 70 % nicht überschreiten. Angestrebt werden sollte eine Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, und eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung ist zu gewährleisten. Das Futter sollte den Nährstoffbedarf der eingesetzten Tierart decken und möglichst wenig Schadstoffe wie z. B. Pestizidrückstände, persistente organische Schadstoffe, Phytoöstrogene, Schwermetalle und Mykotoxine enthalten, die das Ergebnis der Prüfung beeinflussen könnten. Das Futter ist regelmäßig, und zwar zumindest zu Beginn der Prüfung und bei Verwendung einer anderen Charge, auf den Nährstoff- und Schadstoffgehalt hin zu analysieren; die Ergebnisse sind im Abschlussbericht anzugeben. Ergebnisse von Analysen des in der Prüfung verwendeten Trinkwassers sind ebenfalls anzugeben. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung einer Prüfsubstanz und die Deckung des Nährstoffbedarfs der Tiere sichergestellt werden muss, wenn die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht wird.

**Vorbereitung der Tiere**

17. Es sind gesunde Tiere zu verwenden, die mindestens sieben Tage an die Laborbedingungen gewöhnt und zuvor nicht für andere Experimente verwendet wurden. Bei Nagetieren sollte die Verabreichung so bald wie möglich nach dem Absetzen und der Eingewöhnung beginnen, vorzugsweise bevor die Tiere 8 Wochen alt sind. Art, Stamm, Herkunft, Geschlecht, Gewicht und Alter der Versuchstiere sind anzugeben. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede bei den Tieren beider Geschlechter möglichst gering sein und ± 20 % des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts aller Tiere in der Studie nicht überschreiten. Die Tiere werden nach dem Zufallsprinzip in Kontroll- und Behandlungsgruppen eingeteilt.

▼M4

Nach der Randomisierung sollte sich das Durchschnittsgewicht der Tiere desselben Geschlechts von Gruppe zu Gruppe nicht signifikant unterscheiden. Gibt es statistisch signifikante Unterschiede, sollte die Randomisierung möglichst wiederholt werden. Jedes Versuchstier erhält zur sicheren Identifizierung eine eigene Nummer und wird durch Tätowierung, Mikrochipimplantat oder auf eine andere geeignete Weise mit dieser Nummer gekennzeichnet.

VERFAHREN

**Zahl und Geschlecht der Versuchstiere**

18. Es sind Tiere beider Geschlechter zu verwenden. Es sind so viele Tiere zu verwenden, dass am Ende der Studie in jeder Gruppe genug Tiere für eine gründliche biologische und statistische Auswertung zur Verfügung stehen. Bei Nagern sind in der Regel auf jeder Dosisstufe je Gruppe mindestens je 20 Tiere beider Geschlechter zu verwenden, bei Nichtnagern werden pro Gruppe mindestens je 4 Tiere beider Geschlechter empfohlen. Bei Studien an Mäusen werden in jeder Dosisgruppe möglicherweise zusätzliche Tiere benötigt, um alle erforderlichen hämatologischen Bestimmungen vornehmen zu können.

**Tötungen im Verlauf der Studie, Satellitengruppen und Sentineltiere**

19. Es kann vorgesehen werden, dass im Verlauf der Studie, z. B. nach sechs Monaten, Tiere getötet werden (mindestens 10 Tiere/Geschlecht/Gruppe), um Erkenntnisse über den Fortgang toxikologischer Veränderungen und mechanistische Informationen zu gewinnen, falls dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Wenn diese Informationen bereits aus vorherigen Studien mit wiederholter Gabe der Prüfsubstanz vorliegen, sind zwischenzeitliche Tötungen möglicherweise wissenschaftlich nicht gerechtfertigt. Es können auch Satellitengruppen aufgenommen werden, um die Reversibilität etwaiger toxikologischer Veränderungen zu beobachten, die durch die Prüfsubstanz hervorgerufen werden. Satellitengruppen sind normalerweise auf die höchste Dosisgruppe der Studie zuzüglich einer Kontrolle beschränkt. Der Krankheitsstatus während der Studie kann erforderlichenfalls auch mit einer zusätzlichen Gruppe von Sentineltieren (normalerweise je fünf Tiere beider Geschlechter) überwacht werden (22). Sollen im Verlauf der Prüfung Tiere getötet werden oder Satelliten- oder Sentinelgruppen aufgenommen werden, ist die Zahl der Tiere in der Studienauslegung um die Zahl zu erhöhen, die vor Abschluss der Studie getötet werden sollen. Diese Tiere sind normalerweise in Bezug auf die Bestimmung des Körpergewichts und der Futter-/Wasseraufnahme, hämatologische und klinisch-biochemische Bestimmungen sowie pathologische Untersuchungen genauso zu behandeln wie die Tiere in der chronischen Toxizitätsphase der Hauptstudie; es kann allerdings vorgesehen werden, die Messungen (in den Gruppen mit im Verlauf der Studie zu tötenden Tieren) auf bestimmte Schlüsselaspekte wie Neurotoxizität oder Immunotoxizität zu beschränken.

**Dosisgruppen und Dosierung**

20. Das Guidance Document No. 116 (6) enthält Hinweise zu allen Aspekten der Dosiswahl und zu den Abständen der Dosisstufen. Es sollten mindestens drei Dosisstufen und eine gleichzeitige Kontrolle verwendet werden, es sei denn, ein Limit-Test wird durchgeführt (siehe Nummer 27). Die Dosisstufen werden im Allgemeinen auf der Grundlage der Ergebnisse von Studien mit kurzzeitiger wiederholter Verabreichung oder Dosisfindungsstudien festgelegt und sollten alle vorliegenden toxikologischen und toxikokinetischen Daten für die Prüfsubstanz oder verwandte Stoffe berücksichtigen.

▼M4

21. Soweit keine Beschränkungen aufgrund der physikalisch-chemischen Beschaffenheit oder der biologischen Wirkungen der Prüfsubstanz bestehen, ist die höchste Dosisstufe normalerweise so zu wählen, dass zwar die Hauptzielorgane und die toxischen Wirkungen identifiziert werden können, aber Leiden, schwere Toxizität, Morbidität oder Tod der Tiere vermieden werden. Unter Berücksichtigung der unter Nummer 22 beschriebenen Faktoren ist die höchste Dosisstufe so zu wählen, dass Anzeichen von Toxizität hervorgerufen werden, die sich z. B. in einer verzögerten Körpergewichtsentwicklung äußern (etwa 10 %).

22. Je nach den Zielen der Studie (siehe Nummer 6) kann jedoch eine Höchstdosis festgelegt werden, die unter der zu Toxizitätszeichen führenden Dosis liegt, z. B. wenn eine Dosis eine besorgniserregende Wirkung auslöst, die sich aber nur geringfügig auf Lebensdauer oder Körpergewicht auswirkt. *Die* Höchstdosis darf 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag nicht übersteigen (Grenzdosis siehe Nummer 27).

23. Die Dosisstufen und die Abstände der Dosisstufen können so gewählt werden, dass auf der niedrigsten Dosisstufe eine Dosis-Wirkungs-Beziehung und ein NOAEL-Wert oder andere angestrebte Studienergebnisse, z. B. ein BMD (siehe Nummer 25), festgestellt werden können. Zu den Faktoren, die bei der Festlegung niedrigerer Dosen zu berücksichtigen sind, gehören die voraussichtliche Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve, die Dosen, bei denen wichtige Änderungen des Metabolismus oder der toxischen Wirkungsweise eintreten können, und das Niveau, bei dem eine Schwelle oder ein Ausgangspunkt für eine Extrapolation niedriger Dosen erwartet wird.

24. Welche Dosisstufenabstände gewählt werden, hängt von den Merkmalen der Prüfsubstanz ab und kann in dieser Prüfmethode nicht vorgeschrieben werden. Abstände mit einem Faktor von 2 bis 4 erweisen sich jedoch oft als gut geeignet für die Festsetzung abnehmender Dosisstufen. Außerdem ist es oft besser, statt der Verwendung sehr großer Intervalle (z. B. mit einem Faktor zwischen 6 und 10) zwischen den Dosierungen eine vierte Prüfgruppe einzurichten. Die Verwendung von Faktoren über 10 sollte im Allgemeinen vermieden bzw. gegebenenfalls begründet werden.

25. Entsprechend dem Guidance Document No. 116 (6) sind bei der Dosisfestlegung u. a. folgende Faktoren zu berücksichtigen:

— bekannte oder vermutete Nichtlinearitäten oder Wendepunkte der Dosis-Wirkungs-Kurve;

— Toxikokinetik und Dosisbereiche, bei denen die metabolische Induktion, die Sättigung oder die Nichtlinearität zwischen externen und internen Dosen auftritt oder nicht auftritt;

— Vorläuferläsionen, Wirkungsmarker oder Indikatoren für den Ablauf zugrunde liegender biologischer Schlüsselprozesse;

— wichtige (oder vermutete) Aspekte der Wirkungsweise, z. B. Dosen, ab denen Zytotoxizität auftritt, Hormonspiegel beeinflusst werden, homöostatische Mechanismen gestört werden usw.;

— Bereiche der Dosis-Wirkungs-Kurve, bei denen eine besonders genaue Schätzung erforderlich ist, z. B. im Bereich der voraussichtlichen BMD oder einer vermuteten Schwelle;

— Berücksichtigung voraussichtlicher Expositionsniveaus von Menschen.

▼M4

26. Die Kontrollgruppe ist eine unbehandelte Gruppe oder eine Vehikelkontrollgruppe, sofern ein Vehikel zur Verabreichung der Prüfsubstanz verwendet wird. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfsubstanz sollten die Tiere der Kontrollgruppe genauso behandelt werden wie die Tiere in den Prüfgruppen. Wird ein Vehikel verwendet, erhält die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten bei den Dosisgruppen verwendeten Volumen. Wird eine Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht, und führt dies aus geschmacklichen Gründen zu einer verminderten Futteraufnahme, kann eine paarweise gefütterte Kontrollgruppe nützlich und eine bessere Kontrolle sein.

27. Wenn aufgrund von Informationen aus Vorstudien davon ausgegangen werden kann, dass eine Prüfung bei einer einzigen Dosisstufe von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag unter Anwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren wahrscheinlich keine schädlichen Wirkungen hervorrufen wird und wenn aufgrund der Daten strukturverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten ist, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen gegebenenfalls verzichtet werden. Sofern die Exposition des Menschen nicht die Prüfung bei einer höheren Dosis erforderlich erscheinen lässt, kann eine Grenze von 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag angewandt werden.

**Zubereitung der Dosen und Verabreichung der Prüfsubstanz**

28. Die Prüfsubstanz wird in der Regel oral, d. h. mit der Nahrung oder dem Trinkwasser, oder über eine Schlundsonde verabreicht. Zusätzliche Informationen zu Verabreichungswegen und -methoden sind im Guidance Document No. 116 (6) enthalten. Verabreichungsweg und -methode richten sich nach dem Zweck der Studie, den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, ihrer Bioverfügbarkeit und der vorherrschenden Art der Exposition beim Menschen. Der gewählte Verabreichungsweg und die Methode sollten begründet werden. Aus Tierschutzgründen sollte die Schlundsonde nur für Agenzien gewählt werden, bei denen dieser Weg und diese Methode der Verabreichung die potenzielle Humanexposition annähernd repräsentieren (z. B. Arzneimittel). Nahrungs- oder Umweltchemikalien einschließlich Pestizide werden normalerweise mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreicht. Für bestimmte Szenarios, z. B. berufliche Exposition, können andere Applikationswege besser geeignet sein.

29. Bei Bedarf wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Zu berücksichtigen sind gegebenenfalls folgende Merkmale des Vehikels und anderer Additive: Auswirkungen auf die Resorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Retention der Prüfsubstanz, Auswirkungen auf die chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, die deren toxische Eigenschaften verändern können, und ferner Auswirkungen auf die Futter- oder Wasseraufnahme oder den Ernährungszustand der Versuchstiere. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspenion, sodann eine Lösung/Emulsion in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in anderen Vehikeln in Betracht zu ziehen. Bei anderen Vehikeln als Wasser müssen deren toxische Merkmale bekannt sein. Es sollten Informationen über die Stabilität der Prüfsubstanz und die Homogenität der Lösungen oder Futterrationen, die (je nach Fall) die Dosierung enthalten, unter den Verabreichungsbedingungen (z. B. mit dem Futter) vorliegen.

30. Für mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichte Stoffe ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfsubstanz die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Um eine unausgewogene Ernährung zu vermeiden, sollte die Konzentration der Prüfsubstanz in Langzeittoxizitätsstudien mit Verabreichung über die Nahrung normalerweise eine Obergrenze von 5 % der Gesamtnahrung nicht übersteigen. Wenn die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht wird, kann entweder eine konstante Futterkonzentration (mg/kg Futter oder ppm) oder eine konstante Dosierung in Relation zum Körpergewicht des Tiers (mg/kg Körpergewicht), berechnet auf Wochenbasis, verwendet werden. Die jeweils gewählte Verfahrensweise ist anzugeben.

▼M4

31. Bei oraler Verabreichung erhalten die Tiere die Prüfsubstanz täglich (sieben Tage in der Woche), in der Regel für einen Zeitraum von 12 Monaten (siehe auch Nummer 33); je nach Regulierungsanforderungen kann auch eine längere Dauer erforderlich sein. Jede Abweichung von diesem Dosierungsplan, z. B. fünf Tage pro Woche, ist zu begründen. Bei dermaler Applikation werden die Tiere, wie in Kapitel B.9 dieses Anhangs (10) beschrieben, für einen Zeitraum von 12 Monaten an sieben Tagen in der Woche mindestens 6 Stunden pro Tag mit der Prüfsubstanz behandelt. Die Inhalationsexposition wird an sieben Tagen in der Woche für 6 Stunden pro Tag durchgeführt, aber auch fünf Tage in der Woche sind möglich, wenn dies gerechtfertigt ist. Die Expositionsdauer beträgt normalerweise 12 Monate. Wenn für eine „Nose-only"-Exposition andere Nagetierarten als Ratten verwendet werden, kann die maximale Expositionsdauer angepasst werden, um artenspezifisches Leiden zu minimieren. Eine Expositionsdauer von weniger als 6 Stunden pro Tag ist zu begründen. Siehe auch Kapitel B.8 dieses Anhangs (8).

32. Wird die Prüfsubstanz über eine Sonde verabreicht, so sollte dies unter Verwendung einer Schlundsonde oder einer geeigneten Intubationskanüle jeweils zur gleichen Tageszeit erfolgen. Normalerweise wird einmal am Tag eine einzige Dosis verabreicht; wenn es sich bei der Prüfsubstanz z. B. um einen lokal reizenden Stoff handelt, kann die Tagesdosis auf zwei Teilmengen aufgeteilt werden. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte so gering wie möglich sein und bei Nagetieren normalerweise 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten (22). Die Variabilität der Prüfvolumina sollte durch Anpassung der Konzentration auf ein konstantes Volumen bei allen Dosen möglichst gering gehalten werden. Davon ausgenommen sind potenziell ätzende oder reizende Stoffe, die zur Vermeidung schwerwiegender lokaler Wirkungen verdünnt werden müssen. Die Prüfung in Konzentrationen, die wahrscheinlich eine ätzende oder reizende Wirkung für den Magen-Darm-Trakt haben, ist zu vermeiden.

**Versuchsdauer**

33. Diese Prüfmethode ist zwar hauptsächlich zur Prüfung auf chronische Toxizität über 12 Monate ausgelegt, aber je nach den Anforderungen bestimmter Regulierungsregelungen oder für spezifische mechanistische Zwecke sind auch kürzere (z. B. 6 oder 9 Monate) oder längere (z. B. 18 oder 24 Monate) Zeiträume möglich. Abweichungen von der 12-monatigen Expositionsdauer sind zu begründen, insbesondere wenn eine kürzere Dauer gewählt wird. Satellitengruppen zur Beobachtung der Reversibilität von toxikologischen Veränderungen, die durch die Prüfsubstanz hervorgerufen werden, sollten nach Beendigung der Exposition noch für einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen, aber nicht länger als ein Drittel der Gesamtstudiendauer ohne Behandlung beibehalten werden. Weitere Hinweise, insbesondere in Bezug auf das Überleben der Versuchstiere, sind im Guidance Document No. 116 (6) zu finden.

BEOBACHTUNGEN

34. Alle Tiere sind in der Regel jeden Tag morgens und abends, auch am Wochenende und an Feiertagen, auf Anzeichen von Morbidität und Mortalität hin zu untersuchen. Allgemeine klinische Beobachtungen sollten mindestens einmal täglich, vorzugsweise zur selben Tageszeit, unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis über eine Schlundsonde zu erwarten ist, vorgenommen werden.

▼M4

35. Bei allen Tieren sind mindestens einmal vor der ersten Exposition (für intraindividuelle Vergleiche), am Ende der ersten Studienwoche und danach monatlich gründliche klinische Beobachtungen vorzunehmen. Das Beobachtungsprotokoll ist so zu gestalten, dass Abweichungen zwischen den Beobachtern minimiert werden und von der Prüfgruppe unabhängig stattfinden. Diese Beobachtungen sollten außerhalb des Käfigs erfolgen, in dem die Tiere gehalten werden, und zwar vorzugsweise in einem Standardgehege jeweils zu denselben Zeiten. Sie sind sorgfältig zu dokumentieren, am besten nach einer speziell vom Prüflabor entwickelten Bewertungsskala. Die Beobachtungsbedingungen sollten möglichst konstant sein. Zu achten ist insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, auf Sekrete und Exkrete sowie autonome Aktivitäten (z. B. Tränensekretion, Piloerektion, Pupillengröße, ungewöhnliche Atemmuster). Gang- und Haltungsstörungen, ferner Reaktionen auf den Umgang mit den Tieren sowie etwaige klonische oder tonische Bewegungen, Stereotypien (z. B. übermäßiges Putzen, wiederholte Kreisbewegungen) oder abnormes Verhalten (z. B. Selbstverstümmelung, Rückwärtsgehen) sollten auch dokumentiert werden (24).

36. Alle Tiere sind vor der ersten Verabreichung der Prüfsubstanz mit einem Ophthalmoskop oder einem anderen geeigneten Instrument ophthalmologisch zu untersuchen. Am Ende der Studie ist diese Untersuchung möglichst bei allen, aber mindestens bei der Hochdosisgruppe und der Kontrollgruppe zu wiederholen. Wenn behandlungsbedingte Veränderungen an den Augen beobachtet werden, sind alle Tiere zu untersuchen. Wenn eine Strukturanalyse oder andere Informationen auf eine Toxizität für die Augen hindeuten, ist die Frequenz der Augenuntersuchungen zu erhöhen.

37. Bei Chemikalien, für die vorangegangene Toxizitätsprüfungen mit wiederholter Gabe über 28 und/oder 90 Tage auf potenzielle neurotoxische Wirkungen hindeuten, können vor Studienbeginn, in Abständen von drei Monaten nach Beginn einer Studie von bis zu 12 Monaten einschließlich sowie bei Beendigung der Studie (falls länger als 12 Monate) fakultativ die sensorische Reaktivität auf Reize verschiedener Art (24) (z. B. akustische, visuelle und propriozeptive Reize) (25), (26), (27), die Greifkraft (28) und die motorische Aktivität (29) bewertet werden. Weitere Einzelheiten zu den möglichen Untersuchungen finden sich in der Literatur. Allerdings können auch andere als dort genannte Verfahren angewendet werden.

38. Bei Chemikalien, für die vorangegangene Toxizitätsprüfungen mit wiederholter Gabe über 28 und/oder 90 Tage auf potenzielle immunotoxische Wirkungen hindeuten, können bei Beendigung der Studie fakultativ weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

**Körpergewicht, Futter-/Wasseraufnahme und Futtereffizienz**

39. Alle Tiere sollten zu Beginn der Behandlung, in den ersten 13 Wochen mindestens einmal wöchentlich und danach mindestens monatlich gewogen werden. Futteraufnahme und Futtereffizienz sollten in den ersten 13 Wochen mindestens wöchentlich und danach mindestens monatlich bestimmt werden. Die Trinkwasseraufnahme sollte in den ersten 13 Wochen mindestens wöchentlich und danach mindestens monatlich gemessen werden, wenn die Prüfsubstanz mit dem Trinkwasser verabreicht wird. Bei Studien, in denen das Trinkverhalten der Tiere verändert ist, sollte auch die Trinkwasseraufnahme gemessen werden.

▼M4

**Hämatologie und klinische Biochemie**

40. Bei Prüfungen an Nagetieren sind die hämatologischen Untersuchungen bei mindestens zehn männlichen und zehn weiblichen Tieren je Gruppe nach 3, 6 und 12 Monaten sowie bei Beendigung der Studie (falls sie länger als 12 Monate dauert) durchzuführen, wobei immer dieselben Tiere zu verwenden sind. Bei Mäusen werden möglicherweise Satellitentiere benötigt, um alle erforderlichen hämatologischen Bestimmungen vornehmen zu können (siehe Nummer 18). Bei Prüfungen an Nichtnagern werden die Proben wie bei Nagetieren beschrieben in den Zwischenphasen und bei Beendigung der Studie von einer kleineren Anzahl Tieren (z. B. vier Tiere je Geschlecht und je Gruppe in Hundestudien) genommen. Weder bei Nagern noch bei Nichtnagern brauchen Messungen nach drei Monaten vorgenommen zu werden, wenn bei den hämatologischen Parametern in einer vorangegangenen 90-Tage-Studie mit vergleichbaren Dosisstufen keine Wirkung erkennbar war. Die Blutproben müssen unter Anästhesie an einer benannten Stelle, z. B. durch Herzpunktion oder aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen werden.

41. Die folgenden Parameter sind zu bestimmen (30): Gesamt- und Differenzialleukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit, mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (MCV), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Prothrombinzeit und aktivierte partielle Thromboplastinzeit. Je nach Toxizität der Prüfsubstanz können gegebenenfalls auch weitere hämatologische Parameter wie Heinz-Körper oder andere atypische Erythrozytenmorphologie oder Methämoglobin gemessen werden. Insgesamt ist je nach den beobachteten und/oder erwarteten Wirkungen der Prüfsubstanz mit der entsprechenden Flexibilität vorzugehen. Wenn die Prüfsubstanz Auswirkungen auf die Hämatopoese hat, können auch eine Bestimmung der Retikulozytenzahl und eine Knochenmarkzytologie angezeigt sein; sie müssen aber nicht routinemäßig durchgeführt werden.

42. Klinisch-biochemische Bestimmungen zur Untersuchung der wichtigsten toxischen Wirkungen in Geweben, insbesondere der Wirkungen auf Nieren und Leber, sind an Blutproben durchzuführen, die von mindestens zehn männlichen und zehn weiblichen Tieren je Gruppe in den für die hämatologischen Untersuchungen angegebenen gleichen Zeitabständen entnommen werden, wobei immer dieselben Tiere zu verwenden sind. Bei Mäusen werden möglicherweise Satellitentiere benötigt, um alle erforderlichen klinisch-biochemischen Bestimmungen vornehmen zu können. Bei Prüfungen an Nichtnagern werden die Proben wie bei Nagetieren beschrieben in den Zwischenphasen und bei Beendigung der Studie von einer kleineren Anzahl Tieren (z. B. vier Tiere je Geschlecht und je Gruppe in Hundestudien) genommen. Weder bei Nagern noch bei Nichtnagern brauchen Messungen nach drei Monaten vorgenommen zu werden, wenn bei den klinisch-biochemischen Parametern in einer vorangegangenen 90-Tage-Studie mit vergleichbaren Dosisstufen keine Wirkung erkennbar war. Es empfiehlt sich eine Futterkarenz der Tiere (ausgenommen Mäuse) über Nacht, bevor die Blutproben entnommen werden. Die folgenden Parameter sind zu bestimmen (30): Glucose, Harnstoff (Harnstoff-Stickstoff), Kreatinin, Gesamtprotein, Albumin, Calcium, Natrium, Kalium, Gesamtcholesterin, mindestens zwei geeignete Parameter für die hepatozelluläre Evaluierung (Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Glutamatdehydrogenase, Gesamtgallensäuren) (31) und mindestens zwei geeignete Parameter für die hepatobiliäre Evaluierung (alkalische Phosphatase, γ-Glutamyltransferase, 5'-Nucleotidase, Gesamtbilirubin, Gesamtgallensäuren) (31). Je nach Toxizität der Prüfsubstanz können gegebenenfalls auch weitere klinisch-chemische Parameter wie Nüchtern-Triglyceride, spezifische Hormone und Cholinesterase bestimmt werden. Insgesamt ist je nach den beobachteten und/oder erwarteten Wirkungen der Prüfsubstanz mit der entsprechenden Flexibilität vorzugehen.

▼M4

43. An Proben, die von mindestens zehn männlichen und zehn weiblichen Tieren je Gruppe in den gleichen Abständen entnommen wurden wie die Proben für die hämatologische und die klinisch-chemische Untersuchung, sind Urinanalysen durchzuführen. Es brauchen keine Messungen nach drei Monaten vorgenommen zu werden, wenn bei der Urinanalyse in einer vorangegangenen 90-Tage-Studie mit vergleichbaren Dosisstufen keine Wirkung erkennbar war. Eine Empfehlung von Sachverständigen zu klinischen Pathologiestudien (30) enthält die folgende Liste von Parametern: Aussehen, Volumen, Osmolalität oder spezifisches Gewicht, pH-Wert, Gesamteiweiß und Glucose. Außerdem können Ketone, Urobilinogen, Bilirubin und okkultes Blut bestimmt werden. Sofern erforderlich, können weitere Parameter verwendet werden, um die Untersuchung beobachteter Wirkungen zu erweitern.

44. Bei Studien an Hunden werden im Allgemeinen Bestimmungen der Ausgangsdaten hämatologischer und klinisch-biochemischer Parameter für notwendig gehalten; bei Studien an Nagern müssen sie aber nicht bestimmt werden (30). Wenn keine ausreichenden historischen Ausgangsdaten vorliegen (siehe Nummer 50), sollten sie jedoch bestimmt werden.

**Pathologie**

*Makroskopische Untersuchung*

45. Normalerweise sind alle an der Studie beteiligten Tiere einer vollständigen, eingehenden makroskopischen Untersuchung zu unterziehen, die die sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel-, Brust- und Bauchhöhlen und ihres Inhalts umfasst. Es kann jedoch auch vorgesehen werden, die Untersuchungen (in den Gruppen der Tiere, die im Verlauf der Studie getötet werden sollen, und in den Satellitengruppen) auf spezifische Schlüsselaspekte wie Neurotoxizität oder Immunotoxizität zu beschränken (siehe Nummer 19). Diese Tiere brauchen weder seziert noch den nachstehend beschriebenen Verfahren unterzogen zu werden. Sentineltiere können nach Ermessen des Studienleiters von Fall zu Fall seziert werden.

46. Die Organgewichte aller Tiere sind zu erfassen, außer von denen, die gemäß dem letzten Teil von Nummer 45 ausgenommen sind. Nebennieren, Gehirn, Nebenhoden, Herz, Nieren, Leber, Ovarien, Milz, Hoden, Schilddrüse (nach Fixierung gewogen, mit Nebenschilddrüsen) und Uterus (außer von moribund aufgefundenen und/oder zwischenzeitlich getöteten Tieren) sind in angemessener Form von anhaftendem Gewebe zu befreien, und ihr Nassgewicht ist so rasch wie möglich nach der Sektion festzustellen, um ein Austrocknen zu verhindern. Bei einer Studie an Mäusen ist das Wiegen der Nebennieren fakultativ.

47. Die folgenden Gewebe sind in dem für die betreffende Gewebeart und die vorgesehene anschließende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmittel aufzubewahren (32) (Gewebe in eckigen Klammern sind fakultativ):

| | | | |
|---|---|---|---|
| alle makroskopischen Veränderungen | Herz | Pankreas | Magen (Vormagen, Drüsenmagen) |
| Nebennieren | Ileum | Nebenschilddrüse | [Zähne] |
| Aorta | Jejunum | periphere Nerven | Hoden |
| Gehirn (mit Schnitten von Cerebrum, Cerebellum und Medulla/Pons) | Nieren | Hypophyse | Thymus |
| Caecum | Tränendrüse (exorbital) | Prostata | Schilddrüse |
| Zervix | Leber | Rectum | [Zunge] |

▼M4

| | | | |
|---|---|---|---|
| Koagulationsdrüse | Lunge | Speicheldrüse | Trachea |
| Kolon | Lymphknoten (sowohl oberflächliche als auch tiefe) | Samenbläschen | Harnblase |
| Duodenum | Brustdrüse (obligatorisch für Weibchen und, falls bei der Sektion erkennbar, für Männchen) | Skelettmuskel | Uterus (mit Zervix) |
| Nebenhoden | [obere Atemwege, einschließlich Nase, Nasenmuscheln und Nasennebenhöhlen] | Haut | [Harnleiter] |
| Auge (mit Netzhaut) | Speiseröhre | Rückenmark (auf 3 Ebenen: zervical, mittlerer Thoraxbereich und lumbar) | [Harnröhre] |
| [Femur mit Gelenk] | [Riechkolben] | Milz | Vagina |
| Gallenblase (bei anderen Arten als Ratten) | Ovarien | [Brustbein] | Knochenmarkschnitt und/oder ein frisches Knochenmark-Aspirat |
| Hardersche Drüse | | | |

Bei paarigen Organen, z. B. Nieren, Nebennieren, sind beide Organe aufzubewahren. Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebeuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz als mögliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden. In Studien mit dermaler Applikation sind die in der Liste für orale Verabreichung aufgeführten Organe aufzubewahren; außerdem sind Proben der Haut an der Applikationsstelle zu nehmen und aufzubewahren. Bei Inhalationsstudien entspricht die Liste der aufzubewahrenden und zu untersuchenden Gewebe des Atemtrakts den Empfehlungen von Kapitel B.8 dieses Anhangs (8) und Kapitel B.29 dieses Anhangs (9). Was andere Organe/Gewebe betrifft, so sollten (zusätzlich zu den speziell konservierten Geweben aus dem Atemtrakt) die in der Liste für die orale Verabreichung genannten Organe untersucht werden.

*Histopathologie*

48. Es gibt Leitlinien für bewährte Praktiken bei der Durchführung toxikologischer Pathologiestudien (32). Histopathologisch zu untersuchen sind mindestens

— alle Gewebe der Tiere aus der Hochdosisgruppe und der Kontrollgruppe,

— alle Gewebe von während der Studie gestorbenen oder getöteten Tieren,

— alle Gewebe mit makroskopischen Abnormitäten,

— Zielgewebe oder Gewebe, die in der Hochdosisgruppe behandlungsbedingte Veränderungen aufwiesen, von allen Tieren in allen anderen Dosisgruppen,

— bei paarigen Organen, z. B. Nieren, Nebennieren, sind beide Organe zu untersuchen.

▼M4

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Daten**

49. Für alle bestimmten Parameter sollen Daten zu den einzelnen Tieren angegeben werden. Darüber hinaus sollten alle Daten in Form einer Tabelle zusammengefasst werden, aus der für jede Prüfgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Zahl der Tiere bei Beginn der Prüfung und die Zahl der während der Prüfung tot aufgefundenen oder aus Tierschutzgründen getöteten Tiere, ferner der Zeitpunkt des Todes oder der Tötung, die Zahl der Tiere, die Toxizitätszeichen aufweisen, eine Beschreibung der beobachteten Toxizitätszeichen, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen erstmalig aufgetreten sind, ihrer Dauer und ihres Schweregrads, die Zahl der Tiere mit Läsionen, die Art der Läsionen und der Prozentsatz der von jeder Läsion betroffenen Tiere. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (für kontinuierliche Versuchsdaten) von Tieren, die toxische Wirkungen oder Läsionen aufweisen, sind zusätzlich zum Schweregrad der Läsionen in Übersichtstabellen anzugeben.

50. Historische Kontrolldaten können die Auswertung der Studienergebnisse erleichtern, z. B. wenn die Daten der gleichzeitigen Kontrollen erheblich von neueren Daten von Kontrolltieren aus derselben Versuchseinrichtung abweichen. Wenn historische Kontrolldaten bewertet werden, sollten sie von demselben Labor stammen, sich auf Tiere desselben Alters und Stamms beziehen und höchstens fünf Jahre vor der fraglichen Studie erhoben worden sein.

51. Wenn möglich, sind die numerischen Daten durch eine geeignete allgemein annehmbare statistische Methode auszuwerten. Die statistischen Methoden und die zu analysierenden Daten sind bei der Planung der Studie festzulegen (Nummer 8). Diese Auswahl sollte es ermöglichen, erforderlichenfalls Anpassungen je nach Überlebensrate vorzunehmen.

**Prüfbericht**

52. Der Prüfbericht sollte folgende Informationen enthalten:

*Prüfsubstanz:*

— physikalische Beschaffenheit, Reinheit und physikalisch-chemische Eigenschaften,

— Daten zur Identifikation,

— Herkunft des Stoffs,

— Chargennummer,

— Bescheinigung der chemischen Analyse.

*Vehikel (wenn verwendet):*

— Begründung der Wahl des Vehikel, sofern anders als Wasser.

*Versuchstiere:*

— Art/Stamm und Begründung für die getroffene Wahl,

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere bei Versuchsbeginn,

▼**M4**

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.,

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn.

*Prüfbedingungen:*

— Begründung für Verabreichungsweg und Festlegung der Dosis,

— gegebenenfalls die statistischen Methoden zur Analyse der Daten,

— Angaben zur Formulierung der Prüfsubstanz/Futterzubereitung,

— Analysedaten über die erreichte Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung,

— Verabreichungsweg und Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz,

— bei Inhalationsstudien: „Nose-only"- oder Ganzkörperexposition,

— tatsächliche Dosen (mg/kg Körpergewicht/Tag) und, sofern zutreffend, Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Trinkwasser (mg/kg oder ppm) in die tatsächliche Dosis,

— Angaben zu Futter- und Wasserqualität.

*Ergebnisse (zusammenfassende Übersichtstabellen und Daten für die einzelnen Tiere):*

— Überlebensdaten,

— Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts,

— Futteraufnahme, gegebenenfalls Berechnungen der Futtereffizienz und der Wasseraufnahme, falls erfasst,

— Daten der toxischen Reaktionen nach Geschlecht und Dosis, einschließlich Toxizitätszeichen,

— Art, Inzidenz (und, falls bewertet, Schweregrad) sowie Dauer der klinischen Beobachtungen (sowohl vorübergehend als auch dauerhaft),

— Ergebnisse der ophthalmologischen Untersuchung,

— hämatologische Untersuchungen,

— klinisch-biochemische Untersuchungen,

— Urinuntersuchungen,

— Ergebnisse etwaiger Neurotoxizitäts- oder Immunotoxizitätsuntersuchungen,

— terminales Körpergewicht,

— Organgewichte (und gegebenenfalls Verhältnis Organ-/Körpergewicht),

— Sektionsbefunde,

— ausführliche Beschreibung aller behandlungsbedingten histopathologischen Befunde,

— Angaben zur Resorption, falls vorhanden.

▼M4

*Statistische Auswertung der Ergebnisse, soweit zutreffend*

*Diskussion der Ergebnisse einschließlich*

— Dosis-Wirkungs-Beziehungen,

— Prüfung aller Informationen über die Wirkungsweise,

— Diskussion von Modellierungsansätzen,

— Bestimmung von BMD, NOAEL oder LOAEL,

— historische Kontrolldaten,

— Relevanz für Menschen.

*Schlussfolgerungen*

*LITERATUR:*

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2. Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

3. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

4. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

5. Kapitel B.27 dieses Anhangs, Prüfung auf sub-chronische orale Toxizität — 90-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter Verabreichung an Nicht-Nagetieren

6. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, abrufbar auf der öffentlichen OECD-Website für Prüfrichtlinien: www.oecd.org/env/testguidelines.

7. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

8. Kapitel B.8 dieses Anhangs, Prüfung auf subakute Toxizität nach Inhalation -28-Tage-Test.

9. Kapitel B.29 dieses Anhangs, Prüfung auf sub-chronische Toxizität nach Inhalation — 90-Tage-Test.

10. Kapitel B.9 dieses Anhangs, Toxizität nach 28-tägiger Gabe (dermal)

11. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

12. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

13. Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

14. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al*. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

15. OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

16. OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

17. Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729-837.

18. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

19. Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (ABl. L 276 vom 20.10.2010, S. 33).

20. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

21. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

22. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

23. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

24. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

25. Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rates. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

26. Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

27. Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

28. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rates and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

29. Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

30. Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

31. EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity" (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

32. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

*Anlage 1*

DEFINITION

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

▼B

## B.31. STUDIE ZUR PRÜFUNG AUF PRÄNATALE ENTWICKLUNGSTOXIZITÄT

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der OECD TG 414 (2001).

### 1.1. EINLEITUNG

Die vorliegende Methode zur Prüfung auf Entwicklungstoxizität ist darauf ausgerichtet, allgemeine Informationen über die Auswirkungen einer pränatalen Exposition auf das trächtige Versuchstier und den sich im Uterus entwickelnden Organismus zu liefern; dabei können sowohl Auswirkungen auf das Muttertier als auch Tod, strukturelle Abnormitäten oder Wachstumsstörungen im Fetus untersucht werden. Die Erfassung funktioneller Defizite ist kein integraler Bestandteil dieser Prüfmethode, auch wenn funktionelle Aspekte einen wichtigen Teil der Entwicklung darstellen. Diese können in einer gesonderten Studie untersucht oder als Ergänzung zu der vorliegenden Studie behandelt werden unter Einsatz der Methode zur Prüfung auf Entwicklungsneurotoxizität. Zur Information über die Prüfung auf Funktionsmängel und andere postnatale Auswirkungen ist gegebenenfalls die Methode zur Prüfung der Reproduktion über zwei Generationen sowie die Studie über die Entwicklungsneurotoxizität heranzuziehen.

In Einzelfällen bei Vorliegen spezieller Kenntnisse, z. B. über physikalisch-chemische oder toxikologische Eigenschaften der Prüfsubstanz, können bei dieser Prüfmethode besondere Anpassungen erforderlich sein. Eine solche Anpassung ist dann akzeptabel, wenn überzeugende wissenschaftliche Anhaltspunkte dafür sprechen, dass die Prüfung durch die Anpassung aussagekräftiger wird. Diese wissenschaftlichen Anhaltspunkte sind in einem solchen Fall im Prüfbericht sorgfältig zu dokumentieren.

### 1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

**Entwicklungstoxikologie:** ist die Untersuchung schädigender Wirkungen auf den sich entwickelnden Organismus, die aus einer Einwirkung vor der Empfängnis, während der pränatalen Entwicklung oder postnatal bis zur Geschlechtsreife auftreten können. Entwicklungstoxizität äußert sich in der Hauptsache durch 1) den Tod des Organismus, 2) strukturelle Abnormitäten, 3) Wachstumsstörungen und 4) Funktionsdefizite. Entwicklungstoxikologie wurde früher häufig als Teratologie bezeichnet.

**Schädigende Wirkung;** behandlungsbedingte Veränderung gegenüber dem Normalzustand, bei der die Fähigkeit eines Organismus zu überleben, sich fortzupflanzen oder an die Umwelt anzupassen beeinträchtigt wird. Im weitesten Sinne sind im Begriff Entwicklungstoxikologie auch alle Wirkungen mit eingeschlossen, die die normale Entwicklung des Conceptus vor und auch nach der Geburt stören.

**Wachstumsstörung:** Veränderung von Organ- oder Körpergröße oder -gewicht der Nachkommen.

**Veränderungen (Anomalien)**: strukturelle Veränderungen in der Entwicklung, zu denen sowohl Fehlbildungen als auch Variationen gehören (28).

**Fehlbildung/größere Abnormität**: strukturelle Veränderung, die als für das Tier schädlich angesehen wird (und auch zum Tode führen kann) und im Allgemeinen in seltenen Fällen auftritt.

▼B

**Variation/kleinere Abnormität**: strukturelle Veränderung, bei der man von geringen oder gar keinen schädlichen Auswirkungen auf das Tier ausgeht; dabei kann es sich um eine vorübergehende Erscheinung handeln, und sie kann in der Kontrollpopulation relativ häufig vorkommen.

**Conceptus**: die Summe der Derivate eines befruchteten Eis zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung von der Befruchtung bis zur Geburt, dazu gehören auch die extraembryonalen Membranen sowie der Embryo oder der Fetus.

**Implantation (Einnistung)**: Anhaftung der Blastozyste an der Epithelauskleidung der Gebärmutter; dazu gehört auch die Wanderung der Blastozyste durch das Gebärmutterepithel und deren Einbettung in der Gebärmutterschleimhaut.

**Embryo**: das Frühstadium oder Entwicklungsstadium eines jeden Organismus, speziell das sich entwickelnde Produkt aus der Befruchtung eines Eis nach dem Entstehen der Längsachse und bis alle größeren Strukturen vorhanden sind.

**Embryotoxizität**: schädigend für die normale Struktur, die Entwicklung, das Wachstum und/oder die Lebensfähigkeit eines Embryos.

**Fetus**: der ungeborene Nachkomme in der postembryonalen Phase.

**Fetotoxizität**: schädigend für die normale Struktur, die Entwicklung, das Wachstum und/oder die Lebensfähigkeit eines Fetus.

**Abort**: die vorzeitige Ausstoßung der Empfängnisprodukte aus der Gebärmutter, d. h. des Embryos oder eines nicht lebensfähigen Fetus.

**Resorption**: ein Conceptus, der nach der Einnistung in der Gebärmutter abgestorben ist und resorbiert wird oder bereits resorbiert wurde.

**Frühresorption**: Anzeichen für eine Implantation, ohne dass ein Embryo/Fetus erkennbar ist.

**Spätresorption**: Toter Embryo oder Fetus mit äußeren degenerativen Veränderungen.

**NOAEL**: Abkürzung für *no-observed-adverse-effect level* und entspricht der höchsten Dosis oder Exposition, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

1.3. REFERENZSTOFF

Keiner.

1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Im Normalfall wird die Prüfsubstanz trächtigen Tieren mindestens vom Zeitpunkt der Implantation bis einen Tag vor der geplanten Tötung verabreicht, welche möglichst unmittelbar vor dem normalen Tag der Geburt erfolgen soll, und ohne dabei Gefahr zu laufen, Daten infolge vorzeitiger Geburt zu verlieren. Mit der Prüfmethode sollen nicht nur die Phase der Organogenese (z. B. Tag 5 bis 15 bei Nagern und Tag 6 bis 18 bei Kaninchen), sondern auch Wirkungen während der Zeit vor der Einnistung, soweit angebracht, und über die gesamte Dauer der Gravidität bis zum Tag vor dem Kaiserschnitt untersucht werden. Kurz vor dem Kaiserschnitt werden die Weibchen getötet, der Gebärmutterinhalt untersucht und die Feten im Hinblick auf äußerlich erkennbare Anomalien sowie auf Veränderungen an Weichteilen und Skelett beurteilt.

▼B

1.5. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.5.1. **Auswahl der Versuchstierarten**

Es wird empfohlen, die Prüfung mit den geeignetsten Tierarten durchzuführen und Labortierspezies und -stämme zu verwenden, die üblicherweise bei Untersuchungen zur pränatalen Entwicklungstoxizität zum Einsatz kommen. Die bevorzugte Nagerart ist die Ratte, die bevorzugte Nicht-Nagerart ist das Kaninchen, Wird eine andere Tierart eingesetzt, ist dies zu begründen.

1.5.2. **Haltung und Fütterung**

Die Temperatur im Versuchstierraum soll bei Nagern 22 °C (± 3 °C) und bei Kaninchen 18 °C (± 3 °C) betragen. Obwohl die relative Luftfeuchte wenigstens 30 % betragen sollte und außer bei Reinigung des Raumes 70 % nicht übersteigen sollte, sollte sie vorzugsweise bei 50 bis 60 % liegen. Es ist eine künstliche Beleuchtung vorzusehen, wobei ein Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden eingehalten werden soll. Zur Fütterung kann übliches Laborfutter verwendet werden, und Trinkwasser kann in unbeschränkter Menge gegeben werden.

Die Verpaarung erfolgt in für diese Zwecke geeigneten Käfigen. Auch wenn verpaarte Tiere nach Möglichkeit einzeln untergebracht werden sollten, so ist auch eine Unterbringung in kleinen Gruppen akzeptabel.

1.5.3. **Vorbereitung der Tiere**

Zu verwenden sind gesunde Tiere, die mindestens fünf Tage an die Laborbedingungen gewöhnt und zuvor nicht für andere Experimente verwendet wurden. Art, Stamm, Herkunft, Geschlecht, Gewicht und/oder Alter der Versuchstiere sind anzugeben. Die Tiere aller Testgruppen sollen so weit wie möglich gleiches Gewicht und Alter aufweisen. Jede Dosierung ist an jungen ausgewachsenen Weibchen einzusetzen, die vorher noch nicht geworfen haben. Die Weibchen werden mit Männchen derselben Art und desselben Stamms verpaart, die Verpaarung von Geschwistern ist zu vermeiden. Bei Nagern ist der Tag 0 der Gravidität der Tag, an dem ein Vaginalpfropf und/oder Spermien beobachtet werden; bei Kaninchen ist der Tag 0 im Allgemeinen der Tag des Koitus oder der künstlichen Befruchtung, sofern dieses Verfahren zum Einsatz kommt. Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige durch den Standort bedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Jedes Versuchstier erhält zur sicheren Identifizierung eine eigene Nummer. Nach der Verpaarung werden die Weibchen nach dem Zufallsprinzip auf die Kontroll- und Behandlungstiergruppen verteilt; erfolgt die Verpaarung der Weibchen in Gruppen, werden die Tiere in jeder Gruppe gleichmäßig auf die vorstehend genannten Gruppen verteilt. Entsprechend werden Weibchen, die von demselben Männchen begattet wurden, gleichmäßig auf die Gruppen verteilt.

1.6. VERFAHREN

1.6.1 **Anzahl und Geschlecht der Versuchstiere**

Jede Versuchs- und Kontrollgruppe soll eine ausreichende Zahl von Weibchen enthalten, so dass etwa 20 Weibchen mit Implantationsstellen bei der Sektion zur Verfügung stehen. Gruppen mit weniger als 16 Tieren mit Implantationsstellen sind unter Umständen unzureichend. Durch Mortalität bei den Muttertieren wird die Studie nicht zwangsläufig invalide, sofern diese nicht mehr als etwa 10 % beträgt.

▼B

1.6.2. **Zubereitung der Dosen**

Wird ein Vehikel oder ein anderer Zusatz zur leichterer Verabreichung der Prüfsubstanz verwendet, sind die folgenden Merkmale zu berücksichtigen: Auswirkungen auf die Absorption, die Verteilung, den Stoffwechsel und die Retention oder Exkretion der Prüfsubstanz; Auswirkungen auf die chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, die deren toxische Eigenschaften verändern können; ferner Auswirkungen auf die Futter- oder Wasseraufnahme oder den Ernährungszustand der Versuchstiere. Das Vehikel soll weder entwicklungstoxisch sein noch Auswirkungen auf die Reproduktion haben.

1.6.3 **Dosierung**

Normalerweise soll die Prüfsubstanz täglich ab der Implantation (z. B. Tag 5 nach der Verpaarung) bis zum Tag vor dem geplanten Kaiserschnitt verabreicht werden. Sofern aus eventuell vorliegenden Vorstudien kein hohes Risiko eines Präimplantationsverlusts hervorgeht, kann die Behandlung auf die gesamte Graviditätszeit von der Verpaarung bis zum Tag vor der geplanten Tötung ausgeweitet werden. Bekanntermaßen kann eine unangemessene Behandlung oder Stress während der Gravidität zu pränatalen Verlusten führen. Zum Schutz vor pränatalen Verlusten durch nicht behandlungsbedingte Faktoren sind die unnötige Handhabung von trächtigen Tieren sowie Stress infolge von äußeren Faktoren, wie Lärm, zu vermeiden.

Mindestens drei Dosen und eine gleichzeitige Kontrolle werden verwendet. Gesunde Tiere werden nach dem Zufallsprinzip auf die Kontroll- und Behandlungstiergruppen verteilt. Die Dosierungen sollten so gewählt werden, dass eine Abstufung der toxischen Wirkungen erkennbar ist. Soweit keine Beschränkungen aufgrund der physikalischen/chemischen Beschaffenheit oder der biologischen Eigenschaften der Prüfsubstanz bestehen, wird die höchste Dosis so gewählt, dass zwar eine gewisse Entwicklungstoxizität und/oder maternale Toxizität (klinische Anzeichen oder eine Abnahme des Körpergewichts), jedoch kein Tod oder schweres Leiden herbeigeführt wird. Mindestens eine unter der höchsten Dosis liegende Dosis soll zu minimalen wahrnehmbaren toxischen Auswirkungen führen. Die niedrigste Dosis soll keine Anzeichen von Toxizität bei den Muttertieren oder Entwicklungstoxizität hervorrufen. Eine absteigende Folge von Dosierungen sollte so ausgewählt werden, dass die Dosisabhängigkeit der Reaktion und ein NOAEL belegt werden können. Dosisintervalle mit dem Faktor 2 bis 4 haben sich für die Festlegung absteigender Dosierungen häufig als optimal erwiesen. Gegenüber der Verwendung sehr großer Intervalle (z. B. mehr als Faktor 10) ist die Hinzunahme einer vierten Testgruppe häufig vorzuziehen. Auch wenn die Bestimmung eines NOAEL für die Muttertiere das Ziel ist, können auch Studien, bei denen eine solche Dosis nicht ermittelt wird, akzeptiert werden (1).

Bei der Auswahl der Dosierungen sollen eventuell vorliegende Toxizitätsdaten sowie zusätzliche Informationen über den Stoffwechsel und die Toxikokinetik der Prüfsubstanz oder verwandter Stoffe berücksichtigt werden. Diese Angaben sind außerdem nützlich, die Angemessenheit des Dosierungsplans zu belegen.

Eine gleichzeitige Kontrollgruppe soll verwendet werden. Diese Kontrollgruppe soll eine scheinbehandelte Gruppe oder eine Vehikelkontrollgruppe sein, sofern ein Vehikel zur Verabreichung der Prüfsubstanz verwendet wird. Allen Gruppen ist die gleiche Menge der Prüfsubstanz beziehungsweise des Vehikels zu verabreichen. Tiere der Kontrollgruppe(n) werden genauso behandelt wie die Tiere in der Prüfgruppe. Vehikelkontrollgruppen erhalten das Vehikel in der höchsten verwendeten Menge (wie die Behandlungsgruppe mit der niedrigsten Dosierung).

▼B

1.6.4. **Limit-Test**

Ergibt eine Prüfung mit einer einzigen Dosierung von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei oraler Verabreichung nach den für diese Studie beschriebenen Verfahren keine wahrnehmbare Toxizität bei den trächtigen Tieren oder deren Nachkommen und ist aufgrund von vorliegenden Daten Struktur- und/oder stoffwechselverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen gegebenenfalls verzichtet werden. Ist eine Exposition des Menschen zu erwarten, kann die Notwendigkeit einer höheren oralen Dosis im Limit-Test angezeigt sein. Bei anderen Arten der Verabreichung, wie z. B. Inhalation oder dermale Applikation, kann durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz häufig die maximal erreichbare Expositionsdosis vorbestimmt und somit limitiert sein (beispielsweise soll ein Auftragen auf die Haut keine schwere lokale Toxizität verursachen).

1.6.5. **Verabreichung der Dosen**

Die Prüfsubstanz oder das Lösungsmittel wird im Allgemeinen oral durch Schlundsonde verabreicht. Wird eine andere Form der Verabreichung gewählt, hat der Prüfer seine Wahl zu begründen, unter Umständen sind dann entsprechende Änderungen erforderlich (2) (3) (4). Die Prüfsubstanz ist jeden Tag in etwa zur selben Zeit zu verabreichen.

Die Dosis für das einzelne Tier beruht normalerweise auf dessen zuletzt bestimmtem Körpergewicht. Vorsicht ist jedoch bei der Anpassung der Dosis im letzten Trimester der Gravidität geboten. Zur Vermeidung von übermäßiger Toxizität bei den Muttertieren sind vorliegende Daten bei der Dosisauswahl heranzuziehen. Wird bei den behandelten Muttertieren übermäßige Toxizität festgestellt, sind diese Tiere auf humane Weise zu töten. Weisen verschiedene trächtige Tiere Anzeichen von übermäßiger Toxizität auf, ist die Tötung der ganzen Dosisgruppe zu erwägen. Wird die Prüfsubstanz über eine Sonde verabreicht, so soll dies möglichst in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Magensonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen soll 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten, außer bei wässrigen Lösungen, bei denen 2 ml/100 g Körpergewicht gegeben werden können. Bei Verwendung von Maisöl als Lösungsmittel soll das Volumen 0,4 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Schwankungen beim Applikationsvolumen sind durch entsprechende Dosierung so gering wie möglich zu halten, so dass bei allen Dosen ein gleich bleibendes Volumen gewährleistet ist.

1.6.6. **Beobachtung der Muttertiere**

Klinische Beobachtungen sollen mindestens einmal täglich, vorzugsweise zum gleichen Zeitpunkt und unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist, vorgenommen und protokolliert werden. Der Zustand der Tiere ist dabei festzuhalten, d. h. Mortalität, Siechtum, relevante Verhaltensänderungen und alle Anzeichen akuter Toxizität.

1.6.7. **Körpergewicht und Futteraufnahme**

Die Tiere sind am Tag 0 der Gravidität beziehungsweise nicht später als am Tag 3 der Gravidität, wenn gepaarte Tiere von einem externen Züchter unter Angabe der Paarungszeit geliefert werden, zu wiegen; weiterhin am ersten Tag der Verabreichung, mindestens alle drei Tage während der Verabreichungszeit und am Tag der geplanten Tötung.

▼B

Der Futterverbrauch ist in Abständen von drei Tagen zu protokollieren, an denselben Tagen ist auch das Körpergewicht zu bestimmen.

1.6.8. **Autopsie**

Die Weibchen sind einen Tag vor der erwarteten Geburt zu töten. Weibchen, bei denen Anzeichen für einen Abort oder eine vorzeitige Geburt vor der geplanten Tötung vorliegen, sind zu töten und sorgfältig makroskopisch zu untersuchen.

Zum Zeitpunkt der Tötung oder bei vorzeitigem Tod im Verlauf der Studie ist das Muttertier makroskopisch auf etwaige strukturelle Abnormitäten oder pathologische Veränderungen zu untersuchen. Die Beurteilung der Muttertiere während des Kaiserschnitts und die anschließenden Untersuchungen der Feten sollen möglichst ohne Kenntnis der Behandlungsgruppe erfolgen, um etwaige Einflüsse durch Befangenheit so gering wie möglich zu halten.

1.6.9. **Untersuchung des Uterusinhalts**

Unmittelbar nach der Tötung beziehungsweise so bald wie möglich nach dem Tod ist der Uterus zu entfernen und der Trächtigkeitsstatus des Tiers zu erheben. Weist der Uterus keine Anzeichen von Trächtigkeit auf, ist dieser weiter zu untersuchen (z. B. Färbung mit Ammoniumsulfid bei Nagern oder Salewski-Färbung oder ein geeignetes alternatives Verfahren für Kaninchen), um den nichtträchtigen Zustand zu bestätigen (5).

Der schwangere Uterus einschließlich der Zervix des trächtigen Tiers ist zu wiegen. Bei Tieren, die während der Studie tot aufgefunden werden, ist dieses Gewicht nicht zu bestimmen.

Bei den trächtigen Tieren ist die Anzahl der Gelbkörper zu bestimmen.

Der Uterusinhalt ist auf die Anzahl toter Embryonen oder Feten und lebensfähiger Feten zu untersuchen. Der Grad der Resorption ist zu beschreiben, um den relativen Todeszeitpunkt des Conceptus (siehe 1.2) zu bestimmen.

1.6.10. **Untersuchung der Feten**

Für jeden Fetus sind Geschlecht und Körpergewicht zu bestimmen.

Jeder Fetus ist auf äußere Veränderungen zu untersuchen (6).

Die Feten sind auf Veränderungen an Skelett und Weichteilen (z. B. Abweichungen und Fehlbildungen oder Anomalien) zu untersuchen (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Nach Möglichkeit ist eine Kategorisierung fetaler Veränderungen vorzunehmen, auch wenn dies nicht zwingend erforderlich ist. Erfolgt eine Kategorisierung, sind die Kriterien zur Bestimmung jeder Kategorie eindeutig anzugeben. Besondere Beachtung erfordert der Reproduktionstrakt, der auf Anzeichen für eine veränderte Entwicklung zu untersuchen ist.

Bei Nagern sollte etwa eine Hälfte jedes Wurfs präpariert und auf Veränderungen am Skelett untersucht werden. Der Rest ist zu präparieren und auf Veränderungen an den Weichteilen zu untersuchen, wobei akzeptierte oder geeignete Methoden der Serienschnittherstellung oder sorgfältige makroskopische Schnitttechniken anzuwenden sind.

▼B

Bei anderen Tieren als Nagern, z. B. Kaninchen, sind sämtliche Feten sowohl auf Weichteil- als auch auf Skelettveränderungen zu untersuchen. Die Körper dieser Feten werden sorgfältig seziert und auf Weichteilveränderungen untersucht; das kann auch Verfahren zur weiteren Beurteilung der inneren Herzstruktur umfassen (25). Bei der Hälfte der auf diese Weise untersuchten Feten entfernt man die Köpfe und präpariert sie zur Untersuchung auf Weichteilveränderungen (einschließlich Augen, Hirn, Nasenwege und Zunge) unter Verwendung von Standardschnitttechniken (26) oder eines gleichermaßen empfindlichen Verfahrens. Die Körper dieser Feten und der übrigen intakten Feten werden präpariert und mit denselben Methoden wie für Nager beschrieben auf Skelettveränderungen untersucht.

## 2. DATEN

### 2.1. VERARBEITUNG DER ERGEBNISSE

Für die Muttertiere und deren Nachkommen werden die Daten jeweils einzeln protokolliert und in tabellarischer Form zusammengefasst; dabei werden für jede Prüfgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn der Prüfung, die Anzahl der während der Prüfung tot aufgefundenen Tiere beziehungsweise der aus humanen Gründen getöteten Tiere, der jeweilige Zeitpunkt des Todes beziehungsweise der Tötung, die Anzahl der trächtigen Weibchen, die Anzahl der Tiere mit Anzeichen von Toxizität, eine Beschreibung der beobachteten Anzeichen von Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen eingetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Arten von Beobachtungen an Embryonen/Feten und alle relevanten Daten zu den Würfen angegeben.

Numerische Ergebnisse werden mit Hilfe eines geeigneten statistischen Verfahrens ausgewertet, wobei als Bezugsgröße für die Datenanalyse der Wurf verwendet wird. Anzuwenden ist ein allgemein anerkanntes statistisches Verfahren; die statistischen Verfahren sind im Rahmen der Studienplanung auszuwählen und zu begründen. Auch Daten über Tiere, die nicht bis zur geplanten Tötung überlebt haben, sind zu protokollieren, Soweit relevant, können solche Daten in Gruppenmittelwerten berücksichtigt werden. Die Relevanz der von solchen Tieren stammenden Daten und demzufolge deren Einbeziehung in oder Ausschluss aus (einem) etwaig(en) Gruppenmittelwert(en) sind zu begründen und jeweils im Einzelfall zu beurteilen.

### 2.2. BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Befunde der Studie zur pränatalen Entwicklungstoxizität sind anhand der beobachteten Wirkungen zu beurteilen. Die Bewertung soll die folgenden Informationen beinhalten:

— Ergebnisse von Prüfungen an Muttertieren und Embryonen/Feten, einschließlich Bewertung des bestehenden beziehungsweise nicht bestehenden Zusammenhangs zwischen der Exposition der Tiere gegenüber der Prüfsubstanz und der Häufigkeit und Schwere alter Befunde;

— Kriterien, die zur Kategorisierung von äußerlichen Veränderungen sowie von Weichteil- und Skelettveränderungen bei Feten herangezogen wurden, sofern eine Kategorisierung erfolgte;

▼B

— falls angebracht, historische Kontrolldaten zur besseren Interpretation der Studienergebnisse;

— die Zahlen, die bei der Berechnung alter Prozentangaben oder Indizes verwendet wurden;

— eine angemessene statistische Analyse der Studienbefunde, soweit angebracht, wobei hinreichende Informationen über die Analysemethode anzugeben sind, so dass ein unabhängiger Überprüfer/Statistiker die Analyse nachbewerten und nachvollziehen kann.

Für Prüfungen, bei denen keine toxischen Wirkungen nachgewiesen werden, sind weitere Untersuchungen zur Bestimmung von Absorption und Bioverfügbarkeit der Prüfsubstanz in Erwägung zu ziehen.

2.3. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Eine Studie zur Prüfung auf pränatale Entwicklungstoxizität liefert Informationen über die Auswirkungen einer wiederholten Exposition gegenüber einer Substanz während der Trächtigkeit auf die Muttertiere und auf die intrauterine Entwicklung ihrer Nachkommen. Die Ergebnisse der Studie sind in Verbindung mit Befunden aus Studien zur subchronischen Toxizität, Reproduktionstoxizität und Toxikokinetik sowie anderen Studien zu interpretieren. Da der Schwerpunkt sowohl auf allgemeine Toxizität im Sinne maternaler Toxizität als auch auf die Entwicklungstoxizität gelegt wird, bieten die Ergebnisse der Studie zu einem bestimmten Maß die Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen Auswirkungen auf die Entwicklung, die nur bei Dosierungen ausgelöst werden, die auch für das Muttertier toxisch sind, und solchen ohne allgemeine Toxizität.

3. **BERICHTERSTATTUNG**

3.1. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss die folgenden konkreten Angaben enthalten: Prüfsubstanz:

Physikalische Beschaffenheit und, soweit relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Identifizierung einschließlich CAS-Nummer, sofern bekannt/-festgelegt;

— Reinheit.

— Vehikel (sofern zutreffend):

Begründung der Wahl des Vehikels, sofern nicht Wasser verwendet wurde.

— Versuchstiere:

Art und Stamm;

— Zahl und Alter der Versuchstiere;

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— Einzelgewicht der Tiere zu Beginn der Prüfung.

— Prüfbedingungen:

Begründung der Wahl der Dosisabstufung;

— Einzelheiten der Formulierung der Prüfsubstanz/-Futterzubereitung, erzielte Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;

▼B

— Umrechnung der Prüfsubstanzkonzentration in Futter/Trinkwasser (ppm) auf die tatsächliche Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag), soweit zutreffend;

— Umgebungsbedingungen;

— Einzelheiten zur Futter- und Wasserqualität.

— Ergebnisse:

Dosisbezogene Daten zur toxischen Reaktion der Muttertiere, unter anderem:

Anzahl der Tiere zu Beginn der Prüfung, Anzahl der überlebenden Tiere, Anzahl der trächtigen Tiere sowie Anzahl der Aborte und Anzahl der Frühgeburten;

— Tag des Todes im Verlauf der Studie oder Angabe, ob Tiere bis zum Schluss überlebt haben;

— Daten von Tieren, die nicht bis zur geplanten Tötung überlebten, sind zwar zu protokollieren, nicht jedoch in die gruppenübergreifenden statistischen Vergleiche mit einzubeziehen;

— Tag der Beobachtung jedes anormalen klinischen Anzeichens und dessen weiterer Verlauf;

— Körpergewicht, Veränderung des Körpergewichts und Gewicht des Uterus in trächtigem Zustand, wahlweise einschließlich Veränderung der Körpergewichts korrigiert um das Gewicht des Uterus in trächtigem Zustand;

— Futteraufnahme und, sofern gemessen, Wasseraufnahme;

— Sektionsbefunde einschließlich Uterusgewicht;

— NOAEL-Werte für Auswirkungen auf die Muttertiere und auf die Entwicklung sind anzugeben.

— Dosisbezogene Entwicklungsparameter für Würfe mit Implantationen, einschließlich:

Anzahl Gelbkörper;

— Anzahl Implantationen, Anzahl und prozentualer Anteil von lebenden und toten Feten sowie von Resorptionen;

— Anzahl und prozentualer Anteil von Prä- und Postimplantationsverlusten.

— Dosisbezogene Entwicklungsparameter für Würfe mit lebenden Feten einschließlich:

Anzahl und prozentualer Anteil lebender Nachkommen;

— Verhältnis der Geschlechter;

— fetales Körpergewicht, möglichst jeweils getrennt nach Geschlechtern und für beide Geschlechter

— zusammen;

— äußere Weichteil- und Skelettmissbildungen und sonstige relevante Veränderungen;

— Kriterien für die Kategorisierung, sofern zutreffend;

▼B

— Gesamtanzahl und prozentualer Anteil von Feten und Würfen mit äußerlichen Veränderungen, Weichteil- oder Skelettveränderungen sowie Arten und Häufigkeiten einzelner Anomalien und sonstiger relevanter Veränderungen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity, *Risk Analysis* 16; 399-410.

(2) Kimmel, C.A, and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247, 367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology.* D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses, *Congenital Anomalies* 32; 381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47, 229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127, 291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits as Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung,* 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼M4

## B.32 PRÜFUNGEN AUF KANZEROGENITÄT

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 451 (2009). Die ursprüngliche TG 451 über Prüfungen auf Kanzerogenität wurde 1981 angenommen. Die Entwicklung dieser überarbeiteten Prüfmethode B.32 wurde für notwendig gehalten, um neueren Entwicklungen auf dem Gebiet des Tierschutzes sowie Regulierungsanforderungen Rechnung zu tragen (2) (3) (4) (5) (6). Diese Prüfmethode B.32 wurde parallel zur Überarbeitung von Kapitel B.30 dieses Anhangs „Prüfungen auf chronische Toxizität“ und Kapitel B.33 dieses Anhang „Kombinierte Studien zur Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität“ aktualisiert mit dem Ziel, zusätzliche Informationen von den in der Untersuchung verwendeten Tieren und detailliertere Angaben zur Wahl der Dosis zu gewinnen. Diese Prüfmethode B.32 ist dazu ausgelegt, für die Prüfung eines breiten Spektrums von chemischen Stoffen, einschließlich Pestiziden und Industriechemikalien, verwendet zu werden. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass bestimmte Details und Anforderungen für Pharmazeutika abweichen können (siehe Internationale Harmonisierungskonferenz (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals).

2. Bei den meisten Prüfungen auf Kanzerogenität werden Nagetierarten verwendet; diese Prüfmethode gilt daher hauptsächlich für Prüfungen, die an diesen Arten durchgeführt werden. Wenn solche Prüfungen an Nichtnagern erforderlich sind, gelten die Grundsätze und Verfahren dieser Prüfmethode in Kombination mit denen des Kapitels B.27 dieses Anhangs „Prüfung auf subchronische orale Toxizität — 90-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter Verabreichung an Nicht-Nagetieren“ (6) mit entsprechenden Änderungen. Weitere Hinweise sind dem OECD Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies (7) zu entnehmen.

3. Bei Prüfungen auf Kanzerogenität finden im Wesentlichen die orale, die dermale und die inhalative Verabreichung Anwendung. Die Wahl des Verabreichungswegs hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz und der vorherrschenden Art der Exposition beim Menschen ab. Zusätzliche Informationen zur Wahl des Expositionswegs sind im Guidance Document No. 116 (7) enthalten.

4. Bei dieser Prüfmethode steht die Exposition auf oralem Weg im Vordergrund. Dies ist der bei Prüfungen auf Kanzerogenität am häufigsten verwendete Expositionsweg. Zwar sind Prüfungen auf Kanzerogenität mit Exposition über die Haut oder durch Inhalation möglicherweise auch notwendig, um das Risiko für die menschliche Gesundheit zu beurteilen, und/oder im Rahmen bestimmter Regelungen vorgeschrieben, aber diese beiden Expositionswege sind aus technischer Sicht außerordentlich komplex. Derartige Prüfungen sind von Fall zu Fall zu konzipieren, wobei die hier beschriebene Prüfmethode für die Bewertung und Evaluierung der Kanzerogenität bei oraler Verabreichung allerdings mit Bezug auf Empfehlungen für Behandlungszeiten, klinische und Pathologieparameter usw. als Grundlage für ein Protokoll für Inhalations- und/oder dermale Prüfungen dienen könnte. Es gibt OECD-Leitlinien für die Verabreichung von Prüfsubstanzen durch Inhalation (7) (8) und über die Haut (7). Bei der Konzeption längerfristiger Prüfungen mit Exposition durch Inhalation sind insbesondere Kapitel B.8 dieses Anhangs (9) und Kapitel B.29 dieses Anhangs (10) sowie das OECD Guidance Document über Prüfungen auf akute Toxizität nach Inhalation (8) zu berücksichtigen. Bei Prüfungen mit dermaler Applikation ist Kapitel B.9 dieses Anhangs (11) zu beachten.

▼M4

5. Die Prüfung auf Kanzerogenität liefert Informationen über mögliche gesundheitliche Schädigungen, die durch wiederholte Exposition über einen Zeitraum entstehen können, der sich über die gesamte Lebensdauer der verwendeten Art erstrecken kann. Sie liefert Informationen über die toxischen Wirkungen der Prüfsubstanz, einschließlich der potenziellen Kanzerogenität, und kann Hinweise auf Zielorgane und die Möglichkeit der Akkumulation geben. Außerdem kann sie zur Ableitung eines NOAEL-Werts (Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung) für toxische Wirkungen und, im Fall von nicht genotoxischen Karzinogenen, für Tumorreaktionen beitragen, der zur Festlegung von Sicherheitskriterien für die Humanexposition herangezogen werden kann. Ferner wird die Notwendigkeit sorgfältiger klinischer Beobachtung der Tiere hervorgehoben, damit so viele Informationen wie möglich gewonnen werden können.

6. Zu den Zielen von Prüfungen auf Kanzerogenität nach dieser Prüfmethode gehören

— die Identifizierung der kanzerogenen Eigenschaften einer Prüfsubstanz, die im Vergleich zu gleichzeitigen Kontrollgruppen zu einer erhöhten Inzidenz von Neoplasmen, einem erhöhten Anteil maligner Neoplasmen oder einem schnelleren Auftreten von Neoplasmen führen,

— die Identifizierung des Zielorgans/der Zielorgane der Kanzerogenität,

— die Ermittlung der Zeit bis zum Auftreten von Neoplasmen,

— die Beschreibung der Beziehung zwischen der Dosis und der Tumorreaktion,

— die Bestimmung eines NOAEL-Werts (Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung) oder eines Ausgangspunkts für die Festlegung einer Benchmark-Dosis (BMD),

— die Extrapolation kanzerogener Wirkungen auf Expositionsniveaus von Menschen bei geringer Dosis,

— die Gewinnung von Daten zur Prüfung von Hypothesen über die Wirkungsweise (2) (7) (12) (13) (14) (15).

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

7. Bei der Beurteilung und Bewertung des Kanzerogenitätspotenzials einer Prüfsubstanz sollte das Prüflabor vor Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz berücksichtigen, damit die Studienauslegung auf eine effizientere Prüfung des Kanzerogenitätspotenzials ausgerichtet und die Verwendung von Versuchstieren minimiert werden kann. Es ist wichtig, die Wirkungsweise eines vermutlichen Karzinogens zu kennen und zu berücksichtigen (2) (7) (12) (13) (14) (15), da die optimale Studienauslegung je nachdem, ob die Prüfsubstanz ein bekanntes oder vermutliches genotoxisches Karzinogen ist, unterschiedlich sein kann. Nähere Hinweise zu Aspekten der Wirkungsweise sind im Guidance Document No. 116 (7) zu finden.

8. Für die Auslegung der Studie könnten u. a. Informationen wie die Identität, die chemische Struktur und die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, Ergebnisse jeglicher In-vitro- oder In-vivo-Toxizitätsprüfungen einschließlich Genotoxizitätsprüfungen, vorgesehene Verwendungen und die Möglichkeit der Exposition des Menschen, (Q)SAR-Daten, Daten über Mutagenität/Genotoxizität, Kanzerogenität und andere toxikologische Daten über strukturverwandte Substanzen, toxikokinetische Daten (Kinetik bei Einzel- und Mehrfachdosierung) sowie Daten aus anderen Studien mit wiederholter Exposition herangezogen werden. Die Kanzerogenität sollte erst

▼M4

beurteilt werden, wenn erste Informationen über die Toxizität aus Toxizitätsprüfungen mit wiederholter Gabe über 28 Tage und/oder 90 Tage vorliegen. Auch Kurzzeitversuche zur Krebsinitiation-/promotion können nützliche Informationen liefern. Im Rahmen der Gesamtbewertung der potenziellen schädlichen Wirkungen einer bestimmten Prüfsubstanz auf die Gesundheit sollte bei der Prüfung auf Kanzerogenität etappenweise vorgegangen werden (16) (17) (18) (19).

9. Vor Beginn der Prüfung ist festzulegen, welche Statistikmethoden angesichts der Versuchsauslegung und der Ziele am besten für die Analyse der Ergebnisse geeignet sind. Dabei ist u. a. zu entscheiden, ob die Statistiken Anpassungen in Bezug auf die Überlebensrate, die Analyse kumulativer Tumorrisiken bezogen auf die Überlebensdauer, die Analyse des Zeitraums bis zum Auftreten eines Tumors und die Analyse bei vorzeitigem Tod der Tiere einer oder mehrerer Gruppen umfassen sollten. Hinweise zu den geeigneten statistischen Analysen und wichtige Literaturverweise zu international anerkannten Statistikmethoden sind im Guidance Document No. 116 (7) sowie im Guidance Document No. 35 on the analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies (20) zu finden.

10. Bei der Durchführung einer Prüfung auf Kanzerogenität sind stets die im OECD Guidance Document No. 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation (21), insbesondere in Absatz 62, genannten Grundsätze und Erwägungen zu befolgen. In diesem Absatz heißt es: *Wenn ein Tier in Studien mit wiederholter Verabreichung progressive klinische Anzeichen für eine fortschreitende Verschlechterung seines Zustands aufweist, ist eine informierte Entscheidung zu treffen, ob das Tier tierschutzgerecht getötet werden sollte oder nicht. Bei dieser Entscheidung sind Faktoren wie der Wert der Informationen, die bei Verbleiben des Tiers in der Studie gewonnen werden können, und der allgemeine Gesundheitszustand des Tiers gegeneinander abzuwägen. Wird beschlossen, das Tier in der Studie zu belassen, ist es entsprechend den Erfordernissen häufiger zu beobachten. Zur Linderung von Schmerzen oder Qualen kann auch die Verabreichung der Prüfsubstanz unterbrochen oder die Dosis verringert werden, sofern dabei der Zweck der Prüfung nicht beeinträchtigt wird.*

11. Ausführliche Informationen und eine Diskussion der Prinzipien der Dosiswahl bei Studien zur Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität sind im Guidance Document No. 116 (7) sowie in zwei Veröffentlichungen des International Life Sciences Institute (22) (23) zu finden. Die grundlegende Strategie der Dosiswahl hängt von den Hauptzielen der Studie ab (Nummer 6). Bei der Auswahl der geeigneten Dosisstufen ist ein Gleichgewicht zwischen Gefahrenidentifizierung einerseits und der Beschreibung von Wirkungen bei geringer Dosierung und ihrer Relevanz andererseits herzustellen. Dieses Gleichgewicht ist bei einer kombinierten Studie zur Prüfung auf chronische Toxizität und auf Kanzerogenität (Kapitel B.33 dieses Anhangs) besonders wichtig (Nummer 12).

12. Es sollte in Betracht gezogen werden, statt einer getrennten Durchführung einer Prüfung auf chronische Toxizität (Kapitel B.30 dieses Anhangs) und einer Prüfung auf Kanzerogenität (diese Prüfmethode B.32) eher eine kombinierte Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität (Kapitel B.33 dieses Anhangs) durchzuführen. Die kombinierte Methode ist zeit- und kosteneffizienter als zwei getrennte Studien, ohne dass dabei die Qualität der Daten der chronischen Komponente oder der Kanzerogenitätskomponente beeinträchtigt würde. Bei Durchführung einer kombinierten Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität (Kapitel B.33 dieses Anhangs) sind die Grundsätze der Dosiswahl (Nummer 11 und Nummern 22-25) jedoch genau zu beachten. Es wird allerdings anerkannt, dass im Rahmen bestimmter Regelungen möglicherweise getrennte Prüfungen vorgeschrieben sind.

▼M4

13. Die im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe werden am Ende dieses Kapitels und im Guidance Document 116 (7) definiert.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

14. Die Prüfsubstanz wird mehreren Gruppen von Versuchstieren für den größeren Teil ihrer Lebenszeit täglich in abgestuften Dosen in der Regel oral verabreicht. Die Verabreichung durch Inhalation oder auf dermalem Weg kann ebenfalls angebracht sein. Die Tiere werden sorgfältig auf Toxizitätszeichen und das Auftreten neoplastischer Veränderungen beobachtet. Tiere, die im Verlauf der Prüfung sterben, und vorzeitig getötete Tiere werden seziert; die nach Abschluss der Prüfung überlebenden Tiere werden getötet und ebenfalls seziert.

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Auswahl von Versuchstierarten**

15. Diese Prüfmethode betrifft hauptsächlich die Bewertung und Evaluierung der Kanzerogenität bei Nagetieren (Nummer 2). Die Verwendung anderer Arten als Nagetiere kann in Betracht gezogen werden, wenn die vorliegenden Daten darauf hindeuten, dass sie für die Vorhersage gesundheitlicher Wirkungen beim Menschen von größerer Relevanz sind. Die Wahl der Tierart ist zu begründen. Die bevorzugte Nagetierart ist die Ratte, doch können auch andere Nagetierarten, z. B. die Maus, verwendet werden. Obwohl die Verwendung der Maus in Prüfungen auf Kanzerogenität nur von begrenztem Nutzen sein mag (24) (25) (26), schreiben einige geltende Regulierungsprogramme nach wie vor Kanzerogenitätsprüfungen an der Maus vor, sofern nicht gezeigt werden kann, dass eine solche Studie wissenschaftlich nicht erforderlich ist. Ratten und Mäuse sind wegen ihrer relativ kurzen Lebenszeit, der weit verbreiteten Verwendung in pharmakologischen und toxikologischen Studien, ihrer Anfälligkeit für die Entstehung von Tumoren und der Verfügbarkeit ausreichend beschriebener Stämme die bevorzugten Versuchsmodelle. Daher liegen über ihre Physiologie und Pathologie umfangreiche Informationen vor. Zusätzliche Informationen zur Wahl der Tierart und des Stamms sind im Guidance Document No. 116 (7) enthalten.

16. Es sind junge, gesunde, adulte Tiere aus üblicherweise eingesetzten Laborstämmen zu verwenden. Für die Prüfung auf Kanzerogenität sollten möglichst Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden wie für die kürzere(n) Toxizitätsvorstudie(n). Wenn jedoch bekannt ist, dass Tiere dieses Stamms und dieser Herkunft die allgemein anerkannten Überlebenskriterien für Langzeitstudien [siehe Guidance Document No. 116 (7)] nicht erfüllen, ist die Verwendung eines Tierstamms mit ausreichender Überlebensrate für die Langzeitstudie in Betracht zu ziehen. Die weiblichen Tiere dürfen weder bereits geworfen haben noch trächtig sein.

**Haltung und Fütterung**

17. Die Tiere können entweder einzeln oder in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen in Käfigen untergebracht werden. Eine Einzelunterbringung ist nur in Betracht zu ziehen, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist (27) (28) (29). Die Käfige sollten so angeordnet werden, dass etwaige Einflüsse der Käfigplatzierung minimiert werden. Die Temperatur im Versuchstierraum sollte 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte mindestens 30 % betragen und — außer beim Reinigen des Raums — 70 % nicht überschreiten. Angestrebt werden sollte eine Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, und eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung ist zu gewährleisten. Das Futter sollte den Nährstoffbedarf der eingesetzten Tierart decken und möglichst wenig Schadstoffe wie z. B. Pestizidrückstände, persistente organische Schadstoffe, Phytoöstrogene, Schwermetalle und Mykotoxine enthalten, die das Ergebnis der Prüfung

▼M4

beeinflussen könnten. Das Futter ist regelmäßig, und zwar zumindest zu Beginn der Prüfung und bei Verwendung einer anderen Charge, auf den Nährstoff- und Schadstoffgehalt hin zu analysieren; die Ergebnisse sind im Abschlussbericht anzugeben. Ergebnisse von Analysen des in der Prüfung verwendeten Trinkwassers sind ebenfalls anzugeben. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung einer Prüfsubstanz und die Deckung des Nährstoffbedarfs der Tiere sichergestellt werden muss, wenn die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht wird.

**Vorbereitung der Tiere**

18. Es sind gesunde Tiere zu verwenden, die mindestens sieben Tage an die Laborbedingungen gewöhnt und zuvor nicht für andere Experimente verwendet wurden. Bei Nagetieren sollte die Verabreichung so bald wie möglich nach dem Absetzen und der Eingewöhnung beginnen, vorzugsweise bevor die Tiere 8 Wochen alt sind. Art, Stamm, Herkunft, Geschlecht, Gewicht und Alter der Versuchstiere sind anzugeben. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede bei den Tieren beider Geschlechter möglichst gering sein und ± 20 % des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts aller Tiere in der Studie nicht überschreiten. Die Tiere werden nach dem Zufallsprinzip in Kontroll- und Behandlungsgruppen eingeteilt. Nach der Randomisierung sollte sich das Durchschnittsgewicht der Tiere desselben Geschlechts von Gruppe zu Gruppe nicht signifikant unterscheiden. Gibt es statistisch signifikante Unterschiede, sollte die Randomisierung möglichst wiederholt werden. Jedes Versuchstier erhält zur sicheren Identifizierung eine eigene Nummer und wird durch Tätowierung, Mikrochipimplantat oder auf eine andere geeignete Weise mit dieser Nummer gekennzeichnet.

VERFAHREN

**Zahl und Geschlecht der Versuchstiere**

19. Es sind Tiere beider Geschlechter zu verwenden. Es sollten so viele Tiere verwendet werden, dass eine gründliche biologische und statistische Auswertung möglich ist. Jede Dosisgruppe und jede gleichzeitige Kontrollgruppe sollte daher mindestens 50 Tiere je Geschlecht umfassen. Je nach Ziel der Studie kann die statistische Aussagekraft von Schlüsselwerten durch ungleiche Verteilung der Tiere auf die verschiedenen Dosisgruppen erhöht werden, wobei z. B. zur Einschätzung des karzinogenen Potenzials bei niedrigen Dosen mehr als 50 Tiere in die Gruppen mit niedriger Dosis eingeteilt werden. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass eine mäßige Erhöhung der Gruppengröße nur zu einer relativ geringen Erhöhung der statistischen Aussagekraft der Studie führt. Weitere Informationen zur statistischen Auslegung der Studie und zur Wahl der Dosisstufen zwecks Maximierung der statistischen Aussagekraft sind im Guidance Document No. 116 (7) enthalten.

**Tötungen im Verlauf der Studie und Satelliten-(Sentinel-)Gruppen**

20. Es kann vorgesehen werden, dass Tiere im Verlauf der Studie, z. B. nach zwölf Monaten, getötet werden, um Erkenntnisse über den Fortgang neoplastischer Veränderungen und mechanistische Informationen zu gewinnen, falls dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Wenn diese Informationen bereits aus vorherigen Toxizitätsstudien mit wiederholter Gabe der Prüfsubstanz vorliegen, sind zwischenzeitliche Tötungen möglicherweise wissenschaftlich nicht gerechtfertigt. Wenn vorgesehen ist, dass Tiere im Verlauf der Studie getötet werden, beträgt die Zahl der für derartige Tötungen vorgesehenen Tiere in jeder Dosisgruppe normalerweise je zehn Tiere beider Geschlechter, und die Gesamtzahl der Tiere in der Studie sollte um die Zahl der Tiere erhöht werden, die vor Beendigung der Studie getötet werden sollen. Der Krankheitsstatus während der Studie kann erforderlichenfalls mit einer zusätzlichen Gruppe von Sentineltieren (normalerweise je fünf Tiere beider Geschlechter) überwacht werden (30). Das Guidance Document No. 116 (7) enthält nähere Hinweise.

▼M4

**Dosisgruppen und Dosierung**

21. Das Guidance Document No. 116 (7) enthält Hinweise zu allen Aspekten der Dosiswahl und zu den Abständen der Dosisstufen. Mindestens drei Dosisstufen und eine gleichzeitige Kontrolle sollten verwendet werden. Die Dosisstufen werden im Allgemeinen auf der Grundlage der Ergebnisse von Studien mit kurzzeitiger wiederholter Verabreichung oder Dosisfindungsstudien festgelegt und sollten alle vorliegenden toxikologischen und toxikokinetischen Daten für die Prüfsubstanz oder verwandte Stoffe berücksichtigen.

22. Soweit keine Beschränkungen aufgrund der physikalisch-chemischen Beschaffenheit oder der biologischen Wirkungen der Prüfsubstanz bestehen, ist die höchste Dosisstufe so zu wählen, dass zwar die Hauptzielorgane und die toxischen Wirkungen identifiziert werden können, aber Leiden, schwere Toxizität, Morbidität oder Tod der Tiere vermieden werden. Unter Berücksichtigung der unter Nummer 23 beschriebenen Faktoren ist die höchste Dosisstufe normalerweise so zu wählen, dass Anzeichen von Toxizität hervorgerufen werden, die sich z. B. in einer verzögerten Körpergewichtsentwicklung äußern (etwa 10 %). Je nach den Zielen der Studie (siehe Nummer 6) kann jedoch eine Höchstdosis festgelegt werden, die unter der zu Toxizitätszeichen führenden Dosis liegt, z. B. wenn eine Dosis eine besorgniserregende Wirkung auslöst, die sich aber nur geringfügig auf Lebensdauer oder Körpergewicht auswirkt.

23. Die Dosisstufen und die Abstände der Dosisstufen können so gewählt werden, dass auf der niedrigsten Dosisstufe eine Dosis-Wirkungs-Beziehung und, je nach Wirkungsweise der Prüfsubstanz, ein NOAEL-Wert oder andere angestrebte Studienergebnisse, z. B. ein BMD (siehe Nummer 25), festgestellt werden können. Zu den Faktoren, die bei der Festlegung niedrigerer Dosen zu berücksichtigen sind, gehören die voraussichtliche Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve, die Dosen, bei denen wichtige Änderungen des Metabolismus oder der toxischen Wirkungsweise eintreten können, und das Niveau, bei dem eine Schwelle oder ein Ausgangspunkt für eine Extrapolation niedriger Dosen erwartet wird.

24. Welche Dosisstufenabstände gewählt werden, hängt von den Merkmalen der Prüfsubstanz ab und kann in dieser Prüfmethode nicht vorgeschrieben werden. Abstände mit einem Faktor von 2 bis 4 erweisen sich jedoch oft als gut geeignet für die Festsetzung abnehmender Dosisstufen. Außerdem ist es oft besser, statt der Verwendung sehr großer Intervalle (z. B. mit einem Faktor zwischen 6 und 10) zwischen den Dosierungen eine vierte Prüfgruppe einzurichten. Die Verwendung von Faktoren über 10 sollte im Allgemeinen vermieden bzw. gegebenenfalls begründet werden.

25. Entsprechend dem Guidance Document No. 116 (7) sind bei der Dosisfestlegung u. a. folgende Faktoren zu berücksichtigen:

— bekannte oder vermutete Nichtlinearitäten oder Wendepunkte der Dosis-Wirkungs-Kurve;

— Toxikokinetik und Dosisbereiche, bei denen die metabolische Induktion, die Sättigung oder die Nichtlinearität zwischen externen und internen Dosen auftritt oder nicht auftritt;

— Vorläuferläsionen, Wirkungsmarker oder Indikatoren für den Ablauf zugrunde liegender biologischer Schlüsselprozesse;

— wichtige (oder vermutete) Aspekte der Wirkungsweise, z. B. Dosen, ab denen Zytotoxizität auftritt, Hormonspiegel beeinflusst werden, homöostatische Mechanismen gestört werden usw.;

▼M4

— Bereiche der Dosis-Wirkungs-Kurve, bei denen eine besonders genaue Schätzung erforderlich ist, z. B. im Bereich der vorgesehenen BMD oder einer vermuteten Schwelle;

— Berücksichtigung voraussichtlicher Expositionsniveaus von Menschen.

26. Die Kontrollgruppe ist eine unbehandelte Gruppe oder eine Vehikelkontrollgruppe, sofern ein Vehikel zur Verabreichung der Prüfsubstanz verwendet wird. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfsubstanz sollten die Tiere der Kontrollgruppe genauso behandelt werden wie die Tiere in den Prüfgruppen. Wird ein Vehikel verwendet, erhält die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten bei den Dosisgruppen verwendeten Volumen. Wird eine Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht und führt dies aus geschmacklichen Gründen zu einer verminderten Futteraufnahme, kann eine paarweise gefütterte Kontrollgruppe nützlich und eine bessere Kontrolle sein.

**Zubereitung der Dosen und Verabreichung der Prüfsubstanz**

27. Die Prüfsubstanz wird in der Regel oral, d. h. mit der Nahrung oder dem Trinkwasser, oder über eine Schlundsonde verabreicht. Zusätzliche Informationen zu Verabreichungswegen und -methoden sind im Guidance Document No. 116 (7) enthalten. Verabreichungsweg und -methode richten sich nach dem Zweck der Studie, den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, ihrer Bioverfügbarkeit und der vorherrschenden Art der Exposition beim Menschen. Der gewählte Verabreichungsweg und die Methode sollten begründet werden. Aus Tierschutzgründen sollte die Schlundsonde nur für Agenzien gewählt werden, bei denen dieser Weg und diese Methode der Verabreichung die potenzielle Humanexposition annähernd repräsentieren (z. B. Arzneimittel). Nahrungs- oder Umweltchemikalien einschließlich Pestizide werden normalerweise mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreicht. Für bestimmte Szenarios, z. B. berufliche Exposition, können andere Applikationswege besser geeignet sein.

28. Bei Bedarf wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Zu berücksichtigen sind gegebenenfalls folgende Merkmale des Vehikels und anderer Additive: Auswirkungen auf die Resorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Retention der Prüfsubstanz; Auswirkungen auf die chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, die deren toxische Eigenschaften verändern können, und ferner Auswirkungen auf die Futter- oder Wasseraufnahme oder den Ernährungszustand der Versuchstiere. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspenion, sodann eine Lösung/Emulsion in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in anderen Vehikeln in Betracht zu ziehen. Bei anderen Vehikeln als Wasser müssen deren toxische Merkmale bekannt sein. Es sollten Informationen über die Stabilität der Prüfsubstanz und die Homogenität der Lösungen oder Futterrationen, die (je nach Fall) die Dosierung enthalten, unter den Verabreichungsbedingungen (z. B. mit dem Futter) vorliegen.

29. Für mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichte Stoffe ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfsubstanz die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Um eine unausgewogene Ernährung zu vermeiden, sollte die Konzentration der Prüfsubstanz in Langzeittoxizitätsstudien mit Verabreichung über die Nahrung normalerweise eine Obergrenze von 5 % der Gesamtnahrung nicht übersteigen. Wenn die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht wird, kann entweder eine konstante Futterkonzentration (mg/kg Futter oder ppm) oder eine konstante Dosierung in Relation zum Körpergewicht des Tiers (mg/kg Körpergewicht), berechnet auf Wochenbasis, verwendet werden. Die jeweils gewählte Verfahrensweise ist anzugeben.

▼M4

30. Bei oraler Verabreichung erhalten die Tiere die Prüfsubstanz täglich (sieben Tage in der Woche), im Fall von Nagetieren in der Regel für einen Zeitraum von 24 Monaten (siehe auch Nummer 32). Jede Abweichung von diesem Dosierungsplan, z. B. fünf Tage pro Woche, ist zu begründen. Bei dermaler Applikation werden die Tiere, wie in Kapitel B.9 dieses Anhangs (11) beschrieben, für einen Zeitraum von 24 Monaten an sieben Tagen in der Woche mindestens 6 Stunden pro Tag mit der Prüfsubstanz behandelt. Die Inhalationsexposition wird an sieben Tagen in der Woche für 6 Stunden pro Tag durchgeführt, aber auch fünf Tage in der Woche sind möglich, wenn dies gerechtfertigt ist. Die Expositionsdauer beträgt normalerweise 24 Monate. Wenn für eine „Nose-only"-Exposition andere Nagetierarten als Ratten verwendet werden, kann die maximale Expositionsdauer angepasst werden, um artenspezifisches Leiden zu minimieren. Eine Expositionsdauer von weniger als 6 Stunden pro Tag ist zu begründen. Siehe auch Kapitel B.8 dieses Anhangs (9).

31. Wird die Prüfsubstanz über eine Sonde verabreicht, so sollte dies unter Verwendung einer Schlundsonde oder einer geeigneten Intubationskanüle jeweils zur gleichen Tageszeit erfolgen. Normalerweise wird einmal täglich eine Einzeldosis verabreicht. Wenn es sich bei der Prüfsubstanz z. B. um einen lokal reizenden Stoff handelt, kann die Tagesdosis auf zwei Teilmengen aufgeteilt werden. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte so gering wie möglich sein und bei Nagetieren normalerweise 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten (31). Die Variabilität der Prüfvolumina sollte durch Anpassung der Konzentration auf ein konstantes Volumen bei allen Dosen möglichst gering gehalten werden. Davon ausgenommen sind potenziell ätzende oder reizende Stoffe, die zur Vermeidung schwerwiegender lokaler Wirkungen verdünnt werden müssen. Die Prüfung in Konzentrationen, die wahrscheinlich eine verätzende oder reizende Wirkung für den Magen-Darm-Trakt haben, ist zu vermeiden.

**Versuchsdauer**

32. Die Studie dauert bei Nagetieren in der Regel 24 Monate, was dem größten Teil der normalen Lebenszeit der verwendeten Tiere entspricht. Eine kürzere oder längere Studiendauer ist je nach Lebenszeit der in der Studie verwendeten Tierart möglich, sollte aber begründet werden. Bei bestimmten Stämmen von Mäusen, z. B. die Stämme AKR/J, C3H/J oder C57BL/6J, ist eine Dauer von 18 Monaten möglicherweise besser geeignet. Im Folgenden werden Hinweise zu Dauer und Beendigung der Studie und dem Überleben der Tiere gegeben. Weitere Hinweise, u. a. zu der Frage, wieweit ein aus der Überlebensrate der Tiere resultierendes negatives Ergebnis einer Kanzerogenitätsstudie akzeptiert werden kann, sind im OECD Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies (7) zu finden.

— Wenn die Anzahl der überlebenden Tiere in den Gruppen mit niedrigerer Dosierung oder in der Kontrollgruppe unter 25 % sinkt, ist die Beendigung der Studie in Betracht zu ziehen.

— Ist lediglich in der Hochdosisgruppe ein vorzeitiger Tod aufgrund von Toxizität festzustellen, muss dies nicht zwangsläufig zur Beendigung der Studie führen.

— Die Überlebensrate sollte nach Geschlechtern getrennt ausgewertet werden.

— Die Studie sollte nicht über den Punkt hinaus fortgesetzt werden, an dem die Daten aus der Studie nicht mehr ausreichen, um eine statistisch valide Bewertung vorzunehmen.

▼M4

BEOBACHTUNGEN

33. Alle Tiere sind in der Regel jeden Tag morgens und abends, auch am Wochenende und an Feiertagen, auf Anzeichen von Morbidität und Mortalität hin zu untersuchen. Darüber hinaus sind die Tiere einmal am Tag auf spezielle Anzeichen von toxikologischer Bedeutung zu untersuchen, wobei der Zeitpunkt zu berücksichtigen ist, zu dem nach Verabreichung per Schlundsonde mit den maximalen Wirkungen zu rechnen ist. Die Entwicklung von Tumoren ist besonders aufmerksam zu verfolgen; dabei sind der Zeitpunkt der Entstehung, die Lokalisierung, das Ausmaß, das Erscheinungsbild und die Progression jedes deutlich sichtbaren oder fühlbaren Tumors festzuhalten.

*Körpergewicht, Futter-/Wasseraufnahme und Futtereffizienz*

34. Alle Tiere sollten zu Beginn der Behandlung, in den ersten 13 Wochen mindestens einmal wöchentlich und danach mindestens monatlich gewogen werden. Futteraufnahme und Futtereffizienz sollten in den ersten 13 Wochen mindestens wöchentlich und danach mindestens monatlich bestimmt werden. Die Trinkwasseraufnahme sollte in den ersten 13 Wochen mindestens wöchentlich und danach mindestens monatlich gemessen werden, wenn die Prüfsubstanz mit dem Trinkwasser verabreicht wird. Bei Studien, in denen das Trinkverhalten der Tiere verändert ist, sollte auch die Trinkwasseraufnahme gemessen werden.

*Hämatologie, klinische Biochemie und sonstige Messungen*

35. Um möglichst viele Informationen aus der Studie zu gewinnen, insbesondere in Bezug auf die Wirkungsweise der Prüfsubstanz, können nach Ermessen des Studienleiters Blutproben für hämatologische und klinisch-biochemische Untersuchungen genommen werden. Urinuntersuchungen können ebenfalls angezeigt sein. Weitere Hinweise zum Nutzen dieser Probenahmen im Rahmen einer Kanzerogenitätsprüfung sind im Guidance Document No. 116 (7) zu finden. Falls sie für angezeigt gehalten werden, können die Blutproben für hämatologische und klinisch-chemische Untersuchungen und Urinuntersuchungen im Rahmen einer Tötung im Verlauf der Studie (siehe Nummer 20) oder bei Beendigung der Studie bei mindestens je zehn Tieren beider Geschlechter je Gruppe genommen werden. Die Blutproben müssen unter Anästhesie an einer benannten Stelle, z. B. durch Herzpunktion oder aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen und gegebenenfalls fachgerecht gelagert werden. Es können auch Blutausstriche zur Untersuchung angefertigt werden, insbesondere wenn das Knochenmark das Zielorgan zu sein scheint. Der Nutzen dieser Untersuchung für die Einschätzung des karzinogenen/onkogenen Potenzials ist jedoch fraglich (32).

PATHOLOGIE

*Makroskopische Untersuchung*

36. Alle an der Studie beteiligten Tiere, ausgenommen Sentineltiere (siehe Nummer 20) und andere Satellitentiere, sind einer vollständigen, eingehenden makroskopischen Untersuchung zu unterziehen, die die sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel-, Brust- und Bauchhöhlen und ihres Inhalts umfasst. Sentineltiere und andere Satellitentiere können nach Ermessen des Studienleiters von Fall zu Fall seziert werden. Organgewichte werden bei einer Prüfung auf Kanzerogenität normalerweise nicht erfasst, da der Nutzen dieser Daten durch geriatrische Veränderungen und in späteren Stadien durch die Entstehung von Tumoren beeinträchtigt wird. Sie können jedoch für die Durchführung einer Weight-of-Evidence-Bewertung und insbesondere für Fragen der Wirkungsweise von Bedeutung sein. Wenn sie Teil einer Satellitenstudie sind, sollten sie nicht später als ein Jahr nach Studienbeginn erfasst werden.

▼M4

37. Die folgenden Gewebe sind in dem für die betreffende Gewebeart und die vorgesehene anschließende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmittel aufzubewahren (33) (Gewebe in eckigen Klammern sind fakultativ):

| | | | |
|---|---|---|---|
| alle makroskopischen Veränderungen | Herz | Pankreas | Magen (Vormagen, Drüsenmagen) |
| Nebennieren | Ileum | Nebenschilddrüse | [Zähne] |
| Aorta | Jejunum | periphere Nerven | Hoden |
| Gehirn (mit Schnitten von Cerebrum, Cerebellum und Medulla/Pons) | Nieren | Hypophyse | Thymus |
| Caecum | Tränendrüse (exorbital) | Prostata | Schilddrüse |
| Zervix | Leber | Rectum | [Zunge] |
| Koagulationsdrüse | Lunge | Speicheldrüse | Trachea |
| Kolon | Lymphknoten (sowohl oberflächliche als auch tiefe) | Samenbläschen | Harnblase |
| Duodenum | Brustdrüse (obligatorisch für Weibchen und, falls bei der Sektion erkennbar, für Männchen) | Skelettmuskel | Uterus (mit Zervix) |
| Nebenhoden | [obere Atemwege, einschließlich Nase, Nasenmuscheln und Nasennebenhöhlen] | Haut | [Harnleiter] |
| Auge (mit Netzhaut) | Speiseröhre | Rückenmark (auf 3 Ebenen: zervical, mittlerer Thoraxbereich und lumbar) | [Harnröhre] |
| [Femur mit Gelenk] | [Riechkolben] | Milz | Vagina |
| Gallenblase (bei anderen Arten als Ratten) | Ovarien | [Brustbein] | Knochenmarkschnitt und/oder ein frisches Knochenmark-Aspirat |
| Hardersche Drüse | | | |

Bei paarigen Organen, z. B. Nieren, Nebennieren, sind beide Organe aufzubewahren. Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebeuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz als mögliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden. In Studien mit dermaler Applikation sind die in der Liste für orale Verabreichung aufgeführten Organe aufzubewahren; es sind Proben der Haut an der Applikationsstelle zu nehmen und aufzubewahren. Bei Inhalationsstudien sollte sich die Liste der aufzubewahrenden und zu untersuchenden Gewebe des Atemtrakts an den Empfehlungen der Kapitel B.8 und B.29 dieses Anhangs orientieren. Was andere Organe/Gewebe betrifft, so sollten (zusätzlich zu den speziell konservierten Geweben aus dem Atemtrakt) die in der Liste für die orale Verabreichung genannten Organe untersucht werden.

▼M4

*Histopathologie*

38. Es gibt Leitlinien für bewährte Praktiken bei der Durchführung toxikologischer Pathologiestudien (33). Zu untersuchen sind mindestens folgende Gewebe:

— alle Gewebe der Tiere aus der Hochdosisgruppe und der Kontrollgruppe,

— alle Gewebe von während der Studie gestorbenen oder getöteten Tieren,

— alle Gewebe mit makroskopischen Abnormitäten einschließlich Tumoren,

— wenn behandlungsbedingte histopathologische Veränderungen in der Hochdosisgruppe festgestellt werden, sind diese Gewebe von allen Tieren in allen anderen Dosisgruppen zu untersuchen,

— bei paarigen Organen, z. B. Nieren, Nebennieren, sind beide Organe zu untersuchen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Daten**

39. Für alle bestimmten Parameter sollen Daten zu den einzelnen Tieren angegeben werden. Darüber hinaus sollten alle Daten in Form einer Tabelle zusammengefasst werden, aus der für jede Prüfgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Zahl der Tiere bei Beginn der Prüfung und die Zahl der während der Prüfung tot aufgefundenen oder aus Tierschutzgründen getöteten Tiere, ferner der Zeitpunkt des Todes oder der Tötung, die Zahl der Tiere, die Toxizitätszeichen aufweisen, eine Beschreibung der beobachteten Toxizitätszeichen, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen erstmalig aufgetreten sind, ihrer Dauer und ihres Schweregrads, die Zahl der Tiere mit Läsionen, die Art der Läsionen und der Prozentsatz der von jeder Läsion betroffenen Tiere. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (für kontinuierliche Versuchsdaten) von Tieren, die toxische Wirkungen oder Läsionen aufweisen, sind zusätzlich zum Schweregrad der Läsionen in Übersichtstabellen anzugeben.

40. Historische Kontrolldaten können die Auswertung der Studienergebnisse erleichtern, z. B. wenn die Daten der gleichzeitigen Kontrollen erheblich von neueren Daten von Kontrolltieren aus derselben Versuchseinrichtung abweichen. Wenn historische Kontrolldaten bewertet werden, sollten sie von demselben Labor stammen, sich auf Tiere desselben Alters und Stamms beziehen und höchstens fünf Jahre vor der fraglichen Studie erhoben worden sein.

41. Wenn möglich, sind die numerischen Daten durch eine geeignete allgemein annehmbare statistische Methode auszuwerten. Die statistischen Methoden und die zu analysierenden Daten sind bei der Planung der Studie festzulegen (Nummer 9). Diese Auswahl sollte es ermöglichen, erforderlichenfalls Anpassungen je nach Überlebensrate vorzunehmen.

**Prüfbericht**

42. Der Prüfbericht sollte folgende Informationen enthalten:

*Prüfsubstanz:*

— physikalische Beschaffenheit, Reinheit und physikalisch-chemische Eigenschaften,

— Daten zur Identifikation,

▼**M4**

— Herkunft des Stoffs,

— Chargennummer,

— Bescheinigung der chemischen Analyse.

*Vehikel (wenn verwendet):*

— Begründung der Wahl des Vehikel, sofern anders als Wasser.

*Versuchstiere:*

— Art/Stamm und Begründung für die getroffene Wahl,

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere bei Versuchsbeginn,

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.,

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn.

*Prüfbedingungen:*

— Begründung für Verabreichungsweg und Festlegung der Dosis,

— gegebenenfalls die statistischen Methoden zur Analyse der Daten,

— Angaben zur Formulierung der Prüfsubstanz/Futterzubereitung,

— Analysedaten über die erreichte Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung,

— Verabreichungsweg und Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz,

— bei Inhalationsstudien: „Nose-only"- oder Ganzkörperexposition,

— tatsächliche Dosen (mg/kg Körpergewicht/Tag) und, sofern zutreffend, Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Trinkwasser (mg/kg oder ppm) in die tatsächliche Dosis,

— Angaben zur Futter- und Wasserqualität.

*Ergebnisse (zusammenfassende Übersichtstabellen und Daten für die einzelnen Tiere):*

*Allgemeines*

— Überlebensdaten,

— Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts,

— Futteraufnahme, gegebenenfalls Berechnungen der Futtereffizienz und der Wasseraufnahme, falls erfasst,

— toxikokinetische Daten, falls vorhanden,

— Ophthalmoskopie (falls zutreffend),

— Hämatologie (falls zutreffend),

— klinische Chemie (falls zutreffend).

▼M4

*Klinische Befunde*

— Toxizitätszeichen,

— Inzidenz (und, falls bewertet, Schweregrad) jeder Abnormität,

— Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (sowohl vorübergehend als auch dauerhaft).

*Nekropsiedaten*

— terminales Körpergewicht,

— Organgewichte (und gegebenenfalls Verhältnis Organ-/Körpergewicht),

— Sektionsbefunde; Inzidenz und Schweregrad von Abnormitäten.

*Histopathologie*

— nicht neoplastische histopathologische Befunde,

— neoplastische histopathologische Befunde,

— Korrelation zwischen makroskopischen und mikroskopischen Befunden,

— ausführliche Beschreibung aller behandlungsbedingten histopathologischen Befunde mit Einstufung des Schweregrads,

— Bericht über eventuelle Peer-Reviews von Objektträgern.

*Statistische Auswertung der Ergebnisse, soweit zutreffend*

*Diskussion der Ergebnisse einschließlich*

— Diskussion von Modellierungsansätzen,

— Dosis-Wirkungs-Beziehungen,

— historische Kontrolldaten,

— Prüfung aller Informationen über die Wirkungsweise,

— Bestimmung von BMD, NOAEL oder LOAEL,

— Relevanz für Menschen.

*Schlussfolgerungen*

*LITERATUR:*

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3. Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

4. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

5. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4


6. Kapitel B.27 dieses Anhangs, Prüfung auf sub-chronische orale Toxizität — 90-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter Verabreichung an Nicht-Nagetieren

7. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9. Kapitel B.8 dieses Anhangs, Prüfung auf subakute Toxizität nach Inhalation — 28-Tage-Test.

10. Kapitel B.29 dieses Anhangs, Prüfung auf sub-chronische Toxizität nach Inhalation — 90-Tage-Test.

11. Kapitel B.9 dieses Anhangs, Toxizität nach 28-tägiger Gabe (dermal).

12. Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

13. Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

14. Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

15. Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

16. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

17. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

18. Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

19. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

20. OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21. OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

22. Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729-837.

23. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24. Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25. Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

26. Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

27. Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (ABl. L 276 vom 20.10.2010, S. 33).

28. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

30. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

32. Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

33. Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

*Anlage 1*

DEFINITION

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

▼M4

## B.33 KOMBINIERTE STUDIEN ZUR PRÜFUNG AUF CHRONISCHE TOXIZITÄT UND KANZEROGENITÄT

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 453 (2009). Die ursprüngliche TG 453 wurde 1981 angenommen. Die Entwicklung dieser aktualisierten Prüfmethode B.33 wurde für notwendig gehalten, um neueren Entwicklungen auf dem Gebiet des Tierschutzes sowie Regulierungsanforderungen Rechnung zu tragen (1) (2) (3) (4) (5). Diese Prüfmethode B.33 wurde parallel zur Überarbeitung von Kapitel B.32 dieses Anhang „Prüfungen auf Kanzerogenität“ und Kapitel B.30 dieses Anhangs „Prüfungen auf chronische Toxizität“ aktualisiert mit dem Ziel, zusätzliche Informationen von den in der Untersuchung verwendeten Tieren und detailliertere Angaben zur Wahl der Dosis zu gewinnen. Diese Prüfmethode ist dazu ausgelegt, für die Prüfung eines breiten Spektrums von chemischen Stoffen, einschließlich Pestiziden und Industriechemikalien, verwendet zu werden. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass bestimmte Details und Anforderungen für Pharmazeutika abweichen können [siehe Internationale Harmonisierungskonferenz (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals].

2. Bei den meisten Prüfungen auf chronische Toxizität und Kanzerogenität werden Nagetierarten verwendet; diese Prüfmethode gilt daher hauptsächlich für Prüfungen, die an diesen Arten durchgeführt werden. Wenn solche Prüfungen an Nichtnagern erforderlich sind, können die beschriebenen Grundsätze und Verfahren mit entsprechenden Änderungen in Kombination mit denen des Kapitels B.27 dieses Anhangs „Prüfung auf subchronische orale Toxizität — 90-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter Verabreichung an Nicht-Nagetieren“ (6), wie im OECD Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies (7) beschrieben, ebenfalls angewendet werden.

3. Bei Prüfungen auf chronische Toxizität/Kanzerogenität finden im Wesentlichen die orale, die dermale und die inhalative Verabreichung Anwendung. Die Wahl des Verabreichungswegs hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz und der vorherrschenden Art der Exposition beim Menschen ab. Zusätzliche Informationen zur Wahl des Expositionswegs sind im Guidance Document No. 116 (7) enthalten.

4. Bei dieser Prüfmethode steht die Exposition auf oralem Weg im Vordergrund. Dies ist der bei Prüfungen auf chronische Toxizität und Kanzerogenität am häufigsten verwendete Expositionsweg. Zwar sind Langzeitprüfungen mit Exposition über die Haut oder durch Inhalation möglicherweise auch notwendig, um das Risiko für die menschliche Gesundheit zu beurteilen, und/oder im Rahmen bestimmter Regelungen vorgeschrieben, aber diese beiden Expositionswege sind aus technischer Sicht außerordentlich komplex. Derartige Prüfungen sind von Fall zu Fall zu konzipieren, wobei die hier beschriebene Prüfmethode für die Bewertung und Evaluierung von Kanzerogenität und chronischer Toxizität bei oraler Verabreichung allerdings mit Bezug auf Empfehlungen für Behandlungszeiten, klinische und Pathologieparameter usw. als Grundlage für ein Protokoll für Inhalations- und/oder dermale Prüfungen dienen könnte. Es gibt OECD-Leitlinien für die Verabreichung von Prüfsubstanzen durch Inhalation (7) (8) und über die Haut (7). Bei der Konzeption längerfristiger Prüfungen mit Exposition durch Inhalation sind insbesondere Kapitel B.8 dieses Anhangs (9) und Kapitel B.29 dieses Anhangs (10) sowie das OECD Guidance (8) zu berücksichtigen. Bei Prüfungen mit dermaler Applikation ist Kapitel B.9 dieses Anhangs (11) zu beachten.

▼M4

5. Die kombinierte Studie zur Prüfung auf chronische Toxizität/Kanzerogenität liefert Informationen über mögliche gesundheitliche Schädigungen, die durch wiederholte Exposition über einen Zeitraum entstehen können, der sich über die gesamte Lebensdauer der verwendeten Art erstrecken kann. Sie liefert Informationen über die toxischen Wirkungen der Prüfsubstanz, einschließlich der potenziellen Kanzerogenität, und gibt Hinweise auf Zielorgane und die Möglichkeit der Akkumulation. Außerdem kann sie zur Ableitung eines NOAEL-Werts (Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung) für toxische Wirkungen und, im Fall von nicht genotoxischen Karzinogenen, für Tumorreaktionen beitragen, der zur Festlegung von Sicherheitskriterien für die Humanexposition herangezogen werden kann. Ferner wird die Notwendigkeit sorgfältiger klinischer Beobachtung der Tiere hervorgehoben, damit so viele Informationen wie möglich gewonnen werden können.

6. Zu den Zielen von Prüfungen auf chronische Toxizität/Kanzerogenität nach dieser Prüfmethode gehören

— die Identifizierung der kanzerogenen Eigenschaften einer Prüfsubstanz, die im Vergleich zu gleichzeitigen Kontrollgruppen zu einer erhöhten Inzidenz von Neoplasmen, einem erhöhten Anteil maligner Neoplasmen oder einem schnelleren Auftreten von Neoplasmen führen,

— die Ermittlung der Zeit bis zum Auftreten von Neoplasmen,

— die Feststellung der chronischen Toxizität der Prüfsubstanz,

— die Identifizierung des Zielorgans/der Zielorgane der chronischen Toxizität und der Kanzerogenität,

— die Beschreibung der Dosis-Wirkungs-Beziehung,

— die Bestimmung eines NOAEL-Werts (Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung) oder eines Ausgangspunkts für die Festlegung einer Benchmark-Dosis (BMD),

— die Extrapolation kanzerogener Wirkungen auf Expositionsniveaus von Menschen bei geringer Dosis,

— die Vorhersage der Wirkungen chronischer Toxizität beim Expositionsniveau von Menschen,

— die Gewinnung von Daten zur Prüfung von Hypothesen über die Wirkungsweise (2) (7) (12) (13) (14) (15).

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

7. Bei der Beurteilung und Bewertung des Kanzerogenitätspotenzials und der chronischen Toxizität einer Prüfsubstanz sollte das Prüflabor vor Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz berücksichtigen, damit die Studienauslegung auf eine effizientere Prüfung ihrer toxikologischen Eigenschaften ausgerichtet und die Verwendung von Versuchstieren minimiert werden kann. Es ist wichtig, die Wirkungsweise eines vermutlichen Karzinogens zu kennen und zu berücksichtigen (2) (7) (12) (13) (14) (15), da die optimale Studienauslegung je nachdem, ob die Prüfsubstanz ein bekanntes oder vermutliches genotoxisches Karzinogen ist, unterschiedlich sein kann. Nähere Hinweise zu Aspekten der Wirkungsweise sind im Guidance Document No. 116 (7) zu finden.

8. Für die Auslegung der Studie könnten u. a. Informationen wie die Identität, die chemische Struktur und die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, sämtliche Informationen über die Wirkungsweise, Ergebnisse jeglicher In-vitro- oder In-vivo-Toxizitätsprüfungen einschließlich Genotoxizitätsprüfungen, vorgesehene Verwendungen und die Möglichkeit der Exposition des Menschen, (Q)SAR-Daten, Daten über Mutagenität/Genotoxizität, Kanzerogenität und andere toxikologische Daten über strukturverwandte Substanzen, toxikokinetische Daten (Kinetik bei Einzel- und Mehrfachdosierung) sowie Daten aus anderen Studien mit wiederholter

▼M4

Exposition herangezogen werden. Die chronische Toxizität/Kanzerogenität sollte erst bestimmt werden, wenn erste Informationen über die Toxizität aus Toxizitätsprüfungen mit wiederholter Gabe über 28 Tage und/oder 90 Tage vorliegen. Auch Kurzzeitversuche zur Krebsinitiation-/promotion können nützliche Informationen liefern. Im Rahmen der Gesamtbewertung der potenziellen schädlichen Wirkungen einer bestimmten Prüfsubstanz auf die Gesundheit sollte bei der Prüfung auf Kanzerogenität etappenweise vorgegangen werden (16) (17) (18) (19).

9. Vor Beginn der Prüfung ist festzulegen, welche Statistikmethoden angesichts der Versuchsauslegung und der Ziele am besten für die Analyse der Ergebnisse geeignet sind. Dabei ist u. a. zu entscheiden, ob die Statistiken Anpassungen in Bezug auf die Überlebensrate, die Analyse kumulativer Tumorrisiken bezogen auf die Überlebensdauer, die Analyse des Zeitraums bis zum Auftreten eines Tumors und die Analyse bei vorzeitigem Tod der Tiere einer oder mehrerer Gruppen umfassen sollten. Hinweise zu den geeigneten statistischen Analysen und wichtige Literaturverweise zu international anerkannten Statistikmethoden sind im Guidance Document No. 116 (7) sowie im Guidance Document No. 35 on the analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies (20) zu finden.

10. Bei der Durchführung einer Prüfung auf Kanzerogenität sind stets die im OECD Guidance Document No. 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation (21), insbesondere in Absatz 62, genannten Grundsätze und Erwägungen zu befolgen. In diesem Absatz heißt es: *Wenn ein Tier in Studien mit wiederholter Verabreichung progressive klinische Anzeichen für eine fortschreitende Verschlechterung seines Zustands aufweist, ist eine informierte Entscheidung zu treffen, ob das Tier tierschutzgerecht getötet werden sollte oder nicht. Bei dieser Entscheidung sind Faktoren wie der Wert der Informationen, die bei Verbleiben des Tiers in der Studie gewonnen werden können, und der allgemeine Gesundheitszustand des Tiers gegeneinander abzuwägen. Wird beschlossen, das Tier in der Studie zu belassen, ist es entsprechend den Erfordernissen häufiger zu beobachten. Zur Linderung von Schmerzen oder Qualen kann auch die Verabreichung der Prüfsubstanz unterbrochen oder die Dosis verringert werden, sofern dabei der Zweck der Prüfung nicht beeinträchtigt wird.*

11. Ausführliche Informationen und eine Diskussion der Prinzipien der Dosiswahl bei Studien zur Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität sind im Guidance Document No. 116 (7) sowie in zwei Veröffentlichungen des International Life Sciences Institute (22) (23) zu finden. Die grundlegende Strategie der Dosiswahl hängt von den Hauptzielen der Studie ab (Nummer 6). Bei der Auswahl der geeigneten Dosisstufen ist ein Gleichgewicht zwischen Gefahrenidentifizierung einerseits und der Beschreibung von Wirkungen bei geringer Dosierung und ihrer Relevanz andererseits herzustellen. Dieses Gleichgewicht ist bei einer kombinierten Studie zur Prüfung auf chronische Toxizität und auf Kanzerogenität besonders wichtig.

12. Es sollte in Betracht gezogen werden, statt einer getrennten Durchführung einer Prüfung auf chronische Toxizität (Kapitel B.30 dieses Anhangs) und einer Prüfung auf Kanzerogenität (Kapitel B.32 dieses Anhangs) eher diese kombinierte Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität durchzuführen. Die kombinierte Methode ist zeit- und kosteneffizienter und benötigt weniger Versuchstiere als zwei getrennte Studien, ohne dass dabei die Qualität der Daten der chronischen Komponente oder der Kanzerogenitätskomponente beeinträchtigt würde. Bei Durchführung einer kombinierten Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität sind die Grundsätze der Dosiswahl (Nummer 11 und Nummern 22-26) jedoch genau zu beachten. Es wird allerdings anerkannt, dass im Rahmen bestimmter Regelungen möglicherweise getrennte Prüfungen vorgeschrieben sind. Weitere Hinweise zur Planung der kombinierten Studie zur Prüfung auf chronische Toxizität und Kanzerogenität mit dem Ziel, die Effizienz der Studie zu maximieren, indem möglichst wenig Tiere verwendet und die verschiedenen Versuchsverfahren gestrafft werden, sind im Guidance Document No. 116 (7) zu finden.

▼M4

13. Die im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe werden am Ende dieses Kapitels und im Guidance Document No. 116 (7) definiert.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

14. Die Studie umfasst zwei parallele Phasen: eine chronische Phase und eine Kanzerogenitätsphase (zur jeweiligen Dauer siehe Nummern 34 bzw. 35). Die Prüfsubstanz wird in der Regel oral verabreicht, aber auch die Verabreichung durch Inhalation oder auf dermalem Weg kann angebracht sein. In der chronischen Phase wird die Prüfsubstanz mehreren Gruppen von Versuchstieren täglich in abgestuften Dosen verabreicht, eine Dosisstufe je Gruppe, und zwar normalerweise über einen Zeitraum von 12 Monaten, wobei je nach Regulierungsanforderungen (siehe Nummer 34) auch eine längere oder kürzere Dauer gewählt werden kann. Die Dauer sollte ausreichend lang sein, damit sich etwaige Wirkungen kumulativer Toxizität manifestieren können, ohne dass sich die verzerrenden Wirkungen geriatrischer Veränderungen bemerkbar machen. Die Studienauslegung kann auch eine oder mehrere zwischenzeitliche Tötungen vorsehen, z. B. nach 3 und 6 Monaten; außerdem können zu diesem Zweck auch zusätzliche Gruppen von Versuchstieren aufgenommen werden (siehe Nummer 20). In der Kanzerogenitätsphase wird die Prüfsubstanz mehreren Gruppen von Versuchstieren für den größeren Teil ihrer Lebenszeit täglich verabreicht. In beiden Phasen werden die Tiere sorgfältig auf Toxizitätszeichen und das Auftreten neoplastischer Veränderungen beobachtet. Tiere, die im Verlauf der Prüfung sterben, und vorzeitig getötete Tiere werden seziert; die nach Abschluss der Prüfung überlebenden Tiere werden getötet und ebenfalls seziert.

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Auswahl von Versuchstierarten**

15. Diese Prüfmethode betrifft hauptsächlich die Bewertung und Evaluierung der chronischen Toxizität und der Kanzerogenität bei Nagetieren (Nummer 2). Die Verwendung anderer Arten als Nagetiere kann in Betracht gezogen werden, wenn die vorliegenden Daten darauf hindeuten, dass sie für die Vorhersage gesundheitlicher Wirkungen beim Menschen von größerer Relevanz sind. Die Wahl der Tierart ist zu begründen. Die bevorzugte Nagetierart ist die Ratte, doch können auch andere Nagetierarten, z. B. die Maus, verwendet werden. Obwohl die Verwendung der Maus in Prüfungen auf Kanzerogenität nur von begrenztem Nutzen sein mag (24) (25) (26), schreiben einige geltende Regulierungsprogramme nach wie vor Kanzerogenitätsprüfungen an der Maus vor, sofern nicht gezeigt werden kann, dass eine solche Studie wissenschaftlich nicht erforderlich ist. Ratten und Mäuse sind wegen ihrer relativ kurzen Lebenszeit, der weit verbreiteten Verwendung in pharmakologischen und toxikologischen Studien, ihrer Anfälligkeit für die Entstehung von Tumoren und der Verfügbarkeit ausreichend beschriebener Stämme die bevorzugten Versuchsmodelle. Daher liegen über ihre Physiologie und Pathologie umfangreiche Informationen vor. Wenn Prüfungen auf chronische Toxizität/Kanzerogenität bei Nichtnagern erforderlich sind, sollten Auslegung und Durchführung der Versuche auf den Grundsätzen der vorliegenden Prüfmethode sowie denen von Kapitel B.27 dieses Anhangs — Prüfung auf subchronische orale Toxizität — 90-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter Verabreichung an Nicht-Nagetieren (6) basieren. Zusätzliche Informationen zur Wahl der Tierart und des Stamms sind im Guidance Document No. 116 (7) enthalten.

16. Es sind junge, gesunde, adulte Tiere aus üblicherweise eingesetzten Laborstämmen zu verwenden. Für die kombinierte Prüfung auf chronische Toxizität/Kanzerogenität sollten Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden wie für die kürzere(n) Toxizitätsvorstudie(n). Wenn jedoch bekannt ist, dass Tiere dieses Stamms und dieser Herkunft die allgemein anerkannten Überlebenskriterien für Langzeitstudien [siehe Guidance Document No. 116 (7)] nicht erfüllen, ist die Verwendung eines Tierstamms mit ausreichender Überlebensrate für die Langzeitstudie in Betracht zu ziehen. Die weiblichen Tiere dürfen weder bereits geworfen haben noch trächtig sein.

▼M4

**Haltungs- und Fütterungsbedingungen**

17. Die Tiere können entweder einzeln oder in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen in Käfigen untergebracht werden. Eine Einzelunterbringung ist nur in Betracht zu ziehen, wenn dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist (27) (28) (29). Die Käfige sollten so angeordnet werden, dass etwaige Einflüsse der Käfigplatzierung minimiert werden. Die Temperatur im Versuchstierraum sollte 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte mindestens 30 % betragen und — außer beim Reinigen des Raums — 70 % nicht überschreiten. Angestrebt werden sollte eine Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, und eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung ist zu gewährleisten. Das Futter sollte den Nährstoffbedarf der eingesetzten Tierart decken und möglichst wenig Schadstoffe wie z. B. Pestizidrückstände, persistente organische Schadstoffe, Phytoöstrogene, Schwermetalle und Mykotoxine enthalten, die das Ergebnis der Prüfung beeinflussen könnten. Das Futter ist regelmäßig, und zwar zumindest zu Beginn der Prüfung und bei Verwendung einer anderen Charge, auf den Nährstoff- und Schadstoffgehalt hin zu analysieren; die Ergebnisse sind im Abschlussbericht anzugeben. Ergebnisse von Analysen des in der Prüfung verwendeten Trinkwassers sind ebenfalls anzugeben. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung einer Prüfsubstanz und die Deckung des Nährstoffbedarfs der Tiere sichergestellt werden muss, wenn die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht wird.

**Vorbereitung der Tiere**

18. Es sind gesunde Tiere zu verwenden, die mindestens sieben Tage an die Laborbedingungen gewöhnt und zuvor nicht für andere Experimente verwendet wurden. Bei Nagetieren sollte die Verabreichung so bald wie möglich nach dem Absetzen und der Eingewöhnung beginnen, vorzugsweise bevor die Tiere 8 Wochen alt sind. Art, Stamm, Herkunft, Geschlecht, Gewicht und Alter der Versuchstiere sind anzugeben. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede bei den Tieren beider Geschlechter möglichst gering sein und ± 20 % des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts aller Tiere in der Studie nicht überschreiten. Die Tiere werden nach dem Zufallsprinzip in Kontroll- und Behandlungsgruppen eingeteilt. Nach der Randomisierung sollte sich das Durchschnittsgewicht der Tiere desselben Geschlechts von Gruppe zu Gruppe nicht signifikant unterscheiden. Gibt es statistisch signifikante Unterschiede, sollte die Randomisierung möglichst wiederholt werden. Jedes Versuchstier erhält zur sicheren Identifizierung eine eigene Nummer und wird durch Tätowierung, Mikrochipimplantat oder auf eine andere geeignete Weise mit dieser Nummer gekennzeichnet.

VERFAHREN

**Zahl und Geschlecht der Versuchstiere**

19. Es sind Tiere beider Geschlechter zu verwenden. Es sollten so viele Tiere verwendet werden, dass eine gründliche biologische und statistische Auswertung möglich ist. Bei Nagetieren sollte daher jede Dosisgruppe (siehe Nummer 22) und jede gleichzeitige Kontrollgruppe für die Kanzerogenitätsphase der Studie mindestens je 50 Tiere beider Geschlechter umfassen. Je nach Ziel der Studie kann die statistische Aussagekraft von Schlüsselwerten durch ungleiche Verteilung der Tiere auf die verschiedenen Dosisgruppen erhöht werden, wobei z. B. zur Einschätzung des karzinogenen Potenzials bei niedrigen Dosen mehr als 50 Tiere in die Gruppen mit niedriger Dosis eingeteilt werden. Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass eine mäßige Erhöhung der Gruppengröße nur zu einer relativ geringen Erhöhung der statistischen Aussagekraft der Studie führt. Bei Nagetieren sollte jede Dosisgruppe (siehe Nummer 22) und jede gleichzeitige Kontrollgruppe für die chronische Toxizitätsphase der Studie mindestens je 10 Tiere beider Geschlechter umfassen. Dies sind weniger Tiere als in der Studie zur Prüfung

▼M4

auf chronische Toxizität (Kapitel B.30 dieses Anhangs). Die Auswertung der Daten von der geringeren Anzahl Tiere je Gruppe in der chronischen Toxizitätsphase dieser kombinierten Studie wird jedoch durch die Daten von der größeren Anzahl Tiere in der Kanzerogenitätsphase unterstützt. Bei Studien an Mäusen sind in jeder Dosisgruppe der chronischen Toxizitätsphase möglicherweise zusätzliche Tiere nötig, um alle erforderlichen hämatologischen Bestimmungen vornehmen zu können. Weitere Informationen zur statistischen Auslegung der Studie und zur Wahl der Dosisstufen zwecks Maximierung der statistischen Aussagekraft sind im Guidance Document No. 116 (7) enthalten.

**Tötungen im Verlauf der Studie, Satellitengruppen und Sentineltiere**

20. Es kann vorgesehen werden, dass Tiere im Verlauf der Studie für die chronische Toxizitätsphase, z. B. nach sechs Monaten, getötet werden, um Erkenntnisse über den Fortgang nicht neoplastischer Veränderungen und mechanistische Informationen zu gewinnen, falls dies wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Wenn diese Informationen bereits aus vorherigen Toxizitätsstudien mit wiederholter Gabe der Prüfsubstanz vorliegen, sind zwischenzeitliche Tötungen möglicherweise wissenschaftlich nicht gerechtfertigt. Die Tiere, die in der normalerweise 12 Monate dauernden chronischen Toxizitätsphase der Studie verwendet werden (Nummer 34) liefern Daten über zwischenzeitliche Tötungen für die Kanzerogenitätsphase, so dass insgesamt weniger Tiere verwendet werden müssen. In der chronischen Toxizitätsphase der Studie kann die Reversibilität toxikologischer Veränderungen, die durch die Prüfsubstanz hervorgerufen werden, auch mithilfe von Satellitengruppen überwacht werden. Diese können auf die höchste Dosisgruppe der Studie zuzüglich einer Kontrolle beschränkt werden. Der Krankheitsstatus während der Studie kann erforderlichenfalls mit einer zusätzlichen Gruppe von Sentineltieren (normalerweise je fünf Tiere beider Geschlechter) überwacht werden (30). Weitere Hinweise zur Planung der Studie in Bezug auf die Aufnahme von Tieren, die im Verlauf der Studie getötet werden sollen, sowie von Satelliten- und Sentineltieren unter gleichzeitiger Minimierung der Zahl der insgesamt verwendeten Tiere sind im Guidance Document No. 116 (7) zu finden.

21. Wenn Satellitentiere und/oder Tötungen von Tieren im Verlauf der Studie vorgesehen sind, beträgt die Zahl der für diese Zwecke aufgenommenen Tiere in jeder Dosisgruppe normalerweise je zehn Tiere beider Geschlechter, und die Gesamtzahl der Tiere in der Studie sollte um die Zahl der Tiere erhöht werden, die vor Beendigung der Studie getötet werden sollen. Tiere, die im Verlauf der Studie getötet werden sollen, und Satellitentiere sind normalerweise in Bezug auf die Bestimmung des Körpergewichts und der Futter-/Wasseraufnahme, hämatologische und klinisch-biochemische Bestimmungen sowie pathologische Untersuchungen genauso zu behandeln wie die Tiere in der chronischen Toxizitätsphase der Hauptstudie; es kann allerdings vorgesehen werden, die Messungen (in den Gruppen mit im Verlauf der Studie zu tötenden Tieren) auf bestimmte Schlüsselaspekte wie Neurotoxizität oder Immunotoxizität zu beschränken.

**Dosisgruppen und Dosierung**

22. Das Guidance Document No. 116 (7) enthält Hinweise zu allen Aspekten der Dosiswahl und zu den Abständen der Dosisstufen. Sowohl für die chronische als auch für die Kanzerogenitätsphase werden mindestens drei Dosisstufen und eine gleichzeitige Kontrolle verwendet. Die Dosisstufen werden im Allgemeinen auf der Grundlage der Ergebnisse von Studien mit kurzzeitiger wiederholter Verabreichung oder Dosisfindungsstudien festgelegt und sollten alle vorliegenden toxikologischen und toxikokinetischen Daten für die Prüfsubstanz oder verwandte Stoffe berücksichtigen.

▼M4

23. Für die chronische Toxizitätsphase der Studie ist u. U. keine vollständige Prüfung mit drei Dosisstufen erforderlich, wenn davon ausgegangen werden kann, dass ein Versuch mit einer Dosisstufe, die mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag entspricht, wahrscheinlich keine schädlichen Wirkungen hervorruft. Die Entscheidung sollte sich auf Informationen aus Vorstudien stützen und darauf, dass angesichts der Daten für strukturverwandte Stoffe keine Toxizität zu erwarten ist. Sofern die Exposition des Menschen nicht die Prüfung bei einer höheren Dosis erforderlich erscheinen lässt, kann eine Grenze von 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag angewandt werden.

24. Soweit keine Beschränkungen aufgrund der physikalisch-chemischen Beschaffenheit oder der biologischen Wirkungen der Prüfsubstanz bestehen, ist die höchste Dosisstufe so zu wählen, dass zwar die Hauptzielorgane und die toxischen Wirkungen identifiziert werden können, aber Leiden, schwere Toxizität, Morbidität oder Tod der Tiere vermieden werden. Die höchste Dosisstufe ist normalerweise so zu wählen, dass Anzeichen von Toxizität hervorgerufen werden, die sich z. B. in einer verzögerten Körpergewichtsentwicklung äußern (etwa 10 %). Je nach den Zielen der Studie (siehe Nummer 6) kann jedoch eine Höchstdosis festgelegt werden, die unter der zu Toxizitätszeichen führenden Dosis liegt, z. B. wenn eine Dosis eine besorgniserregende Wirkung auslöst, die sich aber nur geringfügig auf Lebensdauer oder Körpergewicht auswirkt.

25. Die Dosisstufen und die Abstände der Dosisstufen können so gewählt werden, dass eine Dosis-Wirkungs-Beziehung und, je nach Wirkungsweise der Prüfsubstanz, ein NOAEL-Wert oder andere angestrebte Studienergebnisse, z. B. ein BMD (siehe Nummer 27), festgestellt werden können. Zu den Faktoren, die bei der Festlegung niedrigerer Dosen zu berücksichtigen sind, gehören die voraussichtliche Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve, die Dosen, bei denen wichtige Änderungen des Metabolismus oder der toxischen Wirkungsweise eintreten können, und das Niveau, bei dem eine Schwelle oder ein Ausgangspunkt für eine Extrapolation niedriger Dosen erwartet wird. Bei Durchführung einer kombinierten Prüfung auf Kanzerogenität und chronische Toxizität liegt der Schwerpunkt auf der Gewinnung von Informationen für die Einschätzung des Kanzerogenitätsrisikos, während die Gewinnung von Informationen über die chronische Toxizität normalerweise ein nachrangiges Ziel ist. Dies ist zu berücksichtigen, wenn die Dosisstufen und ihre Abstände für die Studie festgelegt werden.

26. Welche Dosisstufenabstände gewählt werden, hängt von den Zielen der Studie und den Merkmalen der Prüfsubstanz ab und kann in dieser Prüfmethode nicht im Einzelnen vorgeschrieben werden. Abstände mit einem Faktor von 2 bis 4 erweisen sich jedoch oft als gut geeignet für die Festsetzung abnehmender Dosisstufen. Außerdem ist es oft besser, statt der Verwendung sehr großer Intervalle (z. B. mit einem Faktor zwischen 6 und 10) zwischen den Dosierungen eine vierte Prüfgruppe einzurichten. Die Verwendung von Faktoren über 10 sollte im Allgemeinen vermieden bzw. gegebenenfalls begründet werden.

27. Entsprechend dem Guidance Document No. 116 (7) sind bei der Dosisfestlegung u. a. folgende Faktoren zu berücksichtigen:

— bekannte oder vermutete Nichtlinearitäten oder Wendepunkte der Dosis-Wirkungs-Kurve;

— Toxikokinetik und Dosisbereiche, bei denen die metabolische Induktion, die Sättigung oder die Nichtlinearität zwischen externen und internen Dosen auftritt oder nicht auftritt;

— Vorläuferläsionen, Wirkungsmarker oder Indikatoren für den Ablauf zugrunde liegender biologischer Schlüsselprozesse;

▼M4

— wichtige (oder vermutete) Aspekte der Wirkungsweise, z. B. Dosen, ab denen Zytotoxizität auftritt, Hormonspiegel beeinflusst werden, homöostatische Mechanismen gestört werden usw.;

— Bereiche der Dosis-Wirkungs-Kurve, bei denen eine besonders genaue Schätzung erforderlich ist, z. B. im Bereich der vorgesehenen BMD oder einer vermuteten Schwelle;

— Berücksichtigung der voraussichtlichen Expositionsniveaus von Menschen, insbesondere bei der Wahl mittlerer und niedriger Dosen.

28. Die Kontrollgruppe ist eine unbehandelte Gruppe oder eine Vehikelkontrollgruppe, sofern ein Vehikel zur Verabreichung der Prüfsubstanz verwendet wird. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfsubstanz sollten die Tiere der Kontrollgruppe genauso behandelt werden wie die Tiere in den Prüfgruppen. Wird ein Vehikel verwendet, erhält die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten bei den Dosisgruppen verwendeten Volumen. Wird eine Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht, und führt dies aus geschmacklichen Gründen zu einer verminderten Futteraufnahme, kann eine paarweise gefütterte Kontrollgruppe nützlich und eine bessere Kontrolle sein.

**Zubereitung der Dosen und Verabreichung der Prüfsubstanz**

29. Die Prüfsubstanz wird in der Regel oral, d. h. mit der Nahrung oder dem Trinkwasser, oder über eine Schlundsonde verabreicht. Zusätzliche Informationen zu Verabreichungswegen und -methoden sind im Guidance Document No. 116 (7) enthalten. Verabreichungsweg und -methode richten sich nach dem Zweck der Studie, den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, ihrer Bioverfügbarkeit und der vorherrschenden Art der Exposition beim Menschen. Der gewählte Verabreichungsweg und die Methode sollten begründet werden. Aus Tierschutzgründen sollte die Schlundsonde nur für Agenzien gewählt werden, bei denen dieser Weg und diese Methode der Verabreichung die potenzielle Humanexposition annähernd repräsentieren (z. B. Arzneimittel). Nahrungs- oder Umweltchemikalien einschließlich Pestizide werden normalerweise mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreicht. Für bestimmte Szenarios, z. B. berufliche Exposition, können andere Applikationswege besser geeignet sein.

30. Bei Bedarf wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Zu berücksichtigen sind gegebenenfalls folgende Merkmale des Vehikels und anderer Additive: Auswirkungen auf die Resorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Retention der Prüfsubstanz; Auswirkungen auf die chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, die deren toxische Eigenschaften verändern können, und ferner Auswirkungen auf die Futter- oder Wasseraufnahme oder den Ernährungszustand der Versuchstiere. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension, dann eine Lösung/Emulsion in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in einem anderen Vehikel in Betracht zu ziehen. Bei anderen Vehikeln als Wasser müssen deren toxische Merkmale bekannt sein. Es sollten Informationen über die Stabilität der Prüfsubstanz und die Homogenität der Lösungen oder Futterrationen, die (je nach Fall) die Dosierung enthalten, unter den Verabreichungsbedingungen (z. B. mit dem Futter) vorliegen.

31. Für mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichte Stoffe ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfsubstanz die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Um eine unausgewogene Ernährung zu vermeiden, sollte die Konzentration der Prüfsubstanz in Langzeittoxizitätsstudien mit Verabreichung über die Nahrung normalerweise eine Obergrenze von 5 % der Gesamtnahrung nicht übersteigen. Wenn die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht wird, kann entweder eine konstante Futterkonzentration (mg/kg Futter oder ppm) oder eine konstante Dosierung in Relation zum Körpergewicht des Tiers (mg/kg Körpergewicht), berechnet auf Wochenbasis, verwendet werden. Die jeweils gewählte Verfahrensweise ist anzugeben.

▼M4

32. Bei oraler Verabreichung erhalten die Tiere die Prüfsubstanz täglich (sieben Tage in der Woche) für einen Zeitraum von 12 Monaten (chronische Phase) oder 24 Monaten (Kanzerogenitätsphase), siehe auch Nummern 33 und 34. Jede Abweichung von diesem Dosierungsplan, z. B. fünf Tage pro Woche, ist zu begründen. Bei dermaler Applikation werden die Tiere, wie in Kapitel B.9 dieses Anhangs (11) beschrieben, für einen Zeitraum von 12 Monaten (chronische Phase) oder 24 Monaten (Kanzerogenitätsphase) an sieben Tagen in der Woche mindestens 6 Stunden pro Tag mit der Prüfsubstanz behandelt. Die Inhalationsexposition wird an sieben Tagen in der Woche für 6 Stunden pro Tag durchgeführt, aber auch fünf Tage in der Woche sind möglich, wenn dies gerechtfertigt ist. Die Expositionsdauer beträgt normalerweise 12 Monate (chronische Phase) oder 24 Monate (Kanzerogenitätsphase). Wenn für eine „Nose-only"-Exposition andere Nagetierarten als Ratten verwendet werden, kann die maximale Expositionsdauer angepasst werden, um artenspezifisches Leiden zu minimieren. Eine Expositionsdauer von weniger als 6 Stunden pro Tag ist zu begründen. Siehe auch Kapitel B.8 dieses Anhangs (9).

33. Wird die Prüfsubstanz über eine Sonde verabreicht, so sollte dies unter Verwendung einer Schlundsonde oder einer geeigneten Intubationskanüle jeweils zur gleichen Tageszeit erfolgen. Normalerweise wird einmal am Tag eine einzige Dosis verabreicht; wenn es sich bei der Prüfsubstanz z. B. um einen lokal reizenden Stoff handelt, kann die Tagesdosis auf zwei Teilmengen aufgeteilt werden. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte so gering wie möglich sein und bei Nagetieren normalerweise 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten (31). Die Variabilität der Prüfvolumina sollte durch Anpassung der Konzentration auf ein konstantes Volumen bei allen Dosen möglichst gering gehalten werden. Davon ausgenommen sind potenziell ätzende oder reizende Stoffe, die zur Vermeidung schwerwiegender lokaler Wirkungen verdünnt werden müssen. Die Prüfung in Konzentrationen, die wahrscheinlich eine verätzende oder reizende Wirkung für den Magen-Darm-Trakt haben, ist zu vermeiden.

**Versuchsdauer**

34. Dosierungszeitraum und Dauer der chronischen Phase dieser Studie betragen normalerweise 12 Monate, aber je nach den Anforderungen bestimmter Regulierungsregelungen oder für spezifische mechanistische Zwecke sind auch kürzere (z. B. 6 oder 9 Monate) oder längere (z. B. 18 oder 24 Monate) Zeiträume möglich. Abweichungen von der 12-monatigen Expositionsdauer sind zu begründen, insbesondere wenn eine kürzere Dauer gewählt wird. Zur Bewertung der chronischen Toxizität und nicht neoplastischer pathologischer Läsionen wird die Behandlung aller Dosisgruppen dieser Phase zum festgelegten Zeitpunkt beendet. Satellitengruppen zur Beobachtung der Reversibilität von toxikologischen Veränderungen, die durch die Prüfsubstanz hervorgerufen werden, sollten nach Beendigung der Exposition noch für einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen, aber nicht länger als ein Drittel der Gesamtstudiendauer ohne Behandlung beibehalten werden.

35. Die Kanzerogenitätsphase dieser Studie dauert bei Nagetieren in der Regel 24 Monate, was dem größten Teil der normalen Lebenszeit der verwendeten Tiere entspricht. Eine kürzere oder längere Studiendauer ist je nach Lebenszeit der in der Studie verwendeten Tierart möglich, sollte aber begründet werden. Bei bestimmten Stämmen von Mäusen, z. B. die Stämme AKR/J, C3H/J oder C57BL/6J, ist eine Dauer von 18 Monaten möglicherweise besser geeignet. Im Folgenden werden Hinweise zu Dauer und Beendigung der Studie und dem Überleben der Tiere gegeben. Weitere Hinweise, u. a. zu der Frage, wieweit ein aus der Überlebensrate der Tiere resultierendes negatives Ergebnis einer Kanzerogenitätsstudie akzeptiert werden kann, sind im OECD Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies (7) zu finden.

▼M4

— Wenn die Anzahl der überlebenden Tiere in den Gruppen mit niedrigerer Dosierung oder in der Kontrollgruppe unter 25 % sinkt, ist die Beendigung der Studie in Betracht zu ziehen.

— Ist lediglich in der Hochdosisgruppe ein vorzeitiger Tod aufgrund von Toxizität festzustellen, muss dies nicht zwangsläufig zur Beendigung der Studie führen.

— Die Überlebensrate sollte nach Geschlechtern getrennt ausgewertet werden.

— Die Studie sollte nicht über den Punkt hinaus fortgeführt werden, an dem die Daten aus der Studie nicht mehr ausreichen, um eine statistisch valide Bewertung vorzunehmen.

BEOBACHTUNGEN (CHRONISCHE TOXIZITÄTSPHASE)

36. Alle Tiere sind in der Regel jeden Tag morgens und abends, auch am Wochenende und an Feiertagen, auf Anzeichen von Morbidität und Mortalität hin zu untersuchen. Allgemeine klinische Beobachtungen sollten mindestens einmal täglich, vorzugsweise zur selben Tageszeit, unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis über eine Schlundsonde zu erwarten ist, vorgenommen werden.

37. Bei allen Tieren sind mindestens einmal vor der ersten Exposition (für intraindividuelle Vergleiche), am Ende der ersten Studienwoche und danach monatlich gründliche klinische Beobachtungen vorzunehmen. Das Beobachtungsprotokoll ist so zu gestalten, dass Abweichungen zwischen den Beobachtern minimiert werden und von der Prüfgruppe unabhängig sind. Diese Beobachtungen sollten außerhalb des Käfigs erfolgen, in dem die Tiere gehalten werden, und zwar vorzugsweise in einem Standardgehege jeweils zu denselben Zeiten. Sie sind sorgfältig zu dokumentieren, am besten nach einer speziell vom Prüflabor entwickelten Bewertungsskala. Die Beobachtungsbedingungen sollten möglichst konstant sein. Zu achten ist insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, auf Sekrete und Exkrete sowie autonome Aktivitäten (z. B. Tränensekretion, Piloerektion, Pupillengröße, ungewöhnliche Atemmuster). Gang- und Haltungsstörungen, ferner Reaktionen auf den Umgang mit den Tieren sowie etwaige klonische oder tonische Bewegungen, Stereotypien (z. B. übermäßiges Putzen, wiederholte Kreisbewegungen) oder abnormes Verhalten (z. B. Selbstverstümmelung, Rückwärtsgehen) sollten auch dokumentiert werden (32).

38. Alle Tiere sind vor der ersten Verabreichung der Prüfsubstanz mit einem Ophthalmoskop oder einem anderen geeigneten Instrument ophthalmologisch zu untersuchen. Am Ende der Studie ist diese Untersuchung möglichst bei allen Tieren, aber mindestens bei der Hochdosisgruppe und der Kontrollgruppe zu wiederholen. Wenn behandlungsbedingte Veränderungen an den Augen beobachtet werden, sind alle Tiere zu untersuchen. Wenn eine Strukturanalyse oder andere Informationen auf eine Toxizität für die Augen hindeuten, ist die Frequenz der Augenuntersuchungen zu erhöhen.

39. Bei Chemikalien, für die vorangegangene Toxizitätsprüfungen mit wiederholter Gabe über 28 und/oder 90 Tage auf potenzielle neurotoxische Wirkungen hindeuten, können vor Studienbeginn, in Abständen von drei Monaten nach Beginn einer Studie von bis zu 12 Monaten einschließlich sowie bei Beendigung der Studie (falls länger als 12 Monate) fakultativ die sensorische Reaktivität auf Reize verschiedener Art (32) (z. B. akustische, visuelle und propriozeptive Reize) (33), (34), (35), die Greifkraft (36) und die motorische Aktivität (37) bewertet werden. Weitere Einzelheiten zu den möglichen Untersuchungen finden sich in der Literatur. Allerdings können auch andere als dort genannte Verfahren angewendet werden.

▼M4

40. Bei Chemikalien, für die vorangegangene Toxizitätsprüfungen mit wiederholter Gabe über 28 und/oder 90 Tage auf potenzielle immunotoxische Wirkungen hindeuten, können bei Beendigung der Studie fakultativ weitere Untersuchungen dieses Endpunkts durchgeführt werden.

*Körpergewicht, Futter-/Wasseraufnahme und Futtereffizienz*

41. Alle Tiere sollten zu Beginn der Behandlung, in den ersten 13 Wochen mindestens einmal wöchentlich und danach mindestens monatlich gewogen werden. Futteraufnahme und Futtereffizienz sollten in den ersten 13 Wochen mindestens wöchentlich und danach mindestens monatlich bestimmt werden. Die Trinkwasseraufnahme sollte in den ersten 13 Wochen mindestens wöchentlich und danach mindestens monatlich gemessen werden, wenn die Prüfsubstanz mit dem Trinkwasser verabreicht wird. Bei Studien, in denen das Trinkverhalten der Tiere verändert ist, sollte auch die Trinkwasseraufnahme gemessen werden.

*Hämatologie und klinische Biochemie*

42. Bei Prüfungen an Nagetieren sind die hämatologischen Untersuchungen an allen Versuchstieren (10 männliche und 10 weibliche Tiere je Gruppe) nach 3, 6 und 12 Monaten sowie bei Beendigung der Studie (falls sie länger als 12 Monate dauert) durchzuführen. Bei Mäusen werden möglicherweise Satellitentiere benötigt, um alle erforderlichen hämatologischen Bestimmungen vornehmen zu können (siehe Nummer 19). Bei Prüfungen an Nichtnagern werden die Proben wie bei Nagetieren beschrieben in den Zwischenphasen und bei Beendigung der Studie von einer kleineren Anzahl Tiere (z. B. vier Tiere je Geschlecht und je Gruppe in Hundestudien) genommen. Weder bei Nagern noch bei Nichtnagern brauchen Messungen nach drei Monaten vorgenommen zu werden, wenn bei den hämatologischen Parametern in einer vorangegangenen 90-Tage-Studie mit vergleichbaren Dosisstufen keine Wirkung erkennbar war. Die Blutproben müssen unter Anästhesie an einer benannten Stelle, z. B. durch Herzpunktion oder aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen werden.

43. Die folgenden Parameter sind zu bestimmen (38): Gesamt- und Differenzialleukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit, mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (MCV), mittleres korpuskuläres Hämoglobin (MCH), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Prothrombinzeit und aktivierte partielle Thromboplastinzeit. Je nach Toxizität der Prüfsubstanz können gegebenenfalls auch weitere hämatologische Parameter wie Heinz-Körper oder andere atypische Erythrozytenmorphologie oder Methämoglobin gemessen werden. Insgesamt ist je nach den beobachteten und/oder erwarteten Wirkungen der Prüfsubstanz mit der entsprechenden Flexibilität vorzugehen. Wenn die Prüfsubstanz Auswirkungen auf die Hämatopoese hat, können auch eine Bestimmung der Retikulozytenzahl und eine Knochenmarkzytologie angezeigt sein; sie müssen aber nicht routinemäßig durchgeführt werden.

44. Klinisch-biochemische Bestimmungen zur Untersuchung der wichtigsten toxischen Wirkungen in Geweben, insbesondere der Wirkungen auf Nieren und Leber, sind an Blutproben durchzuführen, die von jedem Versuchstier (10 männliche und 10 weibliche Tiere je Gruppe) in den für die hämatologischen Untersuchungen angegebenen gleichen Zeitabständen entnommen werden. Bei Mäusen werden möglicherweise Satellitentiere benötigt, um alle erforderlichen klinisch-biochemischen Bestimmungen vornehmen zu können. Bei Prüfungen an Nichtnagern werden die Proben wie bei Nagetieren beschrieben in den Zwischenphasen und bei Beendigung der Studie von einer kleineren Anzahl Tiere (z. B. vier Tiere je Geschlecht und je Gruppe in Hundestudien) genommen. Weder bei Nagern noch bei Nichtnagern brauchen Messungen nach drei Monaten vorgenommen zu werden, wenn bei den

▼M4

klinisch-biochemischen Parametern in einer vorangegangenen 90-Tage-Studie mit vergleichbaren Dosisstufen keine Wirkung erkennbar war. Es empfiehlt sich eine Futterkarenz der Tiere (ausgenommen Mäuse) über Nacht, bevor die Blutproben entnommen werden ([1]). Die folgenden Parameter sind zu bestimmen (38): Glucose, Harnstoff (Harnstoff-Stickstoff), Kreatinin, Gesamtprotein, Albumin, Calcium, Natrium, Kalium, Gesamtcholesterin, mindestens zwei geeignete Parameter für die hepatozelluläre Evaluierung (Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Glutamatdehydrogenase, Gesamtgallensäuren) (39) und mindestens zwei geeignete Parameter für die hepatobiliäre Evaluierung (alkalische Phosphatase, γ-Glutamyltransferase, 5'-Nucleotidase, Gesamtbilirubin, Gesamtgallensäuren) (39). Je nach Toxizität der Prüfsubstanz können gegebenenfalls auch weitere klinisch-chemische Parameter wie Nüchtern-Triglyceride, spezifische Hormone und Cholinesterase bestimmt werden. Insgesamt ist je nach den beobachteten und/oder erwarteten Wirkungen der Prüfsubstanz mit der entsprechenden Flexibilität vorzugehen.

45. An Proben, die allen Tieren in der Studie (zehn männliche und zehn weibliche Tiere je Gruppe) in den gleichen Abständen entnommen wurden wie die Proben für die hämatologische und die klinisch-chemische Untersuchung, sind Urinanalysen durchzuführen. Es brauchen keine Messungen nach drei Monaten vorgenommen zu werden, wenn bei der Urinanalyse in einer vorangegangenen 90-Tage-Studie mit vergleichbaren Dosisstufen keine Wirkung erkennbar war. Eine Empfehlung von Sachverständigen zu klinischen Pathologiestudien (38) enthält die folgende Liste von Parametern: Aussehen, Volumen, Osmolalität oder spezifisches Gewicht, pH-Wert, Gesamteiweiß und Glucose. Außerdem können Ketone, Urobilinogen, Bilirubin und okkultes Blut bestimmt werden. Sofern erforderlich, können weitere Parameter verwendet werden, um die Untersuchung beobachteter Wirkungen zu erweitern.

46. Bei Studien an Hunden werden im Allgemeinen Bestimmungen der Ausgangsdaten hämatologischer und klinisch-biochemischer Parameter vor der Behandlung für notwendig gehalten; bei Studien an Nagern müssen sie aber nicht bestimmt werden (38). Wenn keine ausreichenden historischen Ausgangsdaten vorliegen (siehe Nummer 58), sollten sie jedoch bestimmt werden.

PATHOLOGIE

*Makroskopische Untersuchung*

47. Alle an der Studie beteiligten Tiere müssen normalerweise einer vollständigen, eingehenden makroskopischen Untersuchung unterzogen werden, die die sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel-, Brust- und Bauchhöhlen und ihres Inhalts umfasst. Es kann jedoch auch vorgesehen werden, die Untersuchungen (in den Gruppen der Tiere, die im Verlauf der Studie getötet werden sollen, und in den Satellitengruppen) auf spezifische Schlüsselaspekte wie Neurotoxizität oder Immunotoxizität zu beschränken (siehe Nummer 21). Diese Tiere brauchen weder seziert noch den nachstehend beschriebenen Verfahren unterzogen zu werden. Sentineltiere können nach Ermessen des Studienleiters von Fall zu Fall seziert werden.

([1]) Für eine Reihe von Serum- und Plasmabestimmungen, insbesondere der Glucose, ist eine Futterkarenz der Tiere über Nacht zu empfehlen. Der Hauptgrund dafür ist, dass die bei fehlender Futterkarenz unweigerlich zunehmende Variabilität zu einer Maskierung subtilerer Wirkungen führen und die Interpretation erschweren könnte. Andererseits jedoch kann die nächtliche Futterkarenz den allgemeinen Metabolismus der Tiere beeinflussen und, insbesondere in Futterstudien, die tägliche Exposition gegen die Prüfsubstanz beeinträchtigen. Alle Tiere sind in demselben physiologischen Zustand zu bewerten; daher sollten ausführliche oder neurologische Untersuchungen für einen anderen Tag geplant werden als die Probenahmen für klinisch-biochemische Untersuchungen.

▼**M4**

48. Die Organgewichte aller Tiere sind zu erfassen, außer von denen, die gemäß dem letzten Teil von Nummer 47 ausgenommen sind. Nebennieren, Gehirn, Nebenhoden, Herz, Nieren, Leber, Ovarien, Milz, Hoden, Schilddrüse (nach Fixierung gewogen, mit Nebenschilddrüsen) und Uterus (außer der moribund aufgefundenen und/oder zwischenzeitlich getöteten Tiere) sind in angemessener Form von anhaftendem Gewebe zu befreien, und ihr Nassgewicht ist so rasch wie möglich nach der Sektion festzustellen, um ein Austrocknen zu verhindern.

49. Die folgenden Gewebe sind in dem für die betreffende Gewebeart und die vorgesehene anschließende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmittel aufzubewahren (40) (Gewebe in eckigen Klammern sind fakultativ):

| | | | |
|---|---|---|---|
| alle makro-skopischen Veränderungen | Herz | Pankreas | Magen (Vormagen, Drüsenmagen) |
| Nebennieren | Ileum | Nebenschilddrüse | [Zähne] |
| Aorta | Jejunum | periphere Nerven | Hoden |
| Gehirn (mit Schnitten von Cerebrum, Cerebellum und Medulla/Pons) | Nieren | Hypophyse | Thymus |
| Caecum | Tränendrüse (exorbital) | Prostata | Schilddrüse |
| Zervix | Leber | Rectum | [Zunge] |
| Koagulationsdrüse | Lunge | Speicheldrüse | Trachea |
| Kolon | Lymphknoten (sowohl oberflächliche als auch tiefe) | Samenbläschen | Harnblase |
| Duodenum | Brustdrüse (obligatorisch für Weibchen und, falls bei der Sektion erkennbar, für Männchen) | Skelettmuskel | Uterus (mit Zervix) |
| Nebenhoden | [obere Atemwege, einschließlich Nase, Nasenmuscheln und Nasennebenhöhlen] | Haut | [Harnleiter] |
| Auge (mit Netzhaut) | Speiseröhre | Rückenmark (auf 3 Ebenen: zervical, mittlerer Thoraxbereich und lumbar) | [Harnröhre] |
| [Femur mit Gelenk] | [Riechkolben] | Milz | Vagina |
| Gallenblase (bei anderen Arten als Ratten) | Ovarien | [Brustbein] | Knochenmarkschnitt und/oder ein frisches Knochenmark-Aspirat |
| Hardersche Drüse | | | |

▼M4

Bei paarigen Organen, z. B. Nieren, Nebennieren, sind beide Organe aufzubewahren. Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebeuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz als mögliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden. In Studien mit dermaler Applikation sind die in der Liste für orale Verabreichung aufgeführten Organe zu untersuchen; außerdem sind Proben der Haut an der Applikationsstelle zu nehmen und aufzubewahren. Bei Inhalationsstudien entspricht die Liste der aufzubewahrenden und zu untersuchenden Gewebe des Atemtrakts den Empfehlungen von Kapitel B.8 dieses Anhangs (9) und Kapitel B.29 dieses Anhangs (10). Was andere Organe/Gewebe betrifft, so sollten (zusätzlich zu den speziell konservierten Geweben aus dem Atemtrakt) die in der Liste für die orale Verabreichung genannten Organe untersucht werden.

*Histopathologie*

50. Es gibt Leitlinien für bewährte Praktiken bei der Durchführung toxikologischer Pathologiestudien (40). Histopathologisch zu untersuchen sind mindestens

— alle Gewebe der Tiere aus der Hochdosisgruppe und der Kontrollgruppe,

— alle Gewebe von während der Studie gestorbenen oder getöteten Tieren,

— alle Gewebe mit makroskopischen Abnormitäten,

— Zielgewebe oder Gewebe, die in der Hochdosisgruppe behandlungsbedingte Veränderungen aufwiesen, von allen Tieren in allen anderen Dosisgruppen,

— bei paarigen Organen, z. B. Nieren, Nebennieren, sind beide Organe zu untersuchen.

BEOBACHTUNGEN (Kanzerogenitätsphase)

51. Alle Tiere sind in der Regel jeden Tag morgens und abends, auch am Wochenende und an Feiertagen, auf Anzeichen von Morbidität und Mortalität hin zu untersuchen. Darüber hinaus sind die Tiere einmal am Tag auf spezielle Anzeichen von toxikologischer Bedeutung zu untersuchen. Bei Studien mit Sondenapplikation sind die Tiere unmittelbar nach der Dosierung zu kontrollieren. Die Entwicklung von Tumoren ist mit besonderer Aufmerksamkeit zu verfolgen; dabei sind der Zeitpunkt der Entstehung, die Lokalisierung, das Ausmaß, das Erscheinungsbild und die Progression jedes deutlich sichtbaren oder fühlbaren Tumors festzuhalten.

52. Alle Tiere sollten zu Beginn der Behandlung, in den ersten 13 Wochen mindestens einmal wöchentlich und danach mindestens monatlich gewogen werden. Futteraufnahme und Futtereffizienz sollten in den ersten 13 Wochen mindestens wöchentlich und danach mindestens monatlich bestimmt werden. Die Trinkwasseraufnahme sollte in den ersten 13 Wochen mindestens wöchentlich und danach mindestens monatlich gemessen werden, wenn die Prüfsubstanz mit dem Trinkwasser verabreicht wird. Bei Studien, in denen das Trinkverhalten der Tiere verändert ist, sollte auch die Trinkwasseraufnahme gemessen werden.

▼M4

*Hämatologie, klinische Biochemie und sonstige Messungen*

53. Um möglichst viele Informationen aus der Studie zu gewinnen, insbesondere in Bezug auf die Wirkungsweise der Prüfsubstanz, können nach Ermessen des Studienleiters Blutproben für hämatologische und klinisch-biochemische Untersuchungen genommen werden. Urinuntersuchungen können ebenfalls angezeigt sein. Daten über die Tiere, die in der normalerweise 12 Monate dauernden chronischen Toxizitätsphase der Studie (Nummer 34) verwendet wurden, liefern Informationen über diese Parameter. Weitere Hinweise zum Nutzen dieser Probenahmen im Rahmen einer Kanzerogenitätsprüfung sind im Guidance Document No. 116 (7) zu finden. Wenn Blutproben genommen werden, sollten sie am Ende des Prüfzeitraums kurz vor der Tötung oder als Teil des Tötungsvorgangs genommen werden. Sie müssen unter Anästhesie an einer benannten Stelle, z. B. durch Herzpunktion oder aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen werden. Es können auch Blutausstriche zur Untersuchung angefertigt werden, insbesondere wenn das Knochenmark das Zielorgan zu sein scheint. Der Nutzen dieser Untersuchung von Blutausstrichen in der Kanzerogenitätsphase für die Einschätzung des karzinogenen/onkogenen Potenzials ist jedoch fraglich (38).

PATHOLOGIE

*Makroskopische Untersuchung*

54. Alle an der Studie beteiligten Tiere, ausgenommen Sentineltiere und andere Satellitentiere (siehe Nummer 20), müssen einer vollständigen, eingehenden makroskopischen Untersuchung unterzogen werden, die die sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel-, Brust- und Bauchhöhlen und ihres Inhalts umfasst. Sentineltiere und andere Satellitentiere können nach Ermessen des Studienleiters von Fall zu Fall seziert werden. Organgewichte werden bei einer Prüfung auf Kanzerogenität normalerweise nicht erfasst, da der Nutzen dieser Daten durch geriatrische Veränderungen und in späteren Stadien durch die Entstehung von Tumoren beeinträchtigt wird. Sie können jedoch für die Durchführung einer Weight-of-Evidence-Bewertung und insbesondere für Fragen der Wirkungsweise von Bedeutung sein. Wenn sie Teil einer Satellitenstudie sind, sollten sie nicht später als ein Jahr nach Studienbeginn erfasst werden.

55. Die folgenden Gewebe sind in dem für die betreffende Gewebeart und die vorgesehene anschließende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmittel aufzubewahren (40) (Gewebe in eckigen Klammern sind fakultativ):

| | | | |
|---|---|---|---|
| alle makro-skopischen Veränderungen | Herz | Pankreas | Magen (Vormagen, Drüsenmagen) |
| Nebennieren | Ileum | Nebenschilddrüse | [Zähne] |
| Aorta | Jejunum | periphere Nerven | Hoden |
| Gehirn (mit Schnitten von Cerebrum, Cerebellum und Medulla/Pons) | Nieren | Hypophyse | Thymus |
| Caecum | Tränendrüse (exorbital) | Prostata | Schilddrüse |
| Zervix | Leber | Rectum | [Zunge] |
| Koagulationsdrüse | Lunge | Speicheldrüse | Trachea |
| Kolon | Lymphknoten (sowohl oberflächliche als auch tiefe) | Samenbläschen | Harnblase |

▼M4

| | | | |
|---|---|---|---|
| Duodenum | Brustdrüse (obligatorisch für Weibchen und, falls bei der Sektion erkennbar, für Männchen) | Skelettmuskel | Uterus (mit Zervix) |
| Nebenhoden | [obere Atemwege, einschließlich Nase, Nasenmuscheln und Nasennebenhöhlen] | Haut | [Harnleiter] |
| Auge (mit Netzhaut) | Speiseröhre | Rückenmark (auf 3 Ebenen: zervical, mittlerer Thoraxbereich und lumbar) | [Harnröhre] |
| [Femur mit Gelenk] | [Riechkolben] | Milz | Vagina |
| Gallenblase (bei anderen Arten als Ratten) | Ovarien | [Brustbein] | Knochenmarkschnitt und/oder ein frisches Knochenmark-Aspirat |
| Hardersche Drüse | | | |

Bei paarigen Organen, z. B. Nieren, Nebennieren, sind beide Organe aufzubewahren. Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebeuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz als mögliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden. In Studien mit dermaler Applikation sind die in der Liste für orale Verabreichung aufgeführten Organe zu untersuchen; außerdem sind Proben der Haut an der Applikationsstelle zu nehmen und aufzubewahren. Bei Inhalationsstudien entspricht die Liste der aufzubewahrenden und zu untersuchenden Gewebe des Atemtrakts den Empfehlungen von Kapitel B.8 dieses Anhangs (8) und Kapitel B.29 dieses Anhangs (9). Was andere Organe/Gewebe betrifft, so sollten (zusätzlich zu den speziell konservierten Geweben aus dem Atemtrakt) die in der Liste für die orale Verabreichung genannten Organe untersucht werden.

*Histopathologie*

56. Es gibt Leitlinien für bewährte Praktiken bei der Durchführung toxikologischer Pathologiestudien (40). Zu untersuchen sind mindestens folgende Gewebe:

— alle Gewebe der Tiere aus der Hochdosisgruppe und der Kontrollgruppe,

— alle Gewebe von während der Studie gestorbenen oder getöteten Tieren,

— alle Gewebe mit makroskopischen Abnormitäten einschließlich Tumoren,

— wenn behandlungsbedingte histopathologische Veränderungen in der Hochdosisgruppe festgestellt werden, sind diese Gewebe von allen Tieren in allen anderen Dosisgruppen zu untersuchen,

— bei paarigen Organen, z. B. Nieren, Nebennieren, sind beide Organe zu untersuchen.

▼M4

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG (KANZEROGENITÄT UND CHRONISCHE TOXIZITÄT)

**Daten**

57. Für alle bestimmten Parameter sollen Daten zu den einzelnen Tieren angegeben werden. Darüber hinaus sollten alle Daten in Form einer Tabelle zusammengefasst werden, aus der für jede Prüfgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Zahl der Tiere bei Beginn der Prüfung und die Zahl der während der Prüfung tot aufgefundenen oder aus Tierschutzgründen getöteten Tiere, ferner der Zeitpunkt des Todes oder der Tötung, die Zahl der Tiere, die Toxizitätszeichen aufweisen, eine Beschreibung der beobachteten Toxizitätszeichen, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen erstmalig aufgetreten sind, ihrer Dauer und ihres Schweregrads, die Zahl der Tiere mit Läsionen, die Art der Läsionen und der Prozentsatz der von jeder Läsion betroffenen Tiere. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (für kontinuierliche Versuchsdaten) von Tieren, die toxische Wirkungen oder Läsionen aufweisen, sind zusätzlich zum Schweregrad der Läsionen in Übersichtstabellen anzugeben.

58. Historische Kontrolldaten können die Auswertung der Studienergebnisse erleichtern, z. B. wenn die Daten der gleichzeitigen Kontrollen erheblich von neueren Daten von Kontrolltieren aus derselben Versuchseinrichtung abweichen. Wenn historische Kontrolldaten bewertet werden, sollten sie von demselben Labor stammen, sich auf Tiere desselben Alters und Stamms beziehen und höchstens fünf Jahre vor der fraglichen Studie erhoben worden sein.

59. Wenn möglich, sind die numerischen Daten durch eine geeignete allgemein annehmbare statistische Methode auszuwerten. Die statistischen Methoden und die zu analysierenden Daten sind bei der Planung der Studie festzulegen (Nummer 9). Diese Auswahl sollte es ermöglichen, erforderlichenfalls Anpassungen je nach Überlebensrate vorzunehmen.

60. Der Prüfbericht sollte folgende Informationen enthalten:

*Prüfsubstanz:*

— physikalische Beschaffenheit, Reinheit und physikalisch-chemische Eigenschaften,

— Daten zur Identifikation,

— Herkunft des Stoffs,

— Chargennummer,

— Bescheinigung der chemischen Analyse.

*Vehikel (wenn verwendet):*

— Begründung der Wahl des Vehikel, sofern anders als Wasser.

*Versuchstiere:*

— Art/Stamm und Begründung für die getroffene Wahl,

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere bei Versuchsbeginn,

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.,

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn.

▼**M4**

*Prüfbedingungen:*

— Begründung für Verabreichungsweg und Festlegung der Dosis,

— gegebenenfalls die statistischen Methoden zur Analyse der Daten,

— Angaben zur Formulierung der Prüfsubstanz/Futterzubereitung,

— Analysedaten über die erreichte Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung,

— Verabreichungsweg und Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz,

— bei Inhalationsstudien: „Nose-only"- oder Ganzkörperexposition,

— tatsächliche Dosen (mg/kg Körpergewicht/Tag) und, sofern zutreffend, Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Trinkwasser (mg/kg oder ppm) in die tatsächliche Dosis,

— Angaben zu Futter- und Wasserqualität.

*Ergebnisse (zusammenfassende Übersichtstabellen und Daten für die einzelnen Tiere):*

*Allgemeines*

— Überlebensdaten,

— Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts,

— Futteraufnahme, gegebenenfalls Berechnungen der Futtereffizienz und der Wasseraufnahme, falls erfasst,

— toxikokinetische Daten, falls vorhanden,

— Ophthalmoskopie (falls zutreffend),

— Hämatologie (falls zutreffend),

— klinische Chemie (falls zutreffend).

*Klinische Befunde*

— Toxizitätszeichen,

— Inzidenz (und, falls bewertet, Schweregrad) jeder Abnormität,

— Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (sowohl vorübergehend als auch dauerhaft).

*Nekropsiedaten*

— terminales Körpergewicht,

— Organgewichte (und gegebenenfalls Verhältnis Organ-/Körpergewicht),

— Sektionsbefunde; Inzidenz und Schweregrad von Abnormitäten.

*Histopathologie*

— nicht neoplastische histopathologische Befunde,

— neoplastische histopathologische Befunde,

▼M4

— Korrelation zwischen makroskopischen und mikroskopischen Befunden,

— ausführliche Beschreibung aller behandlungsbedingten histopathologischen Befunde mit Einstufung des Schweregrads,

— Bericht über eventuelle Peer-Reviews von Objektträgern.

*Statistische Auswertung der Ergebnisse, soweit zutreffend*

*Diskussion der Ergebnisse einschließlich*

— Diskussion von Modellierungsansätzen

— Dosis-Wirkungs-Beziehungen

— historische Kontrolldaten

— Prüfung aller Informationen über die Wirkungsweise

— Bestimmung von BMD, NOAEL oder LOAEL

— Relevanz für Menschen

*Schlussfolgerungen*

*LITERATUR:*

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

2. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3. Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208

4. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

5. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

6. Kapitel B.27 dieses Anhangs, Prüfung auf sub-chronische orale Toxizität — 90-Tage-Toxizitätsstudie mit wiederholter Verabreichung an Nicht-Nagetieren

7. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, abrufbar auf der öffentlichen OECD-Website für Prüfrichtlinien: www.oecd.org/env/testguidelines.

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9. Kapitel B.8 dieses Anhangs. Prüfung auf subakute Toxizität nach Inhalation — 28-Tage-Test.

10. Kapitel B.29 dieses Anhangs, Prüfung auf sub-chronische Toxizität nach Inhalation — 90-Tage-Test.

11. Kapitel B.9 dieses Anhangs, Toxizität nach 28-tägiger Gabe (dermal).

▼M4

12. Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

13. Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

14. Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

15. Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

16. Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

17. Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

18. Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al*. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

19. Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

20. OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

21. OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

22. Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729-837.

23. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington DC.

24. Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

25. Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279-284.

26. Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼M4

27. Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (ABl. L 276 vom 20.10.2010, S. 33).

28. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

30. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31. Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23.

32. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

33. Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rates. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

34. Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

35. Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

36. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rates and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

37. Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

38. Weingand K, Brown G, Hall R *et al*. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

39. EMEA-Dokument (Entwurf) „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity“ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

40. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

*Anlage 1*

DEFINITION

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

▼B

B.34. **PRÜFUNG AUF REPRODUKTIONSTOXIZITÄT WÄHREND EINER GENERATION**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird mehreren Gruppen männlicher und weiblicher Versuchstiere in abgestuften Dosierungen verabreicht. Den männlichen Tieren wird die Prüfsubstanz während der Wachstumsperiode und mindestens eines vollständigen Spermatogenesezyklus (etwa 56 Tage bei der Maus und 70 Tage bei der Ratte) verabreicht, um auf diese Weise negative Wirkungen der Prüfsubstanz auf die Spermiogenese feststellen zu können.

Den weiblichen Tieren der P-Generation wird die Prüfsubstanz während mindestens zweier vollständiger Östruszyklen verabreicht, um negative Wirkungen der Prüfsubstanz auf den Östrus beurteilen zu können, Anschließend werden die Tiere verpaart. Während der Paarungszeit wird die Prüfsubstanz beiden Geschlechtern verabreicht, anschließend nur den weiblichen Tieren während der Gravidität und der Laktation. Bei inhalativer Exposition sind Änderungen der Methode erforderlich.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

*Vorbereitungen*

Vor Testbeginn werden gesunde, junge, ausgewachsene Tiere randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Tiere werden dann für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen vor dem Test unter versuchsnahen Unterbringungs- und Fütterungsbedingungen gehalten. Es wird empfohlen, die Prüfsubstanz mit dem Futter oder im Trinkwasser zu verabreichen. Andere Verabreichungswege sind ebenfalls zulässig. Während des eigentlichen Versuchsteils muss allen Tieren die Prüfsubstanz auf dem gleichen Wege appliziert werden. Wird ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz zur Erleichterung der Verabreichung benutzt, muss deren nichttoxische Wirkung gesichert sein. Die Verabreichung erfolgt an 7 Tagen pro Woche.

▼B

Versuchstiere

*Auswahl der Tierarten*

Bevorzugte Tierarten sind Ratte oder Maus. Tierstämme mit geringer Fruchtbarkeit sind auszuschließen und nur gesunde Tiere, die bisher noch keinen Versuchen unterzogen worden waren, einzusetzen. Die Versuchstiere sind nach Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Gewicht und/oder Alter auszuwählen.

Um die Fruchtbarkeit ausreichend beurteilen zu können, müssen sowohl männliche als auch weibliche Tiere untersucht werden. Alle Versuchs- und Kontrolltiere müssen vor Verabreichung der Prüfsubstanz vom Muttertier entwöhnt sein.

*Anzahl und Geschlecht*

Jede Versuchstier- und Kontrollgruppe muss so viele Tiere enthalten, dass darin etwa 20 trächtige Weibchen kurz vor bzw. zum Zeitpunkt der Geburt enthalten sind.

Auf diese Weise soll gewährleistet werden, dass genügend Graviditäten und Nachkommen erzeugt werden, um eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungspotenzials der Prüfsubstanz für die Fertilität, Schwangerschaft, Verhalten des Muttertiers in der P-Generation sowie Säugen, Wachstum und Entwicklung der $F_1$-Generation von der Konzeption bis zum Absetzen vom Muttertier vornehmen zu können.

Versuchsbedingungen

Futter und Wasser ist den Tieren *ad libitum* bereitzustellen. Kurz vor dem Geburtstermin werden die trächtigen Weibchen einzeln in Geburtskäfigen untergebracht, die gegebenenfalls mit Nestmaterial ausgestattet sind.

Dosierungen

Es sollten mindestens drei Behandlungs- und eine Kontrollgruppe eingesetzt werden. Wird ein Vehikel benutzt, muss die Kontrollgruppe das in der höchsten Dosierung applizierte Volumen erhalten. Wird die Nahrungsaufnahme oder -verwertung durch die Prüfsubstanz beeinträchtigt, könnte der Einsatz einer entsprechend restriktiv gefütterten Kontrollgruppe sinnvoll sein. Sofern die physikalisch-chemischen Eigenschaften bzw. die biologische Wirkungsweise der Prüfsubstanz es zulassen, sollte die höchste Dosierung möglichst so gewählt werden, dass bei den Elterntieren (P) zwar Vergiftungserscheinungen auftreten, aber keine Mortalität verursacht wird. Im günstigsten Falle sollte(n) die mittlere(n) Dosierung(en) minimale prüfsubstanzbedingte Vergiftungserscheinungen bewirken, die niedrigste Dosierung hingegen weder bei den Elterntieren noch bei den Nachkommen feststellbare negative Auswirkungen zeigen. Wird die Prüfsubstanz per Magensonde oder in Form von Kapseln verabreicht, muss die jeweilige Dosis entsprechend dem Körpergewicht unter Berücksichtigung der Veränderungen des Körpergewichts wöchentlich angepasst werden. Während der Gravidität kann die Dosierung bei den weiblichen Tieren entweder aufgrund des Körpergewichts am Tag 0 oder am Tag 6 der Gravidität bestimmt werden.

Limit-Test

Wenn im Falle einer Prüfsubstanz mit geringer Toxizität eine Dosierung von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht nachweisbar keinen Einfluss auf die Reproduktionsfähigkeit hat, sind Untersuchungen mit anderen Dosierungen nicht notwendig. Konnten in einer Vorstudie mit hoher Dosierung, die eindeutige, prüfsubstanzbedingte Vergiftungserscheinungen beim Muttertier hervorrief, keinerlei nachteilige Auswirkungen auf die Fertilität festgestellt werden, können auch hier Untersuchungen mit anderen Dosierungen als nicht notwendig erachtet werden.

▼B

*Versuchsdurchführung*

Vorgehensweise

Die tägliche Verabreichung der Prüfsubstanz an die männlichen Elterntiere (P) sollte nach der Entwöhnung vom Muttertier und einer mindestens 5-tägigen Akklimatisierung im Alter von 5 bis 9 Wochen beginnen. Bei den Ratten wird die Applikation für weitere 10 Wochen (bei Mäusen 8 Wochen) bis zur Paarungszeit fortgesetzt. Die männlichen Tiere werden nach der Verpaarung entweder getötet und untersucht oder weiterhin bei der Versuchsdiät belassen, um gegebenenfalls zur Erzeugung eines zweiten Wurfs zur Verfügung zu stehen, sollten jedoch noch vor Abschluss der Studie getötet und untersucht werden. Die weiblichen Elterntiere (P) erhalten die Prüfsubstanz nach einer mindestens 5-tägigen Akklimatisierung bis mindestens 2 Wochen vor der Paarung. Die Behandlung der P-Weibchen wird während der 3-wöchigen Paarungszeit, der gesamten Gravidität bis zur Entwöhnung der $F_1$-Nachkommen fortgesetzt. Eine Änderung des Verabreichungsschemas kann aufgrund sonstiger verfügbarer Informationen über die Prüfsubstanz, z. B. über Stoffwechselmechanismen oder Bioakkumulation, erforderlich sein.

Verpaarung

Bei Reproduktionsstudien über die toxikologischen Auswirkungen kann die Verpaarung entweder im Verhältnis 1:1 (ein männliches und ein weibliche Tier) oder 1:2 (ein männliches und zwei weibliche Tiere) erfolgen.

Bei der 1:1-Verpaarung wird das weibliche mit einem männlichen Tier bis zum Eintritt der Gravidität oder bis nach Ablauf von 3 Wochen zusammengebracht. Jeden Morgen werden die weiblichen Tiere auf Sperma oder Vaginalpfröpfe untersucht. Als Tag 0 der Gravidität gilt der Tag, an dem Vaginalpfröpfe oder Sperma festgestellt werden konnten.

Bei erfolgloser Verpaarung sollten die entsprechenden Tiere zur Beurteilung der Ursache für die Unfruchtbarkeit untersucht werden.

Dies bedeutet gegebenenfalls eine weitere Verpaarung mit einem Tier mit nachgewiesener Fruchtbarkeit, die mikroskopische Untersuchung der Reproduktionsorgane und die Untersuchung der Östruszyklen oder der Spermiogenese.

Wurfgrößen

Die während der Fruchtbarkeitsstudie behandelten Tiere können ihre Jungen auf natürlichem Wege zur Welt bringen und ohne jeden äußeren Eingriff bis zum Zeitpunkt der Entwöhnung großziehen.

Soll die Anzahl der geworfenen Jungtiere reduziert werden, wird folgendes Verfahren vorgeschlagen: Zwischen Tag 1 und Tag 4 nach der Geburt werden aus jedem Wurf so viele Jungtiere ausgesondert, bis möglichst 4 männliche und 4 weibliche Tiere verbleiben.

Ist es aufgrund der Geschlechter-Verteilung nicht möglich, in jedem Wurf 4 männliche und 4 weibliche Junge zu belassen, so ist eine partielle Anpassung zulässig (z. B. 5 männliche und 3 weibliche Tiere). Für Würfe mit weniger als 8 Jungtieren gilt diese Anpassung nicht.

▼B

Beobachtungen

Während der gesamten Testperiode werden die Tiere mindestens einmal täglich beobachtet. Auffallende Verhaltensstörungen, Anzeichen einer schweren oder verzögerten Geburt, alle Vergiftungserscheinungen, einschließlich Mortalität, sind aufzuzeichnen. Vor und während der Paarungszeit ist die Futteraufnahme wöchentlich zu bestimmen. Wahlweise kann die tägliche Bestimmung der Nahrungsaufnahme auch während der Gravidität durchgeführt werden. Nach der Geburt und während der Stillperiode soll die Bestimmung der Nahrungsaufnahme (und der Wasseraufnahme, sofern die Prüfsubstanz mit dem Trinkwasser verabreicht wird) am gleichen Tag wie das Wiegen der Jungtiere erfolgen. Männliche und weibliche Tiere der P-Generation müssen am ersten Tag der Behandlung und anschließend in wöchentlichen Abständen gewogen werden. Die Beobachtungen sind für jedes erwachsene Tier einzeln aufzuzeichnen.

Die Trächtigkeitsdauer wird vom Tag 0 der Gravidität an berechnet. Jeder Wurf ist so bald wie möglich nach der Geburt zu untersuchen, um die Anzahl und das Geschlecht der Nachkommen, Lebend- und Totgeburten und auffallende Anomalien feststellen zu können.

Tote und am Tag 4 getötete Jungtiere müssen asserviert und auf mögliche Fehlbildungen untersucht werden. Die lebend geborenen Jungtiere werden gezählt und der gesamte Wurf und die einzelnen Tiere am Morgen nach der Geburt, an den Tagen 4 und 7 und anschließend in wöchentlichen Abständen gewogen.

Bei den Muttertieren oder den Nachkommen zu beobachtende körperliche Anomalien oder Verhaltensstörungen müssen aufgezeichnet werden.

Pathologie

Autopsie

Die Tiere der P-Generation sollten zum Zeitpunkt der Tötung bzw. bei Eintritt des Todes während der Studie makroskopisch auf Anomalien oder pathologische Veränderungen, unter besonderer Berücksichtigung der Fortpflanzungsorgane, untersucht werden. Auch tote oder kranke Jungtiere sind auf Fehlbildungen zu untersuchen.

Histopathologie

Eierstöcke, Uterus, Zervix, Vagina, Hoden, Nebenhoden, Samenbläschen, Prostata, Koagulationsdrüse, Hirnanhangdrüse und Zielorgan(e) aller Tiere der P-Generation werden für die mikroskopische Untersuchung asserviert. Sollten diese Organe bisher nicht im Rahmen einer sonstigen Studie mit Mehrfachdosierung untersucht worden sein, ist in allen Versuchstiergruppen mit hoher Dosierung, bei den Kontrolltieren und den während der Studie gestorbenen Tieren — sofern durchführbar — eine mikroskopische Untersuchung vorzunehmen.

Alle Organe, die bei dieser Untersuchung pathologische Veränderungen aufweisen, müssen anschließend ebenfalls bei allen übrigen Tieren der P-Generation untersucht werden. In diesem Fall sollte eine mikroskopische Untersuchung aller Gewebe mit auffallenden pathologischen Veränderungen erfolgen.

Wie bereits im Abschnitt über die Verpaarung vorgeschlagen, sollten die Fortpflanzungsorgane aller Tiere bei Verdacht auf Unfruchtbarkeit mikroskopischen Untersuchungen unterzogen werden.

▼B

2. **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Anzahl der fruchtbaren männlichen Tiere, die Anzahl der trächtigen Weibchen, die jeweilige Art der Veränderungen und der Prozentsatz der Tiere mit der jeweiligen Veränderung.

Sofern möglich, sollten die numerischen Ergebnisse anhand eines geeigneten statistischen Verfahrens bewertet werden. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— verwendete Tierarten/Tierstamm;

— Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Fruchtbarkeit, Trächtigkeit und Lebensfähigkeit;

— Zeitpunkt des Todes während der Studie bzw. Angabe, ob die Tiere bis zur geplanten Tötung bzw. zum Abschluss der Studie überlebten;

— Tabelle mit Gewichtsangaben für jeden Wurf, das durchschnittliche Gewicht der Jungtiere sowie das individuelle Gewicht der Jungtiere bei Abschluss der Studie;

— toxische oder andere Auswirkungen auf die Reproduktion, die Nachkommenschaft, das postnatale Wachstum usw.;

— Zeitpunkt der Beobachtung der jeweiligen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;

— Körpergewicht der Tiere der P-Generation;

— Sektionsbefunde;

— detaillierte Beschreibung der mikroskopischen Befunde;

— statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;

— Diskussion der Ergebnisse;

— Bewertung der Ergebnisse.

3.2. INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung zu Teil B.

▼B

B.35. **ZWEIGENERATIONENSTUDIE ZUR PRÜFUNG AUF REPRODUKTIONSTOXIZITAT**

1. **METHODE**

Diese Methode entspricht der OECD TG 416 (2001).

1.1. EINLEITUNG

Diese Methode zur Prüfung der Reproduktion über zwei Generationen ist darauf ausgerichtet, allgemeine Informationen über die Auswirkungen einer Prüfsubstanz auf die Integrität und die Leistung des männlichen und weiblichen Fortpflanzungssystems zu liefern; dazu gehören die Funktion der Keimdrüsen, der Östruszyklus, das Paarungsverhalten, die Empfängnis, die Gravidität, der Geburtsvorgang, das Säugen und Entwöhnen sowie das Wachstum und die Entwicklung der Nachkommen. Die Studie kann außerdem Informationen über die Auswirkungen der Prüfsubstanz auf die neonatale Morbidität und Mortalität sowie vorläufige Daten über die prä- und postnatale Entwicklungstoxizität erbringen und als Richtschnur für Anschlussprüfungen dienen. Neben der Untersuchung von Wachstum und Entwicklung der $F_1$-Generation soll diese Prüfmethode des Weiteren dazu dienen, Integrität und Leistung des männlichen und weiblichen Fortpflanzungssystems sowie Wachstum und Entwicklung der $F_2$-Generation zu beurteilen. Im Hinblick auf weitere Informationen über die Entwicklungstoxizität oder Funktionsdefizite können zusätzliche Studiensegmente in dieses Protokoll aufgenommen werden, wobei gegebenenfalls die Methode für die Prüfung auf pränatale Entwicklungstoxizität und/oder die Studie auf Entwicklungsneurotoxizität heranzuziehen sind; diese Endpunkte könnten aber auch mit Hilfe geeigneter Prüfmethoden in gesonderten Studien untersucht werden.

1.2. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Prüfsubstanz wird verschiedenen Gruppen von männlichen und weiblichen Tieren in abgestuften Dosen verabreicht. Männchen der P-Generation (Elterntiere) erhalten die Dosen während des Wachstums und mindestens über einen vollständigen Spermatogenesezyklus hinweg (etwa 56 Tage bei der Maus und 70 Tage bei der Ratte), um etwaige schädigende Wirkungen auf die Spermatogenese zu klären. Auswirkungen auf die Samenzellen werden anhand verschiedener Spermienparameter (beispielsweise Spermienmorphologie und -motilität) und anhand von Gewebepräparaten mit ausführlicher histopathologischer Untersuchung bestimmt. Liegen Daten zur Spermatogenese aus einer früheren Studie mit wiederholter Verabreichung von hinreichender Dauer vor, beispielsweise einer 90-Tage-Studie, müssen Männchen der P-Generation nicht mit in die Beurteilung einbezogen werden. Empfohlen wird allerdings, Proben oder digitale Aufzeichnungen von Spermien der P-Generation für eine eventuelle spätere Beurteilung aufzuheben. Weibchen der P-Generation erhalten die Dosen während des Wachstums und über mehrere vollständige Östruszyklen hinweg, um eventuelle schädigende Auswirkungen auf den normalen Östruszyklus durch die Prüfsubstanz festzustellen. Die Prüfsubstanz wird den Elterntieren (P) während der Verpaarung, während der daraus entstehenden Trächtigkeit und während der Entwöhnung ihrer $F_1$-Nachkommen verabreicht. Nach der Entwöhnung wird die Substanz den $F_1$-Nachkommen während des Wachstums bis zum Erwachsenenalter, während der Paarung und Produktion einer $F_2$-Generation weiter verabreicht, bis die $F_2$-Generation entwöhnt wird.

Bei allen Tieren erfolgen klinische Beobachtungen und pathologische Untersuchungen auf Anzeichen für Toxizität; einen besonderen Schwerpunkt bilden dabei die Auswirkungen auf die Integrität und Leistung des männlichen und weiblichen Fortpflanzungssystems sowie auf das Wachstum und die Entwicklung der Nachkommen.

▼B

1.3. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.3.1. Auswahl der Versuchstierarien

Die bevorzugte Versuchstierart ist die Ratte. Die Verwendung anderer Tierarten ist zu begründen und entsprechende Änderungen sind vorzunehmen. Stämme mit geringer Fruchtbarkeit oder bekannter hoher Häufigkeit von Entwicklungsdefekten sind nicht zu verwenden. Bei Beginn der Studie sollen die Gewichtsunterschiede der Tiere möglichst gering sein und 20 % des geschlechtsspezifischen mittleren Gewichts nicht überschreiten.

1.3.2. **Haltung und Fütterung**

Die Temperatur im Versuchstierraum soll 22 °C (± 3 °C) betragen. Obwohl die relative Luftfeuchte wenigstens 30 % betragen sollte und außer bei Reinigung des Raumes 70 % nicht übersteigen sollte, sollte sie vorzugsweise bei 50 bis 60 % liegen. Es ist eine künstliche Beleuchtung vorzusehen, wobei ein Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden eingehalten werden soll. Zur Fütterung kann übliches Laborfutter verwendet werden, und Trinkwasser kann in unbeschränkter Menge gegeben werden. Die Auswahl des Futters kann dadurch beeinflusst werden, dass eine geeignete Beimischung einer Prüfsubstanz gewährleistet werden muss, wenn diese über das Futter verabreicht wird.

Die Tiere können einzeln oder in Käfigen mit kleinen Gruppen von Tieren gleichen Geschlechts untergebracht werden. Die Verpaarung erfolgt in für diesen Zweck geeigneten Käfigen. Wenn Anhaltungspunkte für die stattgefundene Kopulation vorliegen, sind die verpaarten Weibchen jeweils einzeln in Geburtskäfigen oder speziellen Käfigen für Muttertiere zu halten. Ratten können nach der Verpaarung auch in kleinen Gruppen gehalten und einen oder zwei Tage vor der Geburt getrennt werden. Kurz vor der Geburt soll verpaarten Tieren geeignetes und definiertes Material für den Nestbau zur Verfügung gestellt werden.

1.3.3. **Vorbereitung der Tiere**

Zu verwenden sind junge gesunde Tiere, die mindestens 5 Tage an die Laborbedingungen gewöhnt und zuvor nicht für Experimente verwendet wurden. Art, Stamm, Herkunft, Geschlecht, Gewicht und/oder Alter der Versuchstiere sind anzugeben. Geschwisterbeziehungen unter den Tieren sollten bekannt sein, so dass eine Verpaarung von Geschwistern vermieden wird. Die Tiere sind den Kontroll- und Behandlungsgruppen nach dem Zufallsprinzip zuzuordnen (empfohlen wird eine körpergewichtsabhängige Gruppenbildung). Die Käfige sind so aufzustellen, dass etwaige durch den Standort bedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Jedes Versuchstier erhält zur sicheren Identifizierung eine eigene Nummer. Für die P-Generation erfolgt dies, bevor mit der Behandlung begonnen wird. Für die $F_1$-Generation wird dies nach Absetzen der Tiere, die für die Verpaarung ausgewählt wurden, durchgeführt. Für alle ausgewählten $F_1$-Tiere sind Aufzeichnungen, aus denen der Wurf, dem sie entstammen, hervorgeht, zu führen. Darüber hinaus wird eine einzelne Kennzeichnung der Jungen so bald wie möglich nach der Geburt empfohlen, wenn ein Wiegen der einzelnen Jungen oder Funktionsprüfungen erwogen werden.

Die Elterntiere (P) sind bei Beginn der Verabreichung etwa 5 bis 9 Wochen alt. Die Tiere aller Testgruppen sollen so weit wie möglich gleiches Gewicht und Alter aufweisen.

▼B

1.4. VERFAHREN

1.4.1. **Anzahl und Geschlecht der Versuchstiere**

Jede Prüf- und Kontrollgruppe soll eine ausreichende Anzahl von Tieren umfassen, damit möglichst nicht weniger als 20 trächtige Weibchen, die gebären oder kurz davor stehen, vorhanden sind. Bei Substanzen, die unerwünschte behandlungsbedingte Wirkungen hervorrufen (z. B. Sterilität, übermäßige Toxizität bei hoher Dosis), ist dies unter Umständen nicht möglich. Es sollen genügend trächtige Weibchen vorhanden sein, so dass eine aussagekräftige Bewertung des Potenzials der Substanz, Fruchtbarkeit, Trächtigkeit, Verhalten des Muttertiers und Säugen, Wachstum und Entwicklung der $F_1$-Generation von der Empfängnis bis zur Reife sowie die Entwicklung von deren Nachkommen ($F_2$) bis zur Entwöhnung zu beeinträchtigen, sichergestellt ist. Wird die gewünschte Zahl an trächtigen Tieren (d. h. 20) nicht erreicht, bedeutet dies daher nicht notwendigerweise, dass die Studie invalide ist, dies ist jeweils von Fall zu Fall zu beurteilen.

1.4.2. **Zubereitung der Dosen**

Empfohlen wird, die Prüfsubstanz oral (im Futter oder Trinkwasser oder über eine Magensonde) zu verabreichen, sofern nicht eine andere Form (z. B. Auftragen auf die Haut oder Einatmen) für besser geeignet gehalten wird.

Bei Bedarf wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässerigen Lösung/Suspension, dann eine Lösung/Emulsion in Öl (z. B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in einem anderen Vehikel in Betracht zu ziehen. Bei anderen Vehikeln als Wasser müssen dessen toxische Merkmale bekannt sein. Die Stabilität der Prüfsubstanz in dem Vehikel ist zu bestimmen.

1.4.3. **Dosierung**

Mindestens drei Dosen und eine entsprechende Kontrolle werden verwendet. Soweit keine Beschränkungen aufgrund der physikalisch-chemischen Beschaffenheit oder der biologischen Wirkungen der Prüfsubstanz bestehen, ist die höchste Dosierung so zu wählen, dass zwar Toxizität, jedoch nicht Tod oder schweres Leiden der Tiere herbeigeführt wird. Im Falle unerwarteter Mortalität wären Studien mit einer Mortalitätsrate von weniger als etwa 10 % bei den Elterntieren (P) normalerweise immer noch annehmbar. Eine absteigende Folge von Dosierungen sollte so ausgewählt werden, dass die Dosisabhängigkeit der Reaktion und ein NOAEL belegt werden können. Dosisintervalle mit dem Faktor 2 bis 4 haben sich für die Festlegung absteigender Dosierungen häufig als optimal erwiesen. Gegenüber der Verwendung sehr großer Intervalle (z. B. mehr als Faktor 10) ist die Hinzunahme einer vierten Testgruppe häufig vorzuziehen. Bei Fütterungsstudien soll der Konzentrationsunterschied nicht mehr als das Dreifache betragen. Bei der Auswahl der Dosen sind vorliegende Toxizitätsdaten, insbesondere Ergebnisse aus Studien mit wiederholter Dosierung, zu berücksichtigen. Vorhandene Informationen über den Stoffwechsel und die Kinetik der Prüfsubstanz oder verwandter Stoffe sind ebenfalls in Betracht zu ziehen. Diese Angaben helfen außerdem, die Angemessenheit des Dosierungsplans nachzuweisen. Die Kontrollgruppe ist eine unbehandelte Gruppe oder eine Vehikelkontrollgruppe, sofern ein Vehikel zur Verabreichung der Prüfsubstanz verwendet wird. Abgesehen von

▼B

der Behandlung mit der Prüfsubstanz sollen die Tiere der Kontrollgruppe genauso wie die Tiere in den Testgruppen behandelt werden. Wird ein Vehikel verwendet, erhält die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten verwendeten Volumen. Wird eine Prüfsubstanz zusammen mit dem Futter verabreicht und führt dies zu einer geringeren Futteraufnahme oder -Verwertung, ist unter Umständen eine paarweise Fütterungskontrolle erforderlich. Alternativ können Daten aus kontrollierten Studien zur Bewertung der Auswirkungen einer verringerten Futteraufnahme auf Reproduktionsparameter anstelle einer gleichzeitigen paarweisen Fütterungskontrolle herangezogen werden.

Zu berücksichtigen sind die folgenden Merkmale des Vehikels und anderer Zusätze: Auswirkungen auf die Absorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Retention der Prüfsubstanz; Auswirkungen auf die chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, die deren toxische Eigenschaften verändern können; ferner Auswirkungen auf die Futter- oder Wasseraufnahme oder den Ernährungszustand der Versuchstiere.

1.4.4. **Limit-Test**

Ergibt eine orale Prüfung mit einer einzigen Dosierung von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht/Tag oder bei einer Verabreichung in Futter oder Trinkwasser ein gleichwertiger prozentualer Anteil im Futter oder Trinkwasser nach den für diese Studie beschriebenen Verfahren keine wahrnehmbare Toxizität bei den Elterntieren oder deren Nachkommen und ist aufgrund von Daten struktur- und/oder stoffwechselverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit verschiedenen Dosisabstufungen gegebenenfalls verzichtet werden. Der Limit-Test kann angebracht sein, es sei denn, die Exposition beim Menschen lässt die Prüfung bei einer höheren oralen Dosis angezeigt erscheinen. Bei anderen Arten der Verabreichung, wie z. B. Inhalation oder dermale Applikation, kann die maximal erreichbare Expositionsdosis in vielen Fällen gegebenenfalls durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, wie beispielsweise die Löslichkeit, vorbestimmt und somit limitiert sein.

1.4.5. **Verabreichung der Dosen**

Den Tieren ist die Prüfsubstanz an 7 Tagen pro Woche zu verabreichen. Die Prüfsubstanz soll möglichst oral (im Futter oder Trinkwasser oder über eine Magensonde) verabreicht werden. Die Verwendung einer anderen Form der Verabreichung ist zu begründen und es sind unter Umständen entsprechende Änderungen vorzunehmen. Allen Tieren sind die Dosen während des entsprechenden Versuchszeitraums nach derselben Methode zu verabreichen. Wird die Prüfsubstanz über eine Sonde verabreicht, ist eine Magensonde zu verwenden. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier jeweils verabreicht wird, soll 1 ml/100 g Körpergewicht (maximal 0,4 ml/100 g Körpergewicht bei Maisöl) nicht übersteigen; bei wässrigen Lösungen können 2 ml/100 g Körpergewicht verabreicht werden. Außer für reizende oder ätzende Stoffe, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine Verschlimmerung der Wirkungen hervorrufen, soll die Veränderlichkeit des Prüfvolumens durch die Dosierung möglichst gering gehalten werden, um ein konstantes Volumen bei allen Dosen zu gewährleisten. Bei Studien, bei denen die Prüfsubstanz über eine Magensonde verabreicht wird, erhalten die Jungtiere die Prüfsubstanz im Normalfall nur indirekt über die Milch, bis für sie die direkte Verabreichung bei ihrer Entwöhnung beginnt. Bei Studien, bei denen die Prüfsubstanz über das Futter oder Trinkwasser verabreicht wird, erhalten die Jungtiere außerdem die Prüfsubstanz direkt, wenn sie selbst in der letzten Woche der Laktationszeit zu fressen beginnen.

▼B

Für mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichte Stoffe ist unbedingt sicherzustellen, dass die Mengen der jeweiligen Prüfsubstanz den normalen Nahrungs- oder Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht wird, kann entweder auf eine konstante Futterkonzentration (ppm) oder eine konstante Dosierung im Verhältnis zum Körpergewicht des Versuchstiers geachtet werden. Welche Methode angewandt wird, ist zu spezifizieren. Eine mit einer Magensonde verabreichte Dosis soll jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und mindestens einmal pro Woche so angepasst werden, dass eine konstante Dosis im Verhältnis zum Körpergewicht aufrechterhalten wird. Bei einer Anpassung der über die Magensonde verabreichten Dosis an das Gewicht sind Informationen über die Verteilung in der Plazenta zu berücksichtigen.

1.4.6. **Versuchsablauf**

Die Verabreichung der täglichen Dosis an die Männchen und Weibchen der Elterngeneration (P) beginnt, wenn diese zwischen 5 und 9 Wochen alt sind. Die Verabreichung der täglichen Dosis an die Männchen und Weibchen der $F_1$-Generation beginnt bei der Entwöhnung; nicht vergessen werden sollte, dass bei einer Verabreichung der Prüfsubstanz über das Futter oder Trinkwasser $F_1$-Nachkommen möglicherweise der Prüfsubstanz bereits während der Säugezeit unmittelbar ausgesetzt werden. Bei beiden Geschlechtern (P- und $F_1$-Generation) wird die Verabreichung über einen Zeitraum von mindestens 10 Wochen vor der Paarungszeit durchgeführt. Die Verabreichung wird bei beiden Geschlechtern während der 2-wöchigen Paarungszeit fortgesetzt. Die Männchen sind, wenn sie für die Beurteilung der Auswirkungen auf die Fortpflanzung nicht mehr benötigt werden, auf humane Weise zu töten und zu untersuchen. Bei den Weibchen der Elterngeneration (P) wird die Verabreichung während der Gravidität bis zur Entwöhnung der $F_1$-Nachkommen fortgesetzt. Gegebenenfalls sind Änderungen am Dosierungsplan vorzunehmen aufgrund von vorliegenden Informationen über die Prüfsubstanz, wie z. B. vorhandene Toxizitätsdaten, Induktion des Stoffwechsels oder Bioakkumulation. Die Dosis für einzelne Tiere beruht normalerweise auf deren zuletzt bestimmtem Körpergewicht. Vorsicht ist allerdings bei der Anpassung der Dosis im letzten Trimester der Gravidität geboten.

Die Behandlung der Männchen und Weibchen der P- und $F_1$-Generation wird fortgesetzt, bis die Tiere getötet werden. Alle ausgewachsenen Männchen und Weibchen der P- und $F_1$-Generation werden auf humane Weise getötet, wenn sie zur Beurteilung der Auswirkungen auf die Fortpflanzung nicht mehr benötigt werden. $F_1$-Nachkommen, die nicht für die Verpaarung ausgewählt werden, und alle $F_2$-Nachkommen werden nach der Entwöhnung auf humane Weise getötet.

1.4.7. **Verpaarung**

1.4.7.1. *Verpaarung der Elterngeneration (P)*

Für die Verpaarung wird jedes Weibchen zusammen mit einem Männchen, das die gleiche Dosierung erhallen hat (1:1-Paarung), zusammengebracht, bis es zur Kopulation kommt beziehungsweise ein Zeitraum von 2 Wochen verstrichen ist. Die Weibchen werden täglich auf vorhandene Spermien oder Vaginalpfropfen hin untersucht. Der Tag 0 der Trächtigkeit ist definiert als der Tag, an dem ein Vaginalpfropf oder Spermien gefunden werden. Bei einer erfolglosen Verpaarung kann gegebenenfalls die erneute Verpaarung von Weibchen mit bewährten Männchen der gleichen Gruppe erwogen werden. Miteinander verpaarte Paare sind in den Daten eindeutig zu kennzeichnen. Eine Verpaarung von Geschwistern ist zu vermeiden.

▼B

1.4.7.2. *Verpaarung der $F_1$-Generation*

Bei der Verpaarung der $F_1$-Nachkommen werden mindestens ein Männchen und ein Weibchen zum Zeitpunkt der Entwöhnung aus jedem Wurf zur Verpaarung mit Jungtieren, die die gleiche Dosis erhalten haben, jedoch aus einem anderen Wurf stammen, für die Zeugung der $F_2$-Generation ausgewählt. Die Auswahl der Jungtiere aus jedem Wurf erfolgt nach dem Zufallsprinzip, wenn sich die Tiere eines Wurfs in Bezug auf Körpergewicht oder Erscheinungsbild nicht nennenswert voneinander unterscheiden. Werden solche Unterschiede beobachtet, sind aus jedem Wurf die besten Vertreter auszuwählen. Pragmatisch erfolgt dies am besten anhand des Körpergewichts, unter Umständen kann jedoch das Erscheinungsbild besser geeignet sein. Eine Verpaarung der $F_1$-Nachkommen soll erst dann erfolgen, wenn sie die volle Geschlechtsreife erreicht haben.

Bei Paaren ohne Nachkommen ist, soweit möglich, die Ursache der Unfruchtbarkeit zu ermitteln. Dazu können Verfahren wie zusätzliche Verpaarungsgelegenheiten mit anderen bewährten Vater- oder Muttertieren, eine mikroskopische Untersuchung der Fortpflanzungsorgane und die Untersuchung der Östruszyklen oder der Spermatogenese eingesetzt werden.

1.4.7.3. *Zweite Verpaarung*

Unter gewissen Umständen wie z. B. bei behandlungsbedingten Veränderungen an der Wurfgröße oder der Beobachtung unklarer Auswirkungen bei der ersten Verpaarung wird eine zweite Verpaarung der ausgewachsenen P- oder $F_1$-Tiere empfohlen, um einen zweiten Wurf zu produzieren. Empfohlen wird, Weibchen oder Männchen, die keinen Wurf gezeugt haben, mit Tieren des jeweils anderen Geschlechts erneut zu verpaaren, die ihre Fortpflanzungsfähigkeit unter Beweis gestellt haben. Wird ein zweiter Wurf in einer Generation für notwendig befunden, sind die Tiere etwa eine Woche nach der Entwöhnung des letzten Wurfs erneut zu verpaaren.

1.4.7.4. *Wurfgröße*

Man lässt die Tiere normal werfen und ihre Nachkommen bis zur Entwöhnung aufziehen. Wahlweise kann eine Standardisierung der Wurfgrößen vorgenommen werden. Sofern standardisiert wird, ist das dabei verwendete Verfahren im Einzelnen zu beschreiben.

1.5. BEOBACHTUNGEN

1.5.1. **Klinische Beobachtungen**

Allgemeine klinische Beobachtungen sind einmal täglich vorzunehmen; wird die Dosis über die Magensonde verabreicht, ist der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis bei der Wahl des Zeitpunkts zu berücksichtigen. Änderungen am Verhalten, Anzeichen für eine schwere oder langwierige Geburt sowie alle Anzeichen für Toxizität sind zu protokollieren. Darüber hinaus ist jedes Tier mindestens einmal pro Woche gründlicher zu untersuchen, dies kann beim Wiegen des Tiers erfolgen. Zweimal pro Tag, am Wochenende einmal täglich, soweit zutreffend, sind alle Tiere auf Morbidität und Mortalität zu überprüfen.

▼B

1.5.2. **Körpergewicht und Futter-/Wasseraufnahme der Elterntiere**

Die Elterntiere (P und $F_1$) werden am ersten Tag der Verabreichung und anschließend mindestens einmal pro Woche gewogen. Weibchen der Elterngeneration (P und $F_1$) werden mindestens an den Graviditätstagen 0, 7, 14 und 20 oder 21 und während der Laktationszeit an den gleichen Tagen wie die Würfe sowie an dem Tag gewogen, an dem die Tiere getötet werden. Diese Beobachtungen sind für jedes ausgewachsene Tier einzeln zu protokollieren. In der Zeit vor der Verpaarung und während der Gravidität ist die Futteraufnahme mindestens einmal pro Woche zu messen. Sofern die Prüfsubstanz im Wasser verabreicht wird, ist die Wasseraufnahme zumindest einmal pro Woche zu messen.

1.5.3 **Östruszyklus**

Bei den Weibchen der Generation P und $F_1$ werden Länge und normaler Verlauf des Östruszyklus mit Hilfe von Vaginalabstrichen vor der Verpaarung und optional während der Verpaarung beurteilt, bis Anhaltspunkte für eine stattgefundene Besamung gefunden werden. Vaginal-/Zervixzellen sind vorsichtig zu entnehmen, damit die Schleimhäute nicht gestört und dadurch anschließend eine Scheinträchtigkeit hervorgerufen wird (1).

1.5.4. **Spermienparameter**

Bei allen Männchen der P- und $F_1$-Generation wird das Gewicht von Hoden und Nebenhoden protokolliert, jeweils ein Organ wird für eine histopathologische Untersuchung konserviert (siehe 1.5.7 und 1.5.8.1). Von einer Teilmenge von mindestens 10 Männchen jeder Gruppe von P- und $F_1$-Männchen werden die übrigen Hoden und Nebenhoden zur Zählung der homogenisierungsresistenten Spermatiden beziehungsweise der Spermien aus den Samenspeichern im Nebenhodenschwanz verwendet. Bei derselben Teilmenge von Männchen werden Spermien aus dem Nebenhodenschwanz oder dem Samenleiter zur Beurteilung von Spermienmotilität und -morphologie entnommen. Werden behandlungsbedingte Auswirkungen beobachtet oder liegen Anhaltspunkte für mögliche Auswirkungen auf die Spermatogenese aus anderen Studien vor, ist die Spermienuntersuchung an allen Männchen jeder Dosisgruppe durchzuführen; andernfalls kann die Zählung auf die P- und $F_1$-Männchen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit der hohen Prüfsubstanzdosis beschränkt werden.

Die Gesamtanzahl an homogenisierungsresistenten Hodenspermatiden und Spermien aus dem Nebenhodenschwanz ist zu bestimmen (2) (3). Samenspeicher im Nebenhodenschwanz lassen sich anhand von Spermienkonzentration und -volumen in der Suspension, die zur Vervollständigung der qualitativen Beurteilungen verwendet wird, und der Anzahl der Spermien ableiten, die bei der anschließenden Zerkleinerung und/oder Homogenisierung des restlichen Nebenhodenschwanzgewebes gewonnen werden. Die Zählung ist an der ausgewählten Teilmenge von Männchen aus allen Dosisgruppen unmittelbar nach der Tötung der Tiere vorzunehmen, ausgenommen es werden Videobilder oder digitale Aufzeichnungen gemacht oder die Proben werden eingefroren und später analysiert. Unter diesen Umständen können die Kontrolltiere und die Gruppe mit der hohen Dosierung zuerst analysiert werden. Werden keine behandlungsbedingten Auswirkungen (z. B. Auswirkungen auf Spermienzahl, -motilität oder -morphologie) festgestellt, brauchen die anderen Dosierungsgruppen nicht untersucht zu werden. Sind bei der Gruppe mit der hohen Dosierung behandlungsbedingte Auswirkungen festzustellen, dann sind auch die Gruppen mit den niedrigen Dosierungen zu beurteilen.

▼B

Die Motilität von Nebenhodenspermien (oder Spermien aus dem Samenleiter) ist unmittelbar nach der Tötung zu beurteilen oder auf Video aufzunehmen. Bei der Gewinnung der Spermien ist darauf zu achten, dass diese so wenig wie möglich geschädigt werden; für die Motilitätsanalyse sind die Spermien nach anerkannten Verfahren zu verdünnen (4). Der prozentuale Anteil an progressiv motilen Spermien ist subjektiv oder objektiv zu bestimmen. Bei einer computerunterstützten Spermienbewegungsanalyse (5) (6) (7) (8) (9) (10) beruht die Ableitung der progressiven Motilität auf benutzerdefinierten Schwellen für die durchschnittliche Streckengeschwindigkeit und Direktheit oder einem linearen Index. Werden zum Zeitpunkt der Sektion die Proben auf Video (11) aufgenommen oder die Bilder auf andere Weise aufgezeichnet, kann die Analyse der P- und $F_1$-Männchen der Kontrollgruppe und der Gruppe, der die hohe Dosis verabreicht wurde, anschließend vorgenommen werden, es sei denn, behandlungsbedingte Auswirkungen wurden beobachtet; in diesem Fall sind auch die Gruppen mit den niedrigeren Dosierungen zu beurteilen. Liegt kein Video- oder digitales Bildmaterial vor, sind alle Proben aus allen Behandlungsgruppen bei der Sektion zu analysieren.

An einer Probe von Nebenhodenspermien (oder Spermien aus dem Samenleiter) ist eine morphologische Untersuchung durchzuführen. Dabei sind die Spermien (mindestens 200 je Probe) als fixierte Nasspräparate (12) zu untersuchen und als normal oder abnorm zu klassifizieren. Beispiele für morphologische Spermienabnormitäten sind Verschmelzungen, isolierte Köpfe und missgebildete Köpfe und/oder Schwänze. Die Untersuchungen sind an der ausgewählten Teilmenge von Männchen aller Dosisgruppen entweder unmittelbar nach der Tötung der Tiere oder zu einem späteren Zeitpunkt durchzuführen, sofern Videobilder oder digitale Aufzeichnungen vorliegen. Fixierte Abstriche können ebenfalls später ausgewertet werden. Unter diesen Umständen können die Kontrolltiere und die Gruppe mit der hohen Dosierung zuerst analysiert werden. Werden keine behandlungsbedingten Auswirkungen (z. B. Auswirkungen auf die Spermienmorphologie) festgestellt, brauchen die anderen Dosierungsgruppen nicht untersucht zu werden. Sind bei der Gruppe mit der hohen Dosierung behandlungsbedingte Auswirkungen festzustellen, dann sind auch die Gruppen mit den niedrigen Dosierungen zu beurteilen.

Wurden oben genannte Spermienparameter bereits im Rahmen einer systemischen Toxizitätsstudie von einer Dauer von mindestens 90 Tagen untersucht, kann auf eine Wiederholung in der Zweigenerationenstudie verzichtet werden. Empfohlen wird allerdings, Proben oder digitale Aufzeichnungen von Spermien der P-Generation für eine eventuell später erforderliche Beurteilung aufzuheben.

1.5.5. **Nachkommen**

Jeder Wurf ist so bald wie möglich nach der Geburt (Laktationstag 0) zu untersuchen, um Anzahl und Geschlecht der Jungtiere, Tot- und Lebendgeburten sowie eventuell vorhandene makroskopische Anomalien festzustellen. Jungtiere, die am Tag 0 tot aufgefunden werden und noch nicht mazeriert sind, sind möglichst auf Defekte und die Todesursache zu untersuchen und zu konservieren. Lebende Jungtiere sind zu zählen und jeweils einzeln bei der Geburt (Laktationstag 0) oder am Tag 1 und danach regelmäßig z. B. am Laktationstag 4, 7, 14 und 21 zu wiegen. Beobachtete körperliche oder Verhaltensabnormitäten bei den Muttertieren oder Nachkommen sind zu protokollieren.

▼B

Die körperliche Entwicklung der Nachkommen ist in der Hauptsache anhand der Körpergewichtszunahme festzuhalten. Andere körperliche Parameter (z. B. Öffnung von Ohren und Augen, Zahndurchbruch, Haarwachstum) können zwar zusätzliche Informationen bieten, diese Daten sind aber möglichst im Zusammenhang mit Daten zur Geschlechtsreife zu bewerten (z. B. Alter und Körpergewicht zum Zeitpunkt der Vaginalöffnung oder der Balano-Präputial-Separation) (13). Funktionelle Untersuchungen der $F_1$-Nachkommen (z. B. Motorik, Sensorik und Reflexontogenese) vor und/oder nach der Entwöhnung, insbesondere solche, die mit der Geschlechtsreife in Zusammenhang stehen, werden empfohlen, sofern derartige Untersuchungen nicht Bestandteil gesonderter Studien sind. Bei entwöhnten $F_1$-Tieren, die für die Verpaarung ausgewählt wurden, ist das Alter zum Zeitpunkt der Vaginalöffnung und der Präputial-Separation zu bestimmen. Bei $F_2$-Nachkommen ist der Anogenitalabstand am Tag 0 nach der Geburt zu messen, wenn Veränderungen am Verhältnis der Geschlechter in der $F_1$-Generation oder dem Zeitpunkt der Geschlechtsreife aufgetreten sind.

Bei Gruppen, die ansonsten eindeutige Anzeichen für schädigende Auswirkungen aufweisen (z. B. signifikante Verminderung der Gewichtszunahme usw.), kann von funktionellen Beobachtungen Abstand genommen werden. Sofern funktionelle Untersuchungen erfolgen, sind sie nicht an den Jungtieren vorzunehmen, die für die Verpaarung ausgewählt wurden.

1.5.6. **Nekropsie**

Bei der Tötung oder bei vorzeitigem Tod im Verlauf der Studie werden alle Elterntiere (P und $F_1$) und alle Jungtiere mit äußeren Abnormitäten oder klinischen Anzeichen sowie jeweils ein nach dem Zufallsprinzip ausgewähltes Jungtier/Geschlecht/Wurf sowohl aus der $F_1$- als auch aus der $F_2$-Generation makroskopisch auf strukturelle Abnormitäten oder pathologische Veränderungen untersucht. Besondere Beachtung ist dabei den Fortpflanzungsorganen zu schenken. Auf humane Weise getötete moribunde Jungtiere und noch nicht mazerierte tote Jungtiere werden auf mögliche Defekte und/oder die Todesursache untersucht und konserviert.

Die Gebärmutter aller erstgebärenden Weibchen wird auf Vorhandensein und Anzahl von Implantationsstellen in einer Weise untersucht, die keine Auswirkungen auf die histopathologische Bewertung hat.

1.5.7. **Organgewichte**

Bei der Tötung werden das Körpergewicht und das Gewicht der folgenden Organe bei allen P- und $F_1$-Elterntieren bestimmt (paarweise vorhandene Organe sind einzeln zu wiegen):

— Uterus; Ovarien,

— Hoden und Nebenhoden (gesamt und Schwanzteil),

— Prostata,

— Samenbläschen mit Koagulationsdrüsen und deren Flüssigkeiten und Prostata (als eine Einheit),

— Gehirn, Leber, Nieren, Milz, Hypophyse, Schilddrüse und Nebennieren sowie bekannte Zielorgane.

Bei den $F_1$- und $F_2$-Jungtieren, die für die Nekropsie ausgewählt werden, ist das Körpergewicht bei der Tötung zu bestimmen. Das Gewicht folgender Organe ist an je einem Jungtier/Geschlecht/Wurf (siehe 1.5.6) zu bestimmen, das nach dem Zufallsprinzip ausgewählt wurde: Gehirn, Milz und Thymusdrüse.

▼B

Die Ergebnisse der Nekropsie und die Organgewichte sind, sofern möglich, im Zusammenhang mit Beobachtungen aus anderen Studien mit wiederholter Exposition zu bewerten.

1.5.8. **Histopathologische Untersuchungen**

1.5.8.1. *Elterntiere*

Die folgenden Organe und Gewebe von Elterntieren (P und Fl) beziehungsweise repräsentative Proben hiervon sind für die histopathologische Untersuchung zu fixieren und in einem geeigneten Medium aufzubewahren:

— Vagina, Uterus mit Zervix, Ovarien (konserviert in einem geeigneten Fixativ),

— ein Hoden (konserviert in Bouinschem Fixiermittel oder einem vergleichbaren Fixativ), ein Nebenhoden, Samenbläschen, Prostata und Koagulationsdrüse,

— zuvor ermittelte(s) Zielorgan(e) von allen P- und $F_1$-Tieren, die für die Verpaarung ausgewählt wurden.

Eine vollständige histopathologische Untersuchung der oben genannten konservierten Organe und Gewebe ist bei allen P-und $F_1$-Tieren aus der Gruppe mit der hohen Dosis und der Kontrollgruppe durchzuführen, die für die Verpaarung ausgewählt wurden. Die Untersuchung der Ovarien der P-Tiere kann wahlweise durchgeführt werden. Organe, bei denen man behandlungsbedingte Veränderungen feststellt, sind auch bei Tieren aus den Gruppen mit der niedrigen und mittleren Dosis zu untersuchen, um bei der Ermittlung des NOAEL zu helfen. Des weiteren sind die Fortpflanzungsorgane von Tieren mit der niedrigen und der mittleren Dosis, die im Verdacht einer verringerten Fertilität stehen, einer histopathologischen Untersuchung zu unterziehen, beispielsweise die Tiere, die sich nicht gepaart haben, die nicht empfangen oder gezeugt oder gesunde Nachkommen geboren haben oder bei denen die Regelmäßigkeit des Östruszyklus oder die Spermienanzahl, -motilität oder -morphologie beeinträchtigt waren. Alle makroskopischen Läsionen wie Atrophien oder Tumore sind zu untersuchen.

An den Hoden ist eine eingehende histopathologische Untersuchung vorzunehmen (z. B. Verwendung des Bouinschen Fixiermittels, Einbettung in Paraffin und transversale Schnitte von 4 bis 5 μm Dicke), um behandlungsbedingte Auswirkungen wie Retention von Spermatiden, fehlende Keimzellenschichten oder -typen, mehrkernige Riesenzellen oder die Ablösung von spermatogenen Zellen in das Lumen festzustellen (14). Bei der Untersuchung des intakten Nebenhodens sind Kopf, Körper und Schwanz mit einzubeziehen; dies kann durch Beurteilung eines Längsschnitts erfolgen. Der Nebenhoden ist auf die Infiltration mit Leukozyten, Veränderungen in der Prävalenz von Zelltypen, aberrante Zellarten und Phagozytose von Spermien zu untersuchen. Für die Untersuchung der männlichen Fortpflanzungsorgane kann eine PAS- und Hämatoxylinfärbung verwendet werden.

Nach Absetzen der Jungtiere sollte der Eierstock Primordialfollikel und wachsende Follikel sowie die großen Gelbkörper der Laktationsperiode enthalten. Bei der histopathologischen Untersuchung sollte die Abnahme der Primordialfollikel qualitativ erfasst werden. Bei den $F_1$-Weibchen ist eine quantitative Beurteilung der Primordialfollikel vorzunehmen; die Anzahl der Tiere, die Auswahl der Eierstockquerschnitte und die Querschnittprobengröße sollten dabei für das herangezogene Bewertungsverfahren statistisch angemessen sein. Untersucht wird unter anderem die Anzahl der Primordialfollikel, die mit kleinen wachsenden Follikeln zusammengenommen werden können; dabei werden die Eierstöcke von behandelten Tieren und Kontrolltieren miteinander verglichen (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. *Entwöhnte Tiere*

Makroskopisch abnorme Gewebe und Zielorgane von allen Jungtieren mit äußerlich sichtbaren Abnormitäten oder klinischen Anzeichen sowie von je einem nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Jungtier/-Geschlecht/Wurf aus der $F_1$- und der $F_2$-Generation, die nicht für die Paarung ausgewählt wurden, werden für die histopathologische Untersuchung fixiert und in einem geeigneten Medium aufbewahrt. An dem konservierten Gewebe ist eine vollständige histopathologische Untersuchung durchzuführen, wobei besonderes Schwergewicht auf die Fortpflanzungsorgane gelegt wird.

2. **DATEN**

2.1. VERARBEITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten sind jeweils einzeln zu protokollieren und in tabellarischer Form zusammenzufassen; dabei werden für jede Prüfgruppe und für jede Generation die Anzahl der Tiere zu Beginn der Prüfung, die Anzahl der während der Prüfung tot aufgefundenen Tiere beziehungsweise der aus humanen Gründen getöteten Tiere, der jeweilige Zeitpunkt des Todes beziehungsweise der Tötung, die Anzahl der fruchtbaren Tiere, die Anzahl der trächtigen Weibchen, die Anzahl der Tiere mit Anzeichen von Toxizität, eine Beschreibung der beobachteten Anzeichen von Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen eingetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Arten von Beobachtungen an Elterntieren und Nachkommen, die Arten von histopathologischen Veränderungen und alle relevanten Daten zu den Würfen angegeben.

Zur Auswertung der numerischen Ergebnisse wird ein allgemein anerkanntes statistisches Verfahren angewendet; die statistischen Verfahren sind im Rahmen der Studienplanung auszuwählen und zu begründen. Für die Analyse der Daten können Verfahren zur Modellierung der Dosis-Wirkungs-Beziehung hilfreich sein. Der Bericht sollte hinreichende Informationen über das herangezogene Analyseverfahren und das verwendete Computerprogramm beinhalten, so dass ein unabhängiger Überprüfer/Statistiker die Analyse nachbewerten und nachvollziehen kann.

2.2. BEWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Befunde dieser Zweigenerationenstudie zur Reproduktionstoxizität sind im Hinblick auf die beobachteten Wirkungen, einschließlich Nekropsie- und Mikroskopiebefunde, zu bewerten. Die Bewertung beinhaltet den vorhandenen beziehungsweise nicht vorhandenen Zusammenhang zwischen der Prüfsubstanzdosis und vorhandenen beziehungsweise nicht vorhandenen Abnormitäten sowie deren Häufigkeit und Schwere, einschließlich der makroskopischen Läsionen, identifizierten Zielorgane, beeinträchtigten Fertilität, klinischen Abnormitäten, beeinträchtigten Reproduktions- und Wurfleistungen, Körpergewichtsveränderungen, Auswirkungen auf die Mortalität und etwaige sonstige toxische Auswirkungen. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz und Daten zur Toxikokinetik, soweit verfügbar, sind bei der Bewertung der Prüfergebnisse zu berücksichtigen.

Aus einer ordnungsgemäß durchgeführten Prüfung der Reproduktionstoxizität sollte der NOAEL in angemessener Weise abgeschätzt werden können und sollten schädigende Wirkungen auf Reproduktion, Geburtsvorgang, Laktation, postnatale Entwicklung einschließlich Wachstum und Geschlechtsentwicklung klar werden.

▼B

2.3. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Eine Zweigenerationenstudie zur Reproduktionstoxizität liefert Informationen über die Auswirkungen einer wiederholten Exposition gegenüber einem Stoff während aller Phasen des Reproduktionszyklus. Die Studie vermittelt insbesondere Informationen über die Reproduktionsparameter sowie über Entwicklung, Wachstum, Reifung und Überleben der Nachkommen. Die Ergebnisse der Studie sind in Verbindung mit Befunden aus Studien zur subchronischen Toxizität, pränatalen Entwicklungstoxizität und Toxikokinetik sowie anderen vorliegenden Studien zu interpretieren. Die Ergebnisse dieser Studie können bei der Beurteilung der Frage, ob Bedarf an einer weiteren Prüfung einer Chemikalie besteht, herangezogen werden. In gewissem Grad ist auch eine Extrapolation der Studienergebnisse auf den Menschen zulässig. Sie sind am besten für Informationen über NOAEL-Werte und zulässige Expositionen für den Menschen zu verwenden (20) (21) (22) (23).

3. **BERICHTERSTATTUNG**

3.1. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfsubstanz:

— physikalische Beschaffenheit und, soweit relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften,

— Daten zur Identifikation;

— Reinheit.

Vehikel (sofern zutreffend):

— Begründung der Wahl des Vehikels, sofern nicht Wasser verwendet wurde.

**Versuchstiere:**

— Art und Stamm;

— Zahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter, Material für den Nestbau usw.;

— Einzelgewicht der Tiere zu Beginn der Prüfung.

**Prüfbedingungen:**

— Begründung der Wahl der Dosisabstufung;

— nähere Angaben zur Prüfsubstanzformulierung/Futterzubereitung, erreichte Konzentrationen;

— Stabilität und Homogenität der Zubereitung;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;

— Umrechnung der Prüfsubstanzkonzentration in Futter/Trinkwasser (ppm) auf die tatsächliche Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag), soweit zutreffend;

— Einzelheiten zur Futter- und Wasserqualität.

▼B

Ergebnisse:

— Futter- und Wasseraufnahme, soweit vorhanden, Futtereffizienz (Zunahme des Körpergewichts je Gramm aufgenommenes Futter) und Prüfsubstanzaufnahme bei P- und $F_1$-Tieren, ausgenommen in der Zeit der Kohabitation und mindestens des letzten Drittels der Laktationszeit;

— Absorptionsdaten, soweit vorhanden;

— Körpergewichtsdaten für P- und $F_1$-Tiere, die für die Verpaarung ausgewählt wurden;

— Gewichtsdaten für Wurf und Jungtiere;

— Körpergewicht bei Tötung sowie absolute und relative Organgewichtsdaten für die Elterntiere;

— Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);

— Zeitpunkt des Todes im Verlauf der Studie oder Angabe, ob Tiere bis zum Schluss überlebt haben;

— Angaben zur geschlechts- und dosisspezifischen toxischen Reaktion, einschließlich Indizes zu Verpaarung, Fertilität, Gravidität, Geburt, Lebensfähigkeit und Laktation; der Bericht beinhaltet die Zahlen, die bei der Berechnung dieser Indizes verwendet wurden;

— toxische oder sonstige Wirkungen auf Reproduktion, Nachkommen, postnatales Wachstum usw.;

— Sektionsbefunde;

— ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;

— Anzahl der P- und $F_1$-Weibchen mit normalem Zyklusverlauf und Zykluslänge;

— Gesamtanzahl von Spermien im Nebenhodenschwanz, progressiv motile Spermien in Prozent, morphologisch normale Spermien in Prozent und abnorme Spermien in Prozent mit Angabe der jeweiligen festgestellten Abnormität;

— Zeit bis zur Besamung, einschließlich Anzahl Tage bis zur Besamung;

— Graviditätslänge;

— Anzahl Implantationen, Gelbkörper, Wurfgröße;

— Anzahl Lebendgeburten und Postimplantationsverluste;

— Anzahl Jungtiere mit makroskopisch erkennbaren Abnormitäten; sofern ermittelt, ist die Anzahl der Kümmerlinge eines Wurfs anzugeben;

— Daten zu physischen Entwicklungsmerkmalen bei Jungtieren und sonstige Daten zur postnatalen Entwicklung, physische Entwicklungsmerkmale, die erhoben wurden, sind zu begründen;

— Daten zu funktionellen Beobachtungen an Jungtieren und Erwachsenen, soweit machbar;

— statistische Bearbeitung der Ergebnisse, soweit angebracht.

▼B

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen einschließlich NOAEL-Werte für Auswirkungen bei Elterntieren und Nachkommen.

4. **LITERATURHINWEISE**


(l) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al. (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12, 92-108.

(3) Robb, G.W. et al. (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54, 103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al. (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5, 39-44.

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3), 237-244.

(6) Chapin, R.E. et al. (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6, 267-273.

(7) Klinefelter, G.R. et al. (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13, 409-421.

(8) Slott, V.L. et al. (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5, 449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida, 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10, 401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8, 330-337.

(12) Linder, R.E. et al. (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6, 491-505.

(10) (13) Korenbrot, C.C. et al. (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17, 298303.

(14) Russell, L.D. et al. (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al. (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5, 379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

## B.36 **TOXIKOKINETIK**

EINLEITUNG

1. Diese Methode entspricht der OECD TG 417 (2010). Studien zur Untersuchung der Toxikokinetik einer Prüfsubstanz werden durchgeführt, um geeignete Informationen über ihre Resorption, Verteilung, Biotransformation (d. h. ihren Metabolismus) und ihre Ausscheidung zu erhalten, um die Konzentration oder Dosis zur beobachteten Toxizität in Beziehung zu setzen und um mehr Erkenntnisse über den Mechanismus der Toxizität zu gewinnen. Die Toxikokinetik kann zum besseren Verständnis der Toxikologiestudien beitragen, indem gezeigt wird, dass die Versuchstiere der Prüfsubstanz systemisch ausgesetzt werden, und indem die Anteile des Ausgangsstoffs bzw. der Metaboliten im Blutkreislauf bestimmt werden. Die grundlegenden toxikokinetischen Parameter, die mithilfe dieser Studien bestimmt werden, geben auch Aufschluss über das Potenzial der Prüfsubstanz zur Akkumulation in Geweben und/oder Organen und über das Potenzial zur Induktion von Biotransformationsprozessen infolge der Exposition gegen die Prüfsubstanz.

2. Toxikokinetik-Daten können dazu beitragen, die Eignung und Relevanz von Toxizitätsdaten aus Tierversuchen für die Extrapolation von Gefahren für den Menschen und/oder die Risikobewertung zu beurteilen. Darüber hinaus können Toxikokinetikstudien wichtige Informationen für die Bestimmung der Dosisstufen in Toxizitätsstudien (lineare oder nicht-lineare Kinetik), mit dem Verabreichungsweg zusammenhängende Wirkungen und andere Aspekte der Studienauslegung liefern. Bestimmte toxikokinetische Daten können für die Entwicklung von physiologisch-basierten toxikokinetischen Modellen verwendet werden.

3. Daten über Metaboliten und Toxikokinetik sind in vielerlei Hinsicht von Bedeutung. Sie können insbesondere Aufschluss über eventuelle Toxizitäten und Wirkungsweisen sowie deren Zusammenhang mit der Dosisstufe und dem Expositionsweg geben. Ferner können Metabolismusdaten auch hilfreiche Informationen für die Einschätzung der toxikologischen Bedeutung der Exposition gegen exogene Metaboliten der Prüfsubstanz liefern.

4. Angemessene toxikokinetische Daten können die Akzeptanz und Anwendbarkeit von quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen, Read-across- oder Grouping-Ansätzen bei der Sicherheitsbewertung von chemischen Stoffen unterstützen. Kinetikdaten können auch zur Bewertung der toxikologischen Relevanz anderer Studien (z. B. *in vivo/in vitro*) herangezogen werden.

5. Wenn kein anderer Verabreichungsweg genannt wird (siehe insbesondere die Nummern 74-78), wird die Prüfsubstanz bei dieser Prüfmethode oral verabreicht.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

6. Anforderungen und Erfordernisse in Bezug auf die Endpunkte und toxikokinetischen Parameter, die für verschiedene Klassen von Chemikalien (z. B. Pestizide, Biozide, Industriechemikalien) zu bestimmen sind, unterscheiden sich je nach Regulierungssystem. Anders als bei den meisten Prüfmethoden werden bei der vorliegenden Methode Versuche zur Toxikokinetik beschrieben, die mehrere Messungen und Endpunkte erfordern. In Zukunft könnten mehrere neue Prüfmethoden und/oder Leitfäden erarbeitet werden, um jeden Endpunkt einzeln und ausführlicher zu beschreiben. Welche Versuche oder Bewertungen vorgenommen werden, richtet sich bei dieser Prüfmethode nach den Anforderungen und/oder Erfordernissen jedes Regulierungssystems.

▼M4

7. Es gibt zahlreiche Studien, mit denen das toxikokinetische Verhalten einer Prüfsubstanz zu Regulierungszwecken bestimmt werden könnte. Je nach Regulierungsanforderung oder Einzelfall sind jedoch möglicherweise nicht alle diese Studien für die Bewertung einer Prüfsubstanz erforderlich. Bei der Planung von Toxikokinetikstudien ist daher Flexibilität erforderlich, und die Eigenschaften der Prüfsubstanz müssen berücksichtigt werden. In manchen Fällen kann eine bestimmte Reihe von Fragen ausreichen, um die mit der Prüfsubstanz verbundenen Gefahren und Risiken zu ermitteln. Manchmal können die Toxikokinetikdaten bei der Auswertung anderer Toxikologiestudien erfasst werden. In anderen Fällen können je nach Regulierungsanforderungen und/oder wenn bei der Bewertung einer Prüfsubstanz neue Fragen auftreten, zusätzliche und/oder ausführlichere Toxikokinetikstudien erforderlich sein.

8. Um die Qualität der Studie zu verbessern und eine unnötige Verwendung von Versuchstieren zu vermeiden, sollte das Prüflabor vor Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz und relevante Metaboliten und analoge Stoffe berücksichtigen. Dies kann Daten aus anderen relevanten Prüfmethoden umfassen (*In-vivo*-Studien, *In-vitro*-Studien und/oder *In-silico*-Bewertungen) Für die Studienplanung und die Interpretation der Ergebnisse können physikalisch-chemische Eigenschaften wie der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (ausgedrückt als $P_{OW}$), pKa, die Wasserlöslichkeit, der Dampfdruck und das Molekulargewicht eines chemischen Stoffs von Nutzen sein. Diese können mit geeigneten Methoden, die in den betreffenden Prüfmethoden beschrieben sind, bestimmt werden.

GRENZEN

9. Diese Prüfmethode ist weder für besondere Fälle wie trächtige oder säugende Weibchen oder Nachkommen noch für die Bewertung eventueller Rückstände in zur Lebensmittelerzeugung genutzten exponierten Tieren bestimmt. Die Daten aus der Studie gemäß Kapitel B.36 können jedoch als Orientierungshilfe für die Planung spezifischer Studien für derartige Untersuchungen dienen. Diese Prüfmethode ist nicht für die Prüfung von Nanomaterialien bestimmt. Ein Bericht über eine Vorprüfung von OECD-Prüfrichtlinien auf ihre Anwendbarkeit auf Nanomaterialien deutet darauf hin, dass die TG 417 (die dieser Prüfmethode B.36 entspricht) möglicherweise nicht auf Nanomaterialien anwendbar ist (1).

DEFINITIONEN

10. Die für die Zwecke dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe sind in der Anlage definiert.

TIERSCHUTZERWÄGUNGEN

11. Hinweise zur tierschutzgerechten Behandlung von Tieren sind im OECD Guidance Document (GD) 19 (2) zu finden. Es wird empfohlen, das OECD GD 19 für alle in dieser Prüfmethode beschriebenen *In-vivo*- und *In-vitro*-Studien zu beachten.

BESCHREIBUNG DER METHODEN

**Pilotstudien**

12. Es wird empfohlen, die Versuchsparameter für die Toxikokinetikstudien (z. B. Metabolismus, Massenbilanz, Analyseverfahren, Dosisfindung, Ausatmung von $CO_2$ usw.) auf der Grundlage von Pilotstudien festzulegen. Die Bestimmung dieser Parameter erfordert nicht in allen Fällen die Verwendung radiomarkierter Stoffe.

▼M4

**Auswahl von Versuchstieren**

*Tierart*

13. Für die toxikokinetische Prüfung sollte möglichst dieselbe Tierart (und derselbe Stamm) verwendet werden wie für andere toxikologische Prüfungen der betreffenden Prüfsubstanz. Normalerweise sollte dies die Ratte sein, da sie häufig in toxikologischen Studien verwendet wird. Die Verwendung anderer oder zusätzlicher Tierarten kann gerechtfertigt sein, wenn wichtige Toxikologiestudien Hinweise auf starke Toxizität bei diesen Tierarten ergeben oder wenn gezeigt werden kann, dass die Toxizität/Toxikokinetik bei diesen Tierarten von größerer Bedeutung ist, um die Wirkungen bei Menschen einschätzen zu können. Die Wahl der Tierart und des Stamms ist zu begründen.

14. Sofern nichts anderes erwähnt ist, wird bei dieser Prüfmethode die Ratte als Versuchstier verwendet. Bei Verwendung anderer Versuchstierarten müssen bestimmte Aspekte der Methode möglicherweise geändert werden.

*Alter und Stamm*

15. Es sind junge, gesunde, adulte Tiere (zum Zeitpunkt der Dosierung normalerweise 6-12 Wochen alt) zu verwenden (siehe auch Nummern 13 und 14). Die Verwendung anderer als junger, adulter Tiere ist zu begründen. Alle Tiere sollten zu Beginn der Studie annähernd gleich alt sein. Das Gewicht der einzelnen Tiere sollte nicht um mehr als ± 20 % vom mittleren Gewicht der Prüfgruppe abweichen. Im Idealfall sollte derselbe Stamm verwendet werden wie für die Ableitung der toxikologischen Datenbasis für die Prüfsubstanz.

*Zahl und Geschlecht der Versuchstiere*

16. Für jede geprüfte Dosis sollten mindestens vier Tiere eines Geschlechts verwendet werden. Die Wahl des Geschlechts der verwendeten Tiere ist zu begründen. Gibt es Hinweise auf signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede der Toxizität, ist die Verwendung beider Geschlechter (vier männliche und vier weibliche Tiere) in Betracht zu ziehen.

*Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

17. Die Tiere sollten während der Prüfzeitraums im Allgemeinen einzeln untergebracht werden. Eine Unterbringung in Gruppen könnte unter besonderen Bedingungen gerechtfertigt sein. Die Beleuchtung sollte künstlich sein, und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. Die Temperatur im Versuchstierraum sollte 22 °C (± 3 °C) und die relative Luftfeuchtigkeit 30-70 % betragen. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist.

**Prüfsubstanz**

18. Für alle Aspekte der Studie, die mit der Massenbilanz und der Identifizierung von Metaboliten zusammenhängen, sollte eine mit $^{14}C$ radioaktiv markierte Prüfsubstanz verwendet werden. Wenn jedoch nachgewiesen werden kann, dass

— die Massenbilanz und die Identifizierung von Metaboliten mit der nicht markierten Prüfsubstanz hinreichend beurteilt werden kann,

— die analytische Spezifität und Sensitivität der Methode, bei der eine nicht radioaktive Prüfsubstanz verwendet wird, genau so gut oder besser sind als die, die mit einer radiomarkierten Prüfsubstanz erzielt werden könnten,

▼M4

braucht keine radioaktiv markierte Prüfsubstanz verwendet zu werden. Ferner können andere stabile radioaktive Isotope verwendet werden, insbesondere dann, wenn das Element für den toxischen Anteil der Prüfsubstanz verantwortlich oder Teil des toxischen Anteils ist. Die Radiomarkierung sollte möglichst in einen Kernbereich des Moleküls eingebaut werden, der metabolisch stabil ist (d. h. er ist nicht austauschbar, wird nicht metabolisch als $CO_2$ ausgeschieden und wird nicht Teil des Einkohlenstoff-Pools des Organismus). Um die Metabolisierung der Prüfsubstanz zu verfolgen, müssen eventuell mehrere Stellen oder spezifische Regionen des Moleküls markiert werden.

19. Die radiomarkierten und nichtmarkierten Prüfsubstanzen sollten mit geeigneten Methoden analysiert werden, um ihre Reinheit und Identität festzustellen. Die radioaktive Prüfsubstanz sollte die höchste für die spezielle Substanz erreichbare radioaktive Reinheit aufweisen (im Idealfall über 95 %), und es sollte nach Möglichkeit versucht werden, Verunreinigungen von 2 % oder mehr zu identifizieren. Der Reinheitsgrad sowie Identität und Anteil etwaiger Verunreinigungen sind zu dokumentieren. Einzelne Regulierungsprogramme können zusätzliche Orientierungshilfen für die Festlegung und Spezifikation von aus Gemischen bestehenden Prüfsubstanzen sowie Methoden zur Bestimmung der Reinheit vorsehen.

**Wahl der Dosis**

*Pilotstudie*

20. Für die Pilotstudie ist in der Regel eine einzige orale Dosis ausreichend. Die Dosis sollte nicht toxisch, aber dennoch hoch genug sein, dass die Metaboliten in den Exkreta (und gegebenenfalls im Plasma) identifiziert werden können und dass der Zweck der Pilotstudie gemäß Nummer 12 dieser Prüfmethode erfüllt ist.

*Hauptstudien*

21. Bei den Hauptstudien sollten mindestens zwei Dosen verabreicht werden, da die Informationen aus mindestens zwei Dosisgruppen die Dosisfestsetzung in anderen Toxizitätsstudien erleichtern und zur Bewertung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von bereits vorliegenden Toxizitätsversuchen beitragen können.

22. Wenn zwei Dosen verabreicht werden, sollten beide hoch genug sein, dass die Metaboliten in den Exkreta (und gegebenenfalls im Plasma) identifiziert werden können. Für die Festlegung der Dosis sind Informationen aus vorliegenden Toxizitätsdaten heranzuziehen. Liegen keine Informationen vor (z. B. aus Prüfungen auf akute orale Toxizität, die klinische Toxizitätszeichen identifizieren, oder aus Toxizitätsstudien mit wiederholter Verabreichung), so kann für die höhere Dosis ein Wert angesetzt werden, der unter dem Schätzwert für die $LD_{50}$ (orale und dermale Verabreichung) oder die $LC_{50}$ (Inhalation) oder unter dem unteren Wert des geschätzten Bereichs der akuten Toxizität liegt. Die niedrigere Dosis sollte ein Bruchteil der höheren Dosis sein.

23. Wird nur eine Dosisstufe geprüft, sollte die Dosis möglichst hoch genug sein, dass die Metaboliten in den Exkreta (und gegebenenfalls im Plasma) identifiziert werden können; sie sollte allerdings keine offensichtliche Toxizität hervorrufen. Es ist zu begründen, warum keine zweite Dosisstufe verwendet wurde.

24. Wenn die Wirkung der Dosis auf kinetische Prozesse bestimmt werden muss, reichen zwei Dosen möglicherweise nicht aus; mindestens eine Dosis sollte hoch genug sein, um diese Prozesse zu sättigen. Ist die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) zwischen zwei in der Hauptstudie verwendeten Dosisstufen nicht linear, so kann daraus geschlossen werden, dass zwischen diesen beiden Dosisstufen die Sättigung eines oder mehrerer der kinetischen Prozesse stattfindet.

▼M4

25. Bei schwach toxischen Prüfsubstanzen ist eine Höchstdosis von 1 000 mg/kg Körpergewicht (orale und dermale Verabreichung) zu verwenden (bei Verabreichung durch Inhalation siehe Kapitel B.2 dieses Anhangs; diese Dosis sollte normalerweise nicht über 2 mg/l liegen). Je nach Regulierungsanforderungen können mit den chemischen Eigenschaften des Stoffs zusammenhängende Gründe eine höhere Dosis erfordern. Die Dosiswahl ist stets zu begründen.

26. Für die Bestimmung des Akkumulations- und/oder Persistenzpotenzials können Daten über die Toxikokinetik und die Gewebeverteilung auf der Grundlage einer Einzeldosis ausreichen. Unter bestimmten Umständen kann jedoch eine mehrmalige Verabreichung erforderlich sein, i) um das Akkumulations- und/oder Persistenzpotenzial oder Veränderungen der Toxikokinetik (z. B. Enzyminduktion und -hemmung) genauer zu untersuchen oder ii) um Regulierungsanforderungen zu erfüllen. In Studien mit mehrmaliger Dosierung ist die Verabreichung niedriger Dosen zwar im Allgemeinen ausreichend, aber unter bestimmten Umständen kann auch die mehrmalige Verabreichung hoher Dosen notwendig sein (siehe auch Nummer 57).

**Verabreichung der Prüfsubstanz**

27. Die Prüfsubstanz sollte homogen in demselben Vehikel gelöst oder suspendiert werden, das für die anderen mit dieser Prüfsubstanz durchgeführten Toxizitätsstudien mit oraler Gabe über eine Schlundsonde verwendet wurde, wenn diese Informationen vorliegen. Die Wahl des Vehikels ist zu begründen. Die Wahl des Vehikels und des Dosierungsvolumens sollten bei der Planung der Studie berücksichtigt werden. Die übliche Verabreichungsmethode ist die Schlundsonde. In bestimmten Fällen kann jedoch die Verabreichung in einer Gelatinekapsel oder als Futterbeimischung von Vorteil sein (beides ist zu begründen). Die jedem Versuchstier verabreichte tatsächliche Dosis ist zu überprüfen.

28. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier auf einmal oral über eine Schlundsonde verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers, der Art des Vehikels und einer etwaigen Futterkarenz vor der Verabreichung der Prüfsubstanz ab. Die Verabreichung oder Einschränkung von Futter vor der Dosierung ist zu begründen. Sowohl bei wässrigen als auch bei nichtwässrigen Vehikeln ist das Volumen so gering wie möglich zu halten. Bei Nagetieren sollte das Dosisvolumen normalerweise 10 ml/kg Körpergewicht nicht übersteigen. Bei Vehikeln für lipophilere Prüfsubstanzen können Volumina ab 4 ml/kg Körpergewicht verwendet werden. Bei mehrmaliger Dosierung, wenn täglicher Futterentzug kontraindiziert wäre, sind geringere Dosisvolumen zu verwenden (z. B. 2-4 ml/kg Körpergewicht). Soweit möglich, sollten Dosisvolumen verwendet werden, die mit denen im Einklang stehen, die in anderen Studien mit oraler Gabe einer Prüfsubstanz über eine Schlundsonde verabreicht wurden.

29. Die Prüfsubstanz kann intravenös (IV) verabreicht und im Blut und/oder in den Exkreta gemessen werden, um die Bioverfügbarkeit oder die relative orale Resorption zu bestimmen. Bei dieser Art von Studie wird eine Einzeldosis der Prüfsubstanz (die normalerweise der unteren oralen Dosis entspricht, diese aber nicht übersteigt — siehe Dosiswahl) unter Verwendung eines geeigneten Vehikels verabreicht. Diese Dosis wird mindestens vier Tieren des geeigneten Geschlechts (falls gerechtfertigt, können beide Geschlechter verwendet werden — siehe Nummer 16) in einem geeigneten Volumen (z. B. 1 ml/kg Körpergewicht) an der gewählten Verabreichungsstelle verabreicht. Für die intravenöse Verabreichung muss die Prüfsubstanz vollständig in der Dosiszubereitung aufgelöst oder suspendiert sein. Das Vehikel für die intravenöse Verabreichung sollte die Integrität der Blutzellen oder die Durchblutung nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfsubstanz infundiert wird, ist die Infusionsgeschwindigkeit zu protokollieren; sie sollte für alle Tiere gleich sein, vorausgesetzt, es wird eine Infusionspumpe verwendet. Beim Legen einer Kanüle in die Vena jugularis (zur Verabreichung der

▼M4

Prüfsubstanz und/oder zur Blutabnahme) oder bei Verwendung der Arteria femoralis für die Verabreichung sollten die Tiere narkotisiert werden. Die Wahl der Anästhesieart muss wohl überlegt sein, da sie Auswirkungen auf die Toxikokinetik haben kann. Vor Injektion der Prüfsubstanz mit dem Vehikel müssen sich die Tiere ausreichend von der Anästhesie erholen können.

30. Für bestimmte Prüfsubstanzen können je nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften und der voraussichtlichen Verwendung durch Menschen oder die Exposition von Menschen auch andere Verabreichungswege wie die Verabreichung über die Haut oder durch Inhalation (siehe Nummern 74-78) angebracht sein.

**Messungen**

*Massenbilanz*

31. Die Massenbilanz wird aufgestellt durch Addition des prozentualen Anteils der verabreichten (radioaktiven) Dosis, die in Urin, Fäzes und ausgeatmeter Luft ausgeschieden wurde, und des in Geweben, Tierkörper und Käfigreinigungsrückständen (siehe Nummer 46) vorliegenden prozentualen Anteils. Im Allgemeinen gilt eine Gesamtwiederfindungsrate im Bereich von > 90 % der verabreichten Prüfsubstanz (Radioaktivität) als ausreichend.

*Resorption*

32. Eine erste Schätzung der Resorption ergibt sich, wenn man den Prozentsatz der Dosis im Magen-Darm-Trakt und/oder in den Fäzes aus der Bestimmung der Massenbilanz ausschließt. Für die Berechnung der prozentualen Resorption siehe Nummer 33. Für die Untersuchung der Exkreta siehe Nummern 44-49. Wenn das genaue Ausmaß der Resorption nach oraler Gabe nicht auf der Grundlage der Massenbilanz festgestellt werden kann (z. B. wenn die Fäzes mehr als 20 % der verabreichten Dosis enthalten), könnten weitere Untersuchungen erforderlich sein. Hierbei kann es sich handeln 1) um die orale Verabreichung einer Prüfsubstanz und ihre Messung in der Gallenflüssigkeit oder 2) um die orale und intravenöse Verabreichung einer Prüfsubstanz und die Messung der Nettomenge der Substanz im Urin, in der ausgeatmeten Luft und im Körper bei beiden Verabreichungswegen. In beiden Fällen wird die Radioaktivitätsmessung als Ersatzmethode für die chemisch-spezifische Analyse der Prüfsubstanz und ihrer Metaboliten durchgeführt.

33. Zur Prüfung der biliären Ausscheidung wird die Prüfsubstanz normalerweise oral verabreicht. In dieser Studie sind Kanülen in die Gallengänge von mindestens vier Tieren des geeigneten Geschlechts (oder beider Geschlechter, falls gerechtfertigt) zu legen, und es ist eine Einzeldosis der Prüfsubstanz zu verabreichen. Nach Verabreichung der Prüfsubstanz ist die Ausscheidung der Radioaktivität/Prüfsubstanz in der Gallenflüssigkeit so lange zu überwachen, wie erforderlich ist, um den Prozentsatz der über diesen Weg ausgeschiedenen Dosis zu bestimmen; mit diesem Wert kann mithilfe nachstehender Formel unmittelbar das Ausmaß der oralen Resorption berechnet werden:

$$\text{Prozentuale Resorption} = \begin{array}{l}(\text{Menge in Gallenflüssigkeit} + \text{Urin} + \\ \text{ausgeatmeter Luft} + \text{Tierkörper ohne Inhalt des} \\ \text{Magen} - \text{Darm} - \text{Trakts}) / \text{verabreichte Menge} \times 100\end{array}$$

34. Bei bestimmten Klassen von Prüfsubstanzen kann eine direkte Sekretion der resorbierten Dosis durch die Darmmembranen erfolgen. In diesen Fällen gilt die Messung der prozentualen Dosis in den Fäzes nach einer oralen Dosis im kanülierten Gallengang der Ratte nicht als repräsentativ für die nicht resorbierte Dosis. Für Fälle, in denen von einer intestinalen Sekretion ausgegangen wird, wird empfohlen, den Prozentsatz der resorbierten Dosis auf die Resorption zu stützen, die aus einem Vergleich der Ausscheidung nach oraler und nach intravenöser Verabreichung (intakte Ratte oder Ratte mit Gallengangkanülierung) berechnet wird (siehe Nummer 35). Wenn die intestinale Sekretion quantifiziert werden muss, wird auch empfohlen, die Exkretion bei der Ratte mit Gallengangkanülierung nach IV-Verabreichung der Dosis zu messen.

▼M4

*Bioverfügbarkeit*

35. Die Bioverfügbarkeit kann wie unter den Nummern 50, 51 und 52 beschrieben, aufgrund der Plasma-/Blutkinetik der oralen und intravenösen Gruppen durch spezifische chemische Analyse der Prüfsubstanz und/oder des/der relevanten Metaboliten bestimmt werden, d. h. es ist keine radiomarkierte Prüfsubstanz erforderlich. Die Bioverfügbarkeit (F) der Prüfsubstanz oder des/der relevanten Metaboliten kann dann wie folgt berechnet werden:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dosis_V/Dosis_{exp})$$

Dabei ist AUC die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve und exp der Verabreichungsweg (oral, dermal oder Inhalation).

36. Für die Bewertung der Risiken in Bezug auf systemische Wirkungen wird im Allgemeinen die Bioverfügbarkeit der toxischen Komponente gegenüber der prozentualen Resorption bevorzugt, um die systemischen Konzentrationen aus Tierstudien mit analogen Biomonitoring-Daten aus Studien über die Exposition von Arbeitnehmern zu vergleichen. Die Situation kann allerdings komplizierter werden, wenn die Dosen im nicht linearen Bereich liegen. Daher ist es wichtig, dass die toxikokinetische Prüfung Dosen im linearen Bereich bestimmt.

*Gewebeverteilung*

37. Kenntnisse über die Verteilung einer Prüfsubstanz und/oder ihrer Metaboliten im Gewebe sind wichtig für die Identifizierung der Zielgewebe, für das Verständnis der zugrunde liegenden Toxizitätsmechanismen und für die Einschätzung des Akkumulations- und Persistenzpotenzials der Prüfsubstanz und ihrer Metaboliten. Der Prozentsatz der (radioaktiven) Gesamtdosis in den Geweben und im restlichen Tierkörper wird mindestens am Ende des Ausscheidungsversuchs gemessen (z. B. normalerweise sieben Tage nach der Dosierung oder weniger je nach spezifischem Verhalten der Prüfsubstanz). Wird am Ende der Studie keine Prüfsubstanz in den Geweben gefunden (z. B. weil die Prüfsubstanz wegen einer kurzen Halbwertzeit vor Ende der Studie eliminiert worden sein könnte), ist darauf zu achten, dass die Daten nicht falsch interpretiert werden. In diesem Fall ist die Gewebeverteilung zum Zeitpunkt der maximalen Plasma-/Blutkonzentration ($T_{max}$) der Prüfsubstanz (und/oder Metaboliten) oder der maximalen Urinausscheidungsrate zu untersuchen (siehe Nummer 38). Darüber hinaus können Gewebeentnahmen zu zusätzlichen Zeitpunkten erforderlich sein, um die Gewebeverteilung der Prüfsubstanz und/oder ihrer Metaboliten zu bestimmen, (gegebenenfalls) die Zeitabhängigkeit zu beurteilen und die Aufstellung der Massenbilanz zu erleichtern und/oder wenn eine zuständige Behörde sie vorschreibt. Zu den zu entnehmenden Geweben gehören u. a. Leber, Fett, Magen-Darm-Trakt, Nieren, Milz, Vollblut, der restliche Tierkörper, Zielorgangewebe und sonstige Gewebe (z. B. Schilddrüse, Erythrozyten, Fortpflanzungsorgane, Haut, Augen (insbesondere bei pigmentierten Tieren)), die für die toxikologische Bewertung der Prüfsubstanz potenziell von Bedeutung sind. Die Analyse zusätzlicher Gewebe zu denselben Zeitpunkten ist in Betracht zu ziehen, um die Nutzung der Tiere zu maximieren und falls bei subchronischen oder chronischen Toxizitätsstudien Zielorgantoxizität festgestellt wird. Die Konzentration (radioaktiver) Rückstände und die Gewebe/Plasma-Verhältnisse (Gewebe/Blut-Verhältnisse) sollten ebenfalls angegeben werden.

38. Eine zuständige Behörde kann auch die Bewertung der Gewebeverteilung zu weiteren Zeitpunkten wie dem Zeitpunkt der maximalen Plasma-/Blutkonzentration (z. B. $T_{max}$) oder der maximalen Urinausscheidungsrate, die in kinetischen Studien zu Plasma/Blut oder Ausscheidungen bestimmt wurde, benötigen oder vorschreiben. Diese Informationen können hilfreich sein, um die Toxizität und das Akkumulations- und Persistenzpotenzial der Prüfsubstanz und ihrer Metaboliten zu verstehen. Die Wahl der Proben ist zu begründen. Die zu analysierenden Proben sollten im Allgemeinen dieselben sein wie unter Nummer 37.

▼M4

39. Für die Gewebeverteilungsstudien kann die Radioaktivität mithilfe von Organsektion, Homogenisierung, Verbrennung und/oder Solubilisierung und anschließender Flüssigszintillationszählung von aufgefangenen Rückständen quantitativ bestimmt werden. Bestimmte Techniken, die sich zurzeit in unterschiedlichen Entwicklungsphasen befinden, z. B. die quantitative Ganzkörper-Autoradiographie oder die mikroskopische Autoradiographie der Rezeptoren, können nützlich sein, um die Verteilung einer Prüfsubstanz in den Organen und/oder Geweben zu bestimmen (3) (4).

40. Bei anderer Exposition als auf oralem Weg sollten spezifische Gewebe entnommen und analysiert werden, z. B. die Lungen bei Inhalationsstudien und Haut bei Studien mit dermaler Applikation. Siehe Nummern 74-78.

*Metabolismus*

41. Zur Identifizierung und Quantifizierung der unveränderten Prüfsubstanz und der Metaboliten sollten Exkreta (und gegebenenfalls Plasma) gesammelt werden (siehe Nummern 44-49). Das Poolen von Exkreta zur leichteren Identifizierung von Metaboliten innerhalb eines Dosisgruppe ist zulässig. Es wird empfohlen, das Profil der Metaboliten jedes Zeitabschnitts der Studie zu erstellen. Ist dies mangels Proben und/oder Radioaktivität nicht möglich, können Urin und Fäzes von unterschiedlichen Zeitpunkten, aber nur von Tieren desselben Geschlechts, die die gleiche Dosis erhalten haben, gepoolt werden. Bei der Untersuchung von Urin, Fäzes, ausgeatmeter Radioaktivität von behandelten Tieren und gegebenenfalls Gallenflüssigkeit sind geeignete qualitative und quantitative Methoden anzuwenden.

42. Es sollte nach Möglichkeit versucht werden, alle Metaboliten, die zu 5 % oder mehr der verabreichten Dosis vorhanden sind, zu identifizieren und ein Metabolismusschema für die Prüfsubstanz zu erstellen. Prüfsubstanzen, von denen beschrieben wurde, dass sie zu 5 % oder mehr der verabreichten Dosis in Exkreta enthalten sind, sollten identifiziert werden. Die Identifizierung bezieht sich auf die genaue strukturelle Bestimmung der Komponenten. Die Identifizierung erfolgt normalerweise entweder durch Co-Chromatographie des Metaboliten mit bekannten Standards unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Systemen oder durch Techniken, mit denen eine positive strukturelle Identifizierung erreicht werden kann, wie Massenspektrometrie, Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) usw. Bei der Co-Chromatographie sind Verfahren, die zur Bestimmung der Identität von Metaboliten die gleiche stationäre Phase mit zwei unterschiedlichen Lösungsmittelsystemen verwenden, zu vermeiden, da die Methoden dann nicht unabhängig sind. Bei der Identifizierung mithilfe der Co-Chromatographie sind zwei unterschiedliche, analytisch unabhängige Systeme wie die Umkehr- und Normalphasen-Dünnschichtchromatographie (TLC) und die Hochleistungsflüssigchromatograpie (HPLC) anzuwenden. Wenn die chromatographische Trennung gut genug ist, braucht das Ergebnis nicht spektroskopisch bestätigt zu werden. Eine eindeutige Identifizierung auf der Grundlage struktureller Informationen kann auch mit folgenden Methoden erzielt werden: Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC-MS) oder Flüssigchromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), Gaschromatographie/Massen-spektrometrie (GC/MS) und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).

43. Ist die Identifizierung von Metaboliten, die 5 % oder mehr der verabreichten Dosis ausmachen, nicht möglich, ist dies im Abschlussbericht zu begründen/erläutern. Auch die Identifizierung von Metaboliten, die weniger als 5 % der verabreichten Dosis ausmachen, kann angezeigt sein, um den Metabolismusweg besser zu verstehen und die Gefahren und/oder Risiken der Prüfsubstanz bewerten zu können. Soweit möglich, ist eine Bestätigung der Struktur der Metaboliten anzugeben. Hierzu kann es erforderlich sein, ihr Profil im Plasma, im Blut oder in anderen Geweben zu erstellen.

▼M4

*Ausscheidung*

44. Geschwindigkeit und Ausmaß der Ausscheidung der verabreichten Dosis sollten durch Messung der Prozentsatzes der aus Urin, Fäzes und ausgeatmeter Luft wiedergewonnenen (radioaktiven) Dosis bestimmt werden. Diese Daten tragen auch zur Aufstellung der Massenbilanz bei. Die Mengen der mit Urin, Fäzes und ausgeatmeter Luft ausgeschiedenen Prüfsubstanz (Radioaktivität) sollte in geeigneten Zeitabständen bestimmt werden (siehe Nummern 47, 48 und 49). Versuche mit wiederholter Verabreichung sollten so ausgelegt sein, dass Ausscheidungsdaten erfasst werden können, die die unter Nummer 26 genannten Ziele erfüllen. Dann können Vergleich mit Einzeldosisversuchen angestellt werden.

45. Wenn eine Pilotstudie ergeben hat, dass mit der ausgeatmeten Luft keine nennenswerten Mengen der Prüfsubstanz (Radioaktivität) (nach Nummer 49) ausgeschieden werden, braucht die ausgeatmete Luft in der Hauptstudie nicht aufgefangen zu werden.

46. Die Tiere sind getrennt in Stoffwechselkäfigen zu halten, damit die Exkreta (Urin, Fäzes und ausgeatmete Luft) aufgefangen werden können. Am Ende jedes Auffangzeitraums (siehe Nummern 47, 48 und 49) sind die Stoffwechselkäfige mit einem geeigneten Lösungsmittel durchzuspülen, um möglichst viel von der Prüfsubstanz (Radioaktivität) zurückzugewinnen. Das Auffangen von Exkreta sollte nach sieben Tagen beendet werden, oder wenn mindestens 90 % der verabreichten Dosis wiedergewonnen wurde, je nachdem was zuerst eintritt.

47. Die Gesamtmengen der Prüfsubstanz (Radioaktivität) im Urin sind am ersten Tag des Auffangens zu mindestens zwei Zeitpunkten, von denen einer 24 Stunden nach der Dosierung liegen sollte, und danach täglich bis zum Ende der Studie zu bestimmen. Es wird empfohlen, die Proben zu mehr als zwei Zeitpunkten am ersten Tag zu nehmen (z. B. nach 6, 12 und 24 Stunden). Die Ergebnisse der Pilotstudien sind auf Informationen zu alternativen oder zusätzlichen Auffangzeitpunkten zu analysieren. Die Auffangzeitpläne sind zu begründen.

48. Die Gesamtmengen der Prüfsubstanz (Radioaktivität) in den Fäzes sollte täglich und zwar erstmals 24 Stunden nach der Dosierung bis zum Ende der Studie bestimmt werden, es sei denn, aufgrund von Pilotstudien erscheinen andere oder zusätzliche Zeitpunkte für das Auffangen angebracht. Alternative Auffangzeitpläne sind zu begründen.

49. Ausgeatmetes $CO_2$ und andere flüchtige Stoffe brauchen in einer Studie nicht mehr aufgefangen zu werden, wenn in der innerhalb von 24 Stunden aufgefangenen ausgeatmeten Luft weniger als 1 % der verabreichten Dosis gefunden wird.

**Zeitverlaufsstudien**

*Plasma-/Blutkinetik*

50. Zweck dieser Studien ist die Bestimmung grundlegender Toxikokinetikparameter [z. B. $C_{max}$, $T_{max}$ Halbwertszeit ($t_{1/2}$), AUC] der Prüfsubstanz. Die Studien können mit einer Einzeldosis durchgeführt werden, im Allgemeinen werden jedoch zwei oder mehr Dosen verwendet. Die Dosis ist je nach Art des Versuchs und/oder der zu untersuchenden Frage festzusetzen. Zur Klärung von Fragen wie z. B. zur Bioverfügbarkeit der Prüfsubstanz und/oder zur Feststellung des Effekts der Dosis auf die Clearance (z. B. um festzustellen, ob die Sättigung der Clearance dosisabhängig ist) können kinetische Daten benötigt werden.

51. Für diese Studien sind mindestens vier Tiere eines Geschlechts je Dosisgruppe zu verwenden. Die Wahl des Geschlechts der verwendeten Tiere ist zu begründen. Gibt es Hinweise auf signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede der Toxizität, ist die Verwendung beider Geschlechter (vier männliche und vier weibliche Tiere) in Betracht zu ziehen.

▼M4

52. Nach Verabreichung der (radiomarkierten) Prüfsubstanz werden jedem Tier zu angemessenen Zeitpunkten mit der geeigneten Methode Blutproben entnommen. Volumen und Anzahl der Blutproben, die je Tier genommen werden können, sind möglicherweise durch die potenziellen Wirkungen wiederholter Probenahmen auf die Gesundheit/Physiologie des Tiers und/oder durch die Sensitivität der Analysemethode begrenzt. Die Proben sind für jedes einzelne Tier zu analysieren. In bestimmten Fällen (z. B. Charakterisierung von Metaboliten) müssen Proben von mehreren Tieren gepoolt werden. Gepoolte Proben sind deutlich zu kennzeichnen, und das Poolen ist zu begründen. Wird eine radiomarkierte Prüfsubstanz verwendet, kann eine Analyse der vorhandenen Gesamtradioaktivität angebracht sein. In diesem Fall ist die Gesamtradioaktivität im Vollblut und im Plasma oder im Plasma und in den Erythrozyten zu bestimmen, damit das Blut/Plasmaverhältnis berechnet werden kann. In anderen Fällen können spezifischere Untersuchungen, die die Identifizierung der Ausgangssubstanz und/oder der Metaboliten erfordern, oder die Bewertung der Proteinbindung notwendig sein.

*Sonstige Gewebekinetik*

53. Diese Studien sollen Informationen über den zeitlichen Verlauf liefern, um so über die Bestimmung der Konzentrationen der Prüfsubstanz in verschiedenen Geweben Fragen zur Art und Weise der toxischen Wirkungen, zur Bioakkumulation und zur Biopersistenz klären zu können. Die Auswahl der Gewebe und die Anzahl der zu bewertenden Zeitpunkte richtet sich danach, welcher Aspekt untersucht werden soll und welche toxikologischen Daten über die Prüfsubstanz vorliegen. Bei der Planung dieser zusätzlichen gewebekinetischen Studien sind die gemäß den Nummern 37-40 gewonnenen Informationen zu berücksichtigen. Die Studien können mit einfacher oder mehrmaliger Dosierung durchgeführt werden. Die gewählte Methode ist ausführlich zu begründen.

54. Mögliche Gründe für die Durchführung weiterer gewebekinetischer Studien:

— Hinweise auf eine längere Halbwertszeit im Blut, die auf die Möglichkeit einer Akkumulation der Prüfsubstanz in verschiedenen Geweben hindeutet, oder

— Interesse daran herauszufinden, ob in bestimmten Geweben ein konstantes Niveau erreicht wurde. (In Studien mit wiederholter Verabreichung kann es z. B. selbst wenn sich offenbar ein konstanter Spiegel der Prüfsubstanz im Blut eingestellt hat, von Interesse sein, sich zu vergewissern, dass auch in den Zielgeweben ein konstantes Niveau erreicht wurde.)

55. Bei dieser Art von Zeitverlaufsstudien ist eine geeignete orale Dosis der Prüfsubstanz an mindestens vier Tiere je Dosis je Zeitpunkt zu verabreichen. Dann ist der zeitliche Verlauf der Verteilung in den ausgewählten Geweben zu überwachen. Sofern keine geschlechtsspezifische Toxizität beobachtet wird, braucht nur ein Geschlecht verwendet zu werden. Ob die Gesamtradioaktivität oder die Ausgangssubstanz und/oder ihre Metaboliten bestimmt werden, richtet sich nach der zu untersuchenden Fragestellung. Die Gewebeverteilung ist mithilfe der geeigneten Verfahren zu bewerten.

*Enzyminduktion/-inhibition*

56. Studien zu den möglichen Wirkungen der Enzyminduktion/-inhibition oder zur Biotransformation der Prüfsubstanz können in einem oder mehreren der folgenden Fälle erforderlich sein:

1. Die vorliegenden Erkenntnisse deuten auf eine Beziehung zwischen der Biotransformation der Prüfsubstanz und erhöhter Toxizität hin;

2. die vorliegenden Toxizitätsdaten deuten auf eine nicht lineare Beziehung zwischen Dosis und Metabolismus hin;

▼M4

3. die Ergebnisse der Studien zur Metabolitenidentifizierung ergeben einen potenziell toxischen Metaboliten, der durch einen Enzymweg produziert worden sein könnte, der durch die Prüfsubstanz induziert wurde;

4. zur Erklärung der Wirkungen, die mit Phänomenen der Enzyminduktion verbunden sein sollen;

5. Wenn in In-vitro- oder In-vivo-Versuchen mit unterschiedlichen Tierarten oder unter unterschiedlichen Bedingungen toxikologisch signifikante Veränderungen des Metabolismusprofils der Prüfsubstanz beobachtet werden, kann eine Bestimmung des beteiligten Enzyms bzw. der beteiligen Enzyme erforderlich sein (z. B. Phase-I-Enzyme wie Isozyme des Cytochrom-P450-Monooxygenasesystems, Phase-II-Enzyme wie Isozyme von Sulfotransferase oder Uridin-Diphosphat-Glucuronosyltransferase oder jedes andere relevante Enzym). Diese Informationen können zur Beurteilung der Relevanz von Extrapolationen von einer Tierart zu einer anderen Tierart verwendet werden.

57. Zur Beurteilung der mit der Prüfsubstanz zusammenhängenden toxikokinetischen Veränderungen sind geeignete Studienprotokolle zu verwenden, die entsprechend validiert und gerechtfertigt sind. Die Studien können z. B. zwecks Bestimmung des Metabolismusprofils die mehrmalige Dosierung einer unmarkierten Prüfsubstanz, gefolgt von einer einzigen radiomarkierten Dosis an Tag 14 oder die mehrmalige Dosierung einer radiomarkierten Prüfsubstanz mit Probenahme an den Tagen 1, 7 und 14 vorsehen. Die mehrmalige Dosierung einer radiomarkierten Prüfsubstanz kann auch Aufschluss über die Bioakkumulation geben (siehe Nummer 26).

ZUSÄTZLICHE METHODEN

58. Mithilfe zusätzlicher Methoden, die über die in dieser Prüfmethode beschriebenen *In-vivo*-Versuche hinausgehen, können nützliche Informationen über Resorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination einer Prüfsubstanz bei bestimmten Tierarten gewonnen werden.

**Nutzung von *in-vitro*-informationen**

59. Durch *In-vitro*-Studien mit geeigneten Testsystemen können mehrere Fragestellungen zum Metabolismus der Prüfsubstanz geklärt werden. Zur Untersuchung möglicher Metaboliten können frisch isolierte oder gezüchtete Hepatozyten und subzelluläre Fraktionen (z. B. Mikrosomen und Cytosol oder S9 Fraktion) von der Leber verwendet werden. Der lokale Metabolismus im Zielorgan, z. B. in der Lunge, kann für die Risikobewertung von Interesse sein. Für diese Zwecke können mikrosomale Fraktionen von Zielgeweben nützlich sein. Studien mit Mikrosomen können nützlich sein, um Unterschiede, die mit dem Geschlecht oder der Lebensphase zusammenhängen könnten, zu klären und Enzymparameter ($K_m$ und $V_{max}$) zu beschreiben, die die Bewertung der Dosisabhängigkeit des Metabolismus bezogen auf die Expositionsstufen erleichtern können. Darüber hinaus können Mikrosome hilfreich sein, um die am Metabolismus der Prüfsubstanz beteiligten spezifischen mikrosomalen Enzyme zu identifizieren, die für die Extrapolation von einer Tierart zu einer anderen relevant sein können (siehe auch Nummer 56). Das Potenzial für die Induktion der Biotransformation kann auch mithilfe von subzellulären Fraktionen der Leber (z. B. Mikrosomen und Cytosol) von mit der Prüfsubstanz vorbehandelten Tieren durch In-vitro-Induktionsstudien an Hepatozyten oder auf der Grundlage spezifischer Zelllinien, die relevante Enzyme exprimieren untersucht werden. Unter bestimmten Bedingungen kann die Verwendung subzellulärer Fraktionen von menschlichen Geweben für die Bestimmung potenzieller artspezifischer Unterschiede in Betracht gezogen werden. Die Ergebnisse von *In-vitro*-Untersuchungen können auch für die Entwicklung von physiologisch-basierten toxikokinetischen Modellen von Nutzen sein (5).

▼M4

60. *In-vitro*-Hautresorptionsstudien können zusätzliche Informationen zur Beschreibung der Resorption liefern (6).

61. Mit primären Zellkulturen von Leberzellen und frischen Gewebeschnitten können ähnliche Fragen untersucht werden wie mit Lebermikrosomen. In bestimmten Fällen kann es möglich sein, spezifische Fragen mithilfe von Zelllinien, die das betreffende Enzym exprimieren, oder mit genetisch veränderten Zelllinien zu beantworten. In anderen Fällen kann es hilfreich sein, die Inhibition und Induktion spezifischer Cytochrom-P450-Isozyme (z. B. CYP1A1, 2E1, 1A2 und andere) und/oder Phase-II-Enzyme durch die Ausgangsverbindung mittels In-vitro-Studien zu untersuchen. Die so gewonnenen Informationen können für strukturverwandte Verbindungen nützlich sein.

**Verwendung toxikokinetischer Daten aus Toxizitätsstudien als ergänzende Informationen**

62. Die Analyse von Blut-, Gewebe- und/der Ausscheidungsproben, die im Verlauf anderer Toxizitätsstudien genommen wurden, kann Daten zur Bioverfügbarkeit, zu Veränderungen der Plasmakonzentration im Zeitverlauf (AUC, $C_{max}$), zum Bioakkumulationspotenzial, zu den Clearance-Raten und zu Veränderungen des Metabolismus und der Kinetik liefern, die mit dem Geschlecht oder der Lebensphase der Tiere zusammenhängen.

63. Die Studienauslegung kann auch im Hinblick auf die Klärung folgender Aspekte angepasst werden: Sättigung der Resorption, Biotransformations- oder Ausscheidungswege bei höheren Dosisstufen, Funktion neuer Stoffwechselwege bei höheren Dosen und Begrenzung toxischer Metaboliten auf höhere Dosen.

64. Weitere Aspekte, die zur Beurteilung der Gefahren untersucht werden können:

— die altersbedingte Empfindlichkeit, die vom Zustand der Blut-Hirn-Schranke, der Nieren und/oder der Detoxifizierungskapazität abhängt;

— die Empfindlichkeit bestimmter Unterpopulationen aufgrund unterschiedlicher Biotransformationskapazitäten oder anderer toxikokinetischer Unterschiede;

— Ausmaß der Exposition des Fötus durch transplazentare Übertragung von chemischen Stoffen oder der Exposition von Neugeborenen durch das Säugen.

**Verwendung toxikokinetischer Modelle**

65. Toxikokinetische Modelle können für verschiedene Aspekte der Gefahren- und Risikobewertung von Nutzen sein, z. B. für die Vorhersage der systemischen Exposition und der die inneren Gewebe erreichenden Dosis. Außerdem können spezifische Fragen zur Wirkungsweise untersucht werden. Die Modelle können als Grundlage für die Extrapolation zwischen Tierarten, Expositionswegen und Dosierungsmustern sowie für die Bewertung des Risikos für den Menschen dienen. Zu den nützlichen Daten für die Entwicklung von physiologisch-basierten toxikokinetischen Modellen für eine Prüfsubstanz bei einer bestimmten Tierart gehören 1) die Verteilungskoeffizienten, 2) biochemische Konstanten und physiologische Parameter, 3) die für die verschiedenen Verabreichungswege spezifischen Resorptionsparameter und 4) *In-vivo*-Kinetikdaten für die Evaluierung der Modelle [z. B. Clearance-Parameter für relevante (> 10 %) Ausscheidungswege, $K_m$ und $V_{max}$ für den Metabolismus]. Die Versuchsdaten, die zur Entwicklung des Modells verwendet werden, sind mit wissenschaftlich fundierten Methoden zu erzeugen, und die Modellergebnisse sind zu validieren. Prüfsubstanz- und tierartspezifische Parameter wie Resorptionsraten, Blut-Gewebe-Verteilungskoeffizient und metabolische Umsatzraten werden oft bestimmt, um die Entwicklung von Nicht-Kompartiment-Modellen oder physiologisch basierten Modellen zu erleichtern (7).

▼M4

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

66. Der Prüfbericht sollte ein Inhaltsverzeichnis enthalten.

**Hauptteil des Berichts**

67. Der Hauptteil des Berichts sollte die unter diese Prüfmethode fallenden Informationen enthalten, die wie folgt in Abschnitte und Absätze zu gliedern sind:

*Zusammenfassung*

68. Dieser Abschnitt des Berichts sollte eine Zusammenfassung der Studienauslegung und eine Beschreibung der angewandten Methoden enthalten. Er sollte außerdem die wichtigsten Erkenntnisse in Bezug auf die Massenbilanz, die Art und Menge der Metaboliten, die Rückstände der Prüfsubstanz in den Geweben, die Clearance-Rate, das Bioakkumulationspotenzial, geschlechtsspezifische Unterschiede usw. behandeln. Die Zusammenfassung muss so ausführlich sein, dass eine Bewertung der Ergebnisse möglich ist.

*Einleitung*

69. Dieser Abschnitt des Berichts sollte die Ziele der Studie, die Begründung und Auslegung sowie geeignete Literaturhinweise und Hintergrundinformationen enthalten.

*Material und Methoden*

70. Dieser Abschnitt des Berichts sollte ausführliche Erläuterungen aller einschlägigen Informationen enthalten. Dazu gehören:

a) Prüfsubstanz

Dieser Unterabschnitt sollte Angaben zur Prüfsubstanz enthalten: chemische Bezeichnung, Molekülstruktur, qualitative und quantitative Bestimmung der chemischen Zusammensetzung, chemische Reinheit und, soweit möglich, Art und Mengen etwaiger Verunreinigungen. Er sollte auch Angaben zu den physikalischen/chemischen Eigenschaften, insbesondere Aggregatzustand, Farbe, Löslichkeits- und/oder Verteilungskoeffizient, Stabilität und gegebenenfalls Ätzwirkung enthalten. Soweit vorhanden, sind Informationen zu Isomeren anzugeben. Ist die Prüfsubstanz radiomarkiert, sollte dieser Unterabschnitt folgende Informationen enthalten: Art des Radionuklids, Position der Markierung, spezifische Aktivität und radiochemische Reinheit.

Die Art des Vehikels, etwaige Verdünnungsmittel, Suspendierhilfen und Emulgatoren oder andere Stoffe, die zur Verabreichung der Prüfsubstanz verwendet werden, sind anzugeben.

b) Versuchstiere

Dieser Unterabschnitt sollte Informationen über die Versuchstiere mit Angaben zur Auswahl von Art, Stamm und Alter zu Beginn der Studie, Geschlecht, Körpergewicht, Gesundheitszustand und Tierhaltung sowie die entsprechenden Begründungen enthalten.

c) Methoden

Dieser Unterabschnitt sollte Angaben zur Studienauslegung und zur verwendeten Methodik enthalten. Hierzu gehört Folgendes:

1. Begründung für jede Änderung des Expositionswegs und der Expositionsbedingungen, falls zutreffend;

▼M4

2. Begründung für die Auswahl der Dosisstufen;

3. falls zutreffend, Erläuterung der Pilotstudien, die für die Konzeption von Follow-up-Studien verwendet wurden; die den Pilotstudien zugrunde liegenden Daten sind anzugeben;

4. Zubereitungsweise der Dosierungslösung und Art des Lösungsmittels oder Vehikels, sofern verwendet;

5. Anzahl der Behandlungsgruppen und Anzahl der Tiere je Gruppe;

6. Dosierungsstufen und -volumen (sowie die spezifische Aktivität der Dosis bei Anwendung von Radioaktivität);

7. Verabreichungsweg(e) und -methode(n);

8. Frequenz der Dosierung;

9. Futterkarenz (falls zutreffend);

10. Gesamtradioaktivität je Tier;

11. Umgang mit den Tieren;

12. Entnahme/Auffangen von Proben und Aufbereitung;

13. für die Trennung, quantitative Bestimmung und Identifizierung von Metaboliten verwendete Analysemethoden;

14. Nachweisgrenzen der verwendeten Methoden;

15. sonstige durchgeführte experimentelle Messungen und Verfahren (einschließlich der Validierung von Methoden für die Analyse von Metaboliten).

d) Statistische Analysen

Werden die Studienergebnisse statistisch analysiert, so müssen ausreichende Informationen über das herangezogene Analyseverfahren und das verwendete Computerprogramm angegeben werden, damit ein unabhängiger Überprüfer/Statistiker die Analyse nachbewerten und nachvollziehen kann.

Bei Studien mit Systemmodellierung wie einem physiologisch-basierten toxikokinetischen Modell ist eine umfassende Beschreibung des Modells anzugeben, um eine unabhängige Rekonstruktion und Validierung des Modells zu ermöglichen (siehe Nummer 65 und Anlage: Definitionen).

*Ergebnisse*

71. Alle Daten sind entsprechend der Beschreibung im vorliegenden Absatz zusammenzufassen und mit einer angemessenen statistischen Auswertung in Tabellenform darzustellen. Die Daten der Radioaktivitätsmessung sind zusammenzufassen und in für die Studie geeigneter Weise darzustellen, d. h. normalerweise als Mikrogramm- oder Milligrammäquivalent je Probenmasse; es können auch andere Einheiten verwendet werden. Dieser Abschnitt sollte grafische Darstellungen der Befunde, die repräsentativen Chromatographie- und Spektrometriedaten, Angaben zur Identität/Menge der Metaboliten und den möglichen Stoffwechselwegen, einschließlich der Molekülstruktur der Metaboliten enthalten. Darüber hinaus sollte dieser Abschnitt, soweit zutreffend, die folgenden Informationen enthalten:

1. Menge und prozentualer Anteil der Wiedergewinnung der Radioaktivität in Urin, Fäzes, ausgeatmeter Luft und Käfigreinigungsrückständen.

— Bei Studien mit dermaler Applikation sind auch Daten über die Wiedergewinnung der Prüfsubstanz von der behandelten Haut und vom Abwaschen der Haut, Daten über die restliche Radioaktivität auf der Hautabdeckung und in den Stoffwechselkäfigen sowie die Ergebnisse der Hautwaschstudie anzugeben. Für weitere Erläuterungen siehe Nummern 74-77.

▼M4

— Bei Inhalationsstudien sind auch Daten über die Wiedergewinnung der Prüfsubstanz aus den Lungen und Nasengeweben anzugeben (8). Für weitere Erläuterungen siehe Nummer 78;

2. die Gewebeverteilung, angegeben als Prozentsatz der verabreichten Dosis und als Konzentration (Mikrogrammäquivalent je Gramm Gewebe) und die Gewebe/Blut- oder Gewebe/Plasma-Verhältnisse;

3. die für jede Studie aufgestellte Materialbilanz mit Untersuchung von Körpergeweben und Ausscheidungen;

4. Plasmakonzentrationen und toxikokinetische Parameter (Bioverfügbarkeit, AUC, $C_{max}$, $T_{max}$, Clearance, Halbwertszeit) nach Verabreichung über den/die jeweilige(n) Expositionsweg(e);

5. Geschwindigkeit und Ausmaß der Resorption der Prüfsubstanz nach Verabreichung über den/die jeweilige(n) Expositionsweg(e);

6. in Ausscheidungen gefundene Mengen der Prüfsubstanz und Metaboliten (angegeben als Prozentsatz der verabreichten Dosis);

7. Verweis auf Daten in der Anlage, die Daten zu allen gemessenen Endpunkten für die einzelnen Tiere enthalten (z. B. Dosisverabreichung, prozentuale Wiedergewinnung, Konzentrationen, toxikokinetische Parameter usw.);

8. grafische Darstellung der vorgeschlagenen Stoffwechselwege und der Molekülstrukturen der Metaboliten.

*Diskussion und Schlussfolgerungen*

72. In diesem Abschnitt sollte(n) der/die Verfasser

1. auf der Grundlage des Metabolismus und der Eliminierung der Prüfsubstanz einen Stoffwechselweg vorschlagen;

2. potenzielle tierart- und geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Eliminierung und/oder Biotransformation der Prüfsubstanz untersuchen;

3. die Identität und Bedeutung von Metaboliten, die Clearance-Raten, das Bioakkumulationspotenzial, die Menge an Rückständen des Ausgangsstoffs und/oder von Metaboliten in Geweben sowie gegebenenfalls dosisabhängige Veränderungen von toxikokinetischen Parametern tabellarisch darstellen und erläutern;

4. alle relevanten Toxikokinetik-Daten aufnehmen, die bei der Durchführung von Toxizitätsstudien gewonnen wurden;

5. eine kurze Schlussfolgerung formulieren, die durch die Ergebnisse der Studie gestützt werden kann;

6. (falls notwendig oder angebracht) Abschnitte hinzufügen.

73. Für bibliografische Angaben, Tabellen, Abbildungen, Anhänge usw. sind zusätzliche Abschnitte zu verwenden.

▼M4

ALTERNATIVE EXPOSITIONSWEGE

**Dermal**

*Dermale Applikation*

74. Dieser Abschnitt enthält spezifische Informationen zur Untersuchung der Toxikokinetik der Prüfsubstanz bei dermaler Applikation. Für die Hautresorption ist Kapitel B.44 dieses Anhangs [Hautresorption: *In-vivo*-Methode (9)] zu beachten. Für andere Endpunkte wie Verteilung und Metabolismus kann diese Prüfmethode B.36 verwendet werden. Bei dermaler Applikation sollten eine oder mehrere Dosisstufen der Prüfsubstanz verwendet werden. Die Prüfsubstanz (z. B. reines, verdünntes oder formuliertes Material, das die auf die Haut aufgetragene Prüfsubstanz enthält) muss der Substanz entsprechen (oder ein realistisches Surrogat hiervon bilden), der Menschen oder andere mögliche Zielarten ausgesetzt sein können. Die Dosisstufe(n) ist/sind gemäß den Nummern 20-26 dieser Prüfmethode festzulegen. Dabei kann berücksichtigt werden, mit welcher Exposition von Menschen zu rechnen ist und/oder bei welchen Dosen in anderen Studien zur dermalen Toxizität Toxizitätszeichen beobachtet wurden. Die dermale Dosis ist erforderlichenfalls in einem geeigneten Vehikel aufzulösen und in einem angemessenen Volumen zu applizieren. Kurz vor Versuchsbeginn wird das Fell auf dem Rücken der Versuchstiere geschoren. Ein Abrasieren des Fells ist ebenfalls möglich, sollte jedoch etwa 24 Stunden vor dem Versuch erfolgen. Beim Scheren oder Abrasieren des Fells ist darauf zu achten, dass die Haut nicht verletzt wird, da dies ihre Durchlässigkeit verändern könnte. Etwa 10 % der Körperoberfläche sollten für die Applikation der Prüfsubstanz enthaart werden. Bei hochtoxischen Substanzen kann die behandelte Oberfläche kleiner als etwa 10 % sein, es sollte jedoch ein möglichst großer Bereich mit einer dünnen und einheitlichen Schicht bedeckt werden. Bei allen Gruppen, die der dermalen Prüfung unterzogen werden, sollte die gleiche Fläche behandelt werden. Die Bereiche, auf denen die Prüfsubstanz appliziert wurde, sind mit einer geeigneten Abdeckung, die befestigt wird, zu schützen. Die Tiere sind getrennt unterzubringen.

75. Um die Menge der applizierten Dosis der Prüfsubstanz zu bestimmen, die mit milder Seife und Wasser von der behandelten Hautfläche abgewaschen werden kann, ist eine Hautwaschstudie durchzuführen. Diese Studie kann auch bei der Aufstellung der Massenbilanz helfen, wenn die Prüfsubstanz über die Haut verabreicht wird. Bei dieser Hautwaschstudie wird zwei Tieren eine Einzeldosis der Prüfsubstanz appliziert. Die Dosisstufe ist gemäß Nummer 23 dieser Prüfmethode festzulegen (für die Dauer des Hautkontakts siehe auch Nummer 76). Anhand der beim Abwaschen wiedergewonnenen Menge der Prüfsubstanz kann die Wirksamkeit der Entfernung der Prüfsubstanz durch das Abwaschen bestimmt werden.

76. Sofern die Prüfsubstanz keine hautätzende Wirkung hat, sollte sie nach dem Auftragen mindestens 6 Stunden auf der Haut verbleiben. Dann ist die Abdeckung abzunehmen und die behandelte Fläche nach dem in der Hautwaschstudie beschriebenen Verfahren zu waschen (siehe Nummer 75). Sowohl die Abdeckung als auch die Waschflüssigkeit sind auf Rückstände der Prüfsubstanz zu analysieren. Am Ende der Studie werden die Tiere gemäß (2) tierschutzgerecht getötet und die behandelte Haut wird entfernt. Ein angemessener Teil der behandelten Haut ist auf Rückstände der Prüfsubstanz (Radioaktivität) zu analysieren.

77. Für die toxikokinetische Bewertung von Arzneimitteln können je nach Regulierungssystem unterschiedliche Verfahren erforderlich sein.

▼M4

**Inhalation**

78. Für diese Prüfung ist eine einzige Konzentration der Prüfsubstanz zu verwenden (oder mehrere, falls erforderlich). Die Konzentration(en) ist/sind gemäß den Nummern 20-26 dieser Prüfmethode festzulegen. Um eine Resorption über andere Expositionswege zu verhindern, sind Inhalationsprüfungen mit einem „Nasentrichter“ oder einer „Head-only“-Vorrichtung durchzuführen (8). Wenn bei der Inhalationsexposition andere Bedingungen angewandt werden, ist die Änderung zu begründen. Die Dauer der Inhalationsexposition ist festzulegen und beträgt normalerweise 4-6 Stunden.

*LITERATUR:*


1. OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

2. OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N°19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

3. Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

4. Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

5. Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400-411.

6. Kapitel B.45 dieses Anhangs, Hautresorption: *In-vitro*-Methode.

7. IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

9. Kapitel B.44 dieses Anhangs, Hautresorption: *In-vivo*-Methode.

10. Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

11. Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

*Anlage*

DEFINITIONEN

**Resorption**: Prozess(e) der Aufnahme von Chemikalien in oder über Gewebe. Die Resorption bezieht sich auf die Ausgangssubstanz und alle ihre Metaboliten. Nicht mit „Bioverfügbarkeit“ zu verwechseln.

**Akkumulation** (Bioakkumulation): Zunahme der Menge einer Prüfsubstanz in den Geweben im Laufe der Zeit (normalerweise im Fettgewebe, nach wiederholter Exposition); wenn die Prüfsubstanz dem Körper in größeren Mengen zugeführt wird, als er sie ausscheidet, akkumuliert der Organismus die Prüfsubstanz, und es können toxische Konzentrationen des Stoffs erreicht werden.

**ADME**: Akronym für „Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion“ (Resorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung).

**AUC**: (Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve): die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve einer Prüfsubstanz im Plasma. Diese Fläche entspricht der Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die vom Körper innerhalb eines festgelegten Zeitraums resorbiert wurde. Unter linearen Bedingungen ist die AUC (vom Zeitpunkt Null bis unendlich) proportional zur Gesamtmenge einer vom Körper resorbierten Prüfsubstanz, unabhängig von der Resorptionsgeschwindigkeit.

**Autoradiographie**: (Ganzkörper-Autoradiographie): wird verwendet zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung des Aufenthaltsorts einer radioaktiven Prüfsubstanz im Gewebe. Bei dieser Technik werden Röntgenfilme oder in jüngerer Zeit digitale Phosphorbildplatten verwendet, um radioaktiv markierte Moleküle oder Molekülfragmente durch Aufzeichnung der im untersuchten Objekt emittierten Strahlung sichtbar zu machen. Die quantitative Ganzkörper-Autoradiographie ist für die Evaluierung der Verteilung der Prüfsubstanz und die Bewertung der Gesamtrückgewinnung und Auflösung von radioaktivem Material in Geweben möglicherweise besser geeignet als die Organsektion. Ein wichtiger Vorteil ist beispielsweise, dass sie in einem Versuchsmodell mit einem pigmentierten Tier verwendet werden kann, um die mögliche Assoziation der Prüfsubstanz mit Melanin zu bewerten, das sich an bestimmte Moleküle binden kann. Zwar lassen sich mit dieser Technik die Bindungsstellen mit hoher Kapazität und geringer Affinität im gesamten Körper gut darstellen, aber sie ist möglicherweise weniger gut geeignet für die Identifizierung bestimmter Zielorte wie Rezeptorbindungsstellen, an denen für den Nachweis eine relativ hohe Auflösung und eine hohe Sensitivität erforderlich sind. Wenn die Autoradiographie zum Einsatz kommt, sollten Versuche zur Aufstellung der Massenbilanz der verabreichten Verbindung mit einer getrennten Gruppe oder in einer von der Gewebeverteilungsstudie getrennten Studie durchgeführt werden, bei der alle Ausscheidungen (zu denen auch die ausgeatmete Luft gehören kann) und ganze Tierkörper homogenisiert und mithilfe der Flüssigszintillationszählung analysiert werden.

**Biliäre Ausscheidung**: Ausscheidung über die Gallengänge.

**Bioakkumulation**: siehe „Akkumulation“.

**Bioverfügbarkeit**: der Anteil einer verabreichten Dosis, die in den systemischen Kreislauf gelangt oder am Wirkort zur Verfügung gestellt wird. Die Bioverfügbarkeit einer Prüfsubstanz bezieht sich normalerweise auf den Ausgangsstoff; sie kann sich aber auch auf seine Metaboliten beziehen. Sie betrifft nur eine chemische Form. *Hinweis:* Bioverfügbarkeit und Resorption sind nicht identisch. Der Unterschied zwischen z. B. der oralen Resorption (d. h. dem Vorhandensein in der Darmwand und in der portalen Zirkulation) und der Bioverfügbarkeit (d. h. dem Vorhandensein im systemischen Blut und in Geweben) kann neben anderen Faktoren auf den chemischen Abbau aufgrund des Metabolismus der Darmwand oder auf Effluxtransport zurück zum Darmlumen oder auf präsystemischen Metabolismus in der Leber zurückzuführen sein (10). Die Bioverfügbarkeit der toxischen Komponente (Ausgangsstoff oder ein Metabolit) ist bei der Bewertung der Risiken für die menschliche Gesundheit ein kritischer Parameter (Extrapolation von hoher zu niedriger Dosis, Extrapolation von einem Verabreichungsweg zu einem anderen) für die Ableitung eines internen Werts vom externen NOAEL- oder BMD-Wert (applizierte Dosis). Für die Untersuchung der Wirkungen auf die Leber bei oraler Verabreichung reicht die orale Resorption aus. Bei jeder anderen Wirkung als am Eingangsort ist die Bioverfügbarkeit jedoch im Allgemeinen ein zuverlässigerer Parameter für die weitere Risikobewertung als die Resorption.

▼M4

**Biopersistenz**: siehe „Persistenz“.

**Biotransformation**: (normalerweise enzymatische) chemische Umwandlung einer Prüfsubstanz in einen anderen Stoff innerhalb des Körpers. Synonym „Metabolismus“.

**$C_{max}$**: entweder maximale (Peak-)Konzentration im Blut (Plasma/Serum) nach der Verabreichung oder maximale (Peak-)Ausscheidung (in Urin oder Fäzes) nach der Verabreichung.

**Clearance-Rate**: quantitatives Maß der Geschwindigkeit, mit der eine Prüfsubstanz je Zeiteinheit aus dem Blut, dem Plasma oder einem bestimmten Gewebe eliminiert wird.

**Kompartiment**: struktureller oder biochemischer Teil (oder strukturelle oder biochemische Einheit) eines Körpers, eines Gewebes oder einer Zelle, die vom Rest abgetrennt ist.

**Detoxifizierungswege**: eine Reihe von Schritten, durch die toxische Stoffe aus dem Körper eliminiert werden, entweder durch metabolische Umwandlung oder durch Ausscheidung.

**Verteilung**: Verbreitung einer Prüfsubstanz und ihrer Derivate im Organismus.

**Enzyme/Isozyme**: Proteine, die chemische Reaktionen katalysieren. Isozyme sind Enzyme, die ähnliche chemische Reaktionen katalysieren, sich aber in ihrer Aminosäurensequenz unterscheiden.

**Enzymparameter**: $K_m$: Michaeliskonstante und $V_{max}$: maximale Geschwindigkeit.

**Ausscheidung**: Prozess(e), mit dem/denen eine verabreichte Prüfsubstanz und/oder ihre Metaboliten aus dem Körper entfernt werden.

**Exogen**: von außen in den Organismus oder das System eingebracht oder außerhalb des Organismus oder des Systems erzeugt.

**Extrapolation**: Folgerung eines oder mehrerer unbekannter Werte aus dem, was bekannt ist oder beobachtet wurde.

**Halbwertszeit ($t_{1/2}$)**: Zeit, in der die Konzentration der Prüfsubstanz in einem Kompartiment um die Hälfte sinkt. Die Halbwertszeit bezieht sich normalerweise auf die Plasmakonzentration oder die Menge der Prüfsubstanz im gesamten Körper.

**Induktion/Enzyminduktion**: Enzymsynthese als Reaktion auf einen Umweltreiz oder ein Induktormolekül.

**Linearität/lineare Kinetik**: In der Kinetik ist ein Prozess linear, wenn die Geschwindigkeiten aller Übertragungen zwischen den Kompartimenten proportional zu den vorhandenen Mengen oder Konzentrationen sind, d. h. 1. Ordnung. Folglich sind die Clearance- und Verteilungsvolumen konstant, ebenso die Halbwertszeiten. Die erreichten Konzentrationen sind proportional zur Dosierungsrate (Exposition), und die Akkumulation kann leichter vorhergesagt werden. Ob Linearität oder Nichtlinearität vorliegt, kann durch Vergleich der relevanten Parameter, z. B. AUC, nach unterschiedlichen Dosen oder nach Einzel- oder Mehrfachexposition festgestellt werden. Besteht keine Dosisabhängigkeit, so kann dies auf die Sättigung der an der Metabolisierung der Verbindung beteiligten Enzyme hindeuten; eine Vergrößerung der AUC nach wiederholter Exposition im Vergleich zu einer Einmalexposition kann ein Hinweis auf eine Stoffwechselhemmung, eine Verkleinerung der AUC ein Hinweis auf eine Stoffwechselinduktion sein [siehe auch (11)].

**Massenbilanz**: Erfassung der Massen der Prüfsubstanz, die in das System eingehen und es verlassen.

▼M4

**Materialbilanz**: siehe „Massenbilanz“.

**Toxizitätsmechanismus/Wirkungsmechanismus (Wirkungsweise)**: Wirkungsmechanismus bezieht sich auf spezifische biochemische Wechselwirkungen, durch die eine Prüfsubstanz ihre Wirkung entfaltet. Wirkungsweise bezieht sich auf allgemeinere Phänomene, die zur Toxizität einer Prüfsubstanz führen.

**Metabolismus**: Synonym „Biotransformation“.

**Metaboliten**: Produkte des Metabolismus oder metabolischer Prozesse.

**Orale Resorption**: der Prozentsatz der Dosis der Prüfsubstanz, die ab dem Verabreichungsort (z. B. Magen-Darm-Trakt) resorbiert wird. Mit diesem wichtigen Parameter kann bestimmt werden, welcher Anteil der verabreichten Prüfsubstanz die Pfortader und anschließend die Leber erreicht.

**Verteilungskoeffizient**: ein Maß für die unterschiedliche Löslichkeit eines chemischen Stoffs in zwei Lösungsmitteln.

**Maximale Blut-(Plasma-/Serum-)Spiegel**: maximale (Peak-)Konzentration im Blut (Plasma/Serum) nach Verabreichung (siehe auch „$C_{max}$“).

**Persistenz (Biopersistenz)**: das langfristige Vorhandensein einer Chemikalie (in einem biologischen System) aufgrund ihrer Abbau-/Eliminationsresistenz.

**Read-across**: Die Endpunktinformationen für eine oder mehrere Chemikalien werden verwendet, um eine Prognose über den Endpunkt für die Zielchemikalie abzugeben.

**Rezeptor-Mikroautoradiographie**: Mit dieser Technik kann die xenobiotische Interaktion mit spezifischen Gewebestellen oder Zellpopulationen untersucht werden, wie z. B. in Studien zur Rezeptorbindung oder zur spezifischen Wirkungsweise, die eine hohe Auflösung und hohe Sensitivität erfordern, die bei anderen Verfahren wie der Ganzkörperautoradiographie möglicherweise nicht erreichbar sind.

**Verabreichungsweg** (oral, IV, dermal, Inhalation usw.): bezieht sich darauf, auf welche Weise chemische Stoffe dem Körper verabreicht werden (z. B. oral über eine Sonde, oral mit dem Futter, dermal, durch Inhalation, intravenös usw.)

**Sättigung**: Zustand, in dem sich einer oder mehrere kinetische Prozesse (z. B. Resorption, Metabolismus oder Clearance) an einem Maximum befinden (d. h. „gesättigt“ sind).

**Sensitivität**: Fähigkeit einer Methode oder eines Messinstruments, zwischen Reaktionen zu unterscheiden, die verschiedene Niveaus einer Zielvariablen darstellen.

**Konstanter Blutspiegel (Plasmaspiegel)**: Nichtgleichgewichtszustand eines offenen Systems, bei dem alle auf das System einwirkenden Kräfte genau durch entgegenwirkende Kräfte ausgeglichen werden, so dass alle Komponenten des Systems eine konstante Konzentration aufweisen, obwohl Materie durch das System fließt.

**Systemmodellierung** (physiologisch-basiert toxikokinetisch, pharmakokinetisch-basiert, physiologisch-basiert pharmakokinetisch, biologisch-basiert usw.): abstraktes Modell, das das Verhalten eines Systems mathematisch beschreibt.

**Zielgewebe**: Gewebe, in dem sich eine wichtige schädliche Wirkung eines toxischen Stoffs manifestiert.

▼M4

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

**Gewebeverteilung**: reversible Positionsveränderung einer Prüfsubstanz von einer Stelle im Körper an eine andere. Die Gewebeverteilung kann mithilfe von Organsektion, Homogenisation, Verbrennung und Flüssigkeitsszintillationszählung oder durch qualitative und/oder quantitative Ganzkörperautoradiographie untersucht werden. Die erste Methode ist gut geeignet, um die Konzentration und die prozentuale Wiedergewinnung in den Geweben und im Körper derselben Tiere zu bestimmen, hat aber möglicherweise eine zu geringe Auflösung für alle Gewebe und eine unter dem Idealwert liegende Gesamtwiedergewinnungsrate (< 90 %). Siehe auch die Definition der Autoradiographie.

$\mathbf{T_{max}}$: Zeit bis zum Erreichen von $C_{max}$.

**Toxikokinetik** (Pharmakokinetik): Untersuchung von Resorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung von chemischen Stoffen im Zeitverlauf.

**Validierung von Modellen**:
Verfahren zur Bewertung der Eignung eines Modells, die verfügbaren toxikokinetischen Daten angemessen zu beschreiben. Modelle können durch einen statistischen und visuellen Vergleich ihrer Prognosen mit experimentellen Werten gegenüber einer gemeinsamen unabhängigen Variablen (z. B. der Zeit) bewertet werden. Der Umfang der Bewertung sollte in Bezug auf die vorgesehene Verwendung des Modells gerechtfertigt sein.

▼B

## B.37. VERZÖGERTE NEUROTOXIZITÄT PHOSPHORORGANISCHER SUBSTANZEN NACH AKUTER EXPOSITION

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Bei der Abschätzung und Bewertung der toxischen Wirkungen von Substanzen muss auch das Potenzial bestimmter Substanzklassen für spezifische neurotoxische Wirkungen, die in anderen Toxizitätsstudien möglicherweise nicht nachweisbar sind, untersucht werden. Bei einigen phosphororganischen Verbindungen wurden verzögerte neurotoxische Wirkungen beobachtet, diese Substanzen kommen für eine Untersuchung mit der vorliegenden Methode in Frage.

In-vitro-Screening-Tests könnten verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren, die eine verzögerte Polyneuropathie hervorrufen können; allerdings lassen negative Ergebnisse von In-vitro-Studien nicht darauf schließen, dass die Prüfsubstanz kein Neurotoxikum ist.

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

#### 1.2. DEFINITIONEN

Zu den phosphororganischen Substanzen zählen ungeladene phosphororganische Ester, Thioester oder Anhydride von Phosphinsäuren, Phosphonsäuren bzw. Phosphoramidsäuren oder die engverwandten Thiophosphinsäuren, Thiophosphonsäuren bzw. Thiophosphoramidsäuren oder sonstige Substanzen, welche die bei dieser Substanzklasse bisweilen zu beobachtende verzögerte Neurotoxizität aufweisen können.

Verzögerte Neurotoxizität ist ein Syndrom, das mit langsamem, verzögertem Auftreten von Ataxien, distalen Axonopathien in Rückenmarks- und peripheren Nerven sowie einer Hemmung und Alterung der Neuropathy Target Esterase (NTE) im Nervengewebe verbunden ist.

#### 1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Eine Referenzsubstanz kann mit einer positiven Kontrollgruppe getestet werden, um nachzuweisen, dass sich die Reaktion der geprüften Spezies unter den Laborversuchsbedingungen nicht wesentlich verändert hat.

Ein Beispiel für ein weit verbreitetes Neurotoxikum ist das Tri-o-tolylphosphat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-Bezeichnung: Tris(2-methylphenyl)phosphorsäureester), das auch als Tris-o-cresylphosphat bezeichnet wird.

#### 1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Prüfsubstanz wird oral als Einmalgabe an Haushühner verabreicht, die ggf. gegen akute cholinergische Wirkungen geschützt wurden. Die Tiere werden für die Dauer von 21 Tagen auf Verhaltensauffälligkeiten, Ataxien und Paralysen hin beobachtet. Biochemische Parameter, insbesondere die Neuropathy Target Esterase (NTE), werden im allgemeinen 24 und 48 Stunden nach Verabreichung bei Hennen bestimmt, die nach Zufallskriterien aus jeder Gruppe ausgewählt werden. 21 Tage nach der Exposition werden die verbliebenen Hennen getötet, und ausgewählte Nervengewebe werden histopathologisch untersucht.

▼B

1.5. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.5.1. **Vorbereitungen**

Gesunde junge erwachsene Hennen, die frei von störenden Viruserkrankungen und Arzneimitteln sind und keine Gangstörungen aufweisen, werden randomisiert, der Behandlungs- oder der Kontrollgruppe zugeteilt und für die Dauer von mindestens 5 Tagen vor Beginn der Studie an die Laborbedingungen akklimatisiert.

Die Käfige oder Gehege sollten so groß sein, dass sich die Tiere frei bewegen können und ihr Gangbild gut zu beobachten ist.

Die Gabe der Prüfsubstanz erfolgt normalerweise auf oralem Wege mittels Magensonde, Gelatinekapseln oder einer vergleichbaren Methode. Flüssigkeiten können unverdünnt oder aufgelöst in einem geeigneten Vehikel wie z. B. Maisöl verabreicht werden. Feste Substanzen sollten nach Möglichkeit aufgelöst werden, da größere Dosen fester Stoffe in Gelatinekapseln möglicherweise nicht wirksam resorbiert werden. Bei nichtwässrigen Vehikeln sollten deren toxische Eigenschaften bekannt sein. Ist dies nicht der Fall, müssen sie vor der Prüfung bestimmt werden.

1.5.2. **Prüfbedingungen**

1.5.2.1. *Versuchstiere*

Junge erwachsene Legehennen (Gallus gallus domesticus) im Alter von 8 bis 12 Monaten werden für den Test empfohlen. Normalgroße Rassen sollten verwendet werden, und die Hennen sollten in der Regel unter Bedingungen aufgewachsen sein, unter denen sie sich frei bewegen konnten.

1.5.2.2. *Anzahl und Geschlecht*

Neben der Behandlungsgruppe sollte eine Vehikelkontrollgruppe und eine positive Kontrollgruppe getestet werden. Die Vehikelkontrollgruppe ist, abgesehen von der Verabreichung der Prüfsubstanz, genauso zu behandeln wie die Behandlungsgruppe.

Die Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sollte so bemessen sein, dass mindestens sechs Tiere zur Bestimmung biochemischer Parameter (jeweils drei Tiere zu zwei Beobachtungszeitpunkten) getötet werden können und sechs Tiere für die pathologische Untersuchung bis zum 21. Tag überleben.

Die positive Kontrollgruppe kann gleichzeitig getestet werden oder es kann sich um eine bereits zuvor untersuchte Kontrollgruppe handeln. Die Gruppe sollte aus mindestens sechs Hennen bestehen, die mit einem bekannten verzögerten Neurotoxikum behandelt wurden. Drei der Tiere sind für biochemische, drei für pathologische Untersuchungen nach Ende des Tests vorgesehen. Es empfiehlt sich eine regelmäßige Aktualisierung der Archivdaten. Neue positive Kontrolldaten sollten erarbeitet werden, wenn ein wesentlicher Aspekt des Testablaufs (z. B. Rasse, Futter, Haltungsbedingungen) vom durchführenden Labor geändert wurde.

▼B

1.5.2.3. *Dosierungen*

In einer Vorstudie an einer geeigneten Zahl von Tieren und Dosisgruppen ist die in der Hauptstudie zu verwendende Dosis zu ermitteln. Hierbei sind in der Regel einige Todesfälle erforderlich, um eine angemessene Dosis für die Hauptstudie festlegen zu können. Um aber Todesfälle durch akute cholinerge Wirkungen zu vermeiden, kann Atropin oder ein anderer schützender Wirkstoff, von dem man weiß, dass er keinen Einfluss auf verzögerte neurotoxische Wirkungen hat, verabreicht werden. Zur Abschätzung der maximalen nicht letalen Dosis der Prüfsubstanz stehen eine Reihe verschiedener Methoden zur Auswahl (siehe Methode B.1 bis). Bereits vorliegende frühere Daten für Hennen oder andere toxikologische Daten können ebenfalls bei der Wahl der Dosis von Bedeutung sein.

Die Dosis der Prüfsubstanz in der Hauptstudie sollte unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Vorstudie zur Dosisfindung sowie der oberen Grenzdosis von 2 000 mg/kg Körpergewicht möglichst hoch sein. Auch wenn Todesfälle auftreten, sollten bis zum 21. Tag genügend Tiere für die biochemischen (sechs) und die histologischen Untersuchungen (sechs) überleben. Um Todesfälle infolge akuter cholinergischer Wirkungen auszuschließen, sollte Atropin oder ein anderer schützender Wirkstoff, der nachgewiesenermaßen keinen Einfluss auf verzögerte neurotoxische Wirkungen hat, gegeben werden.

1.5.2.4. *Limit-Test*

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht pro Tag unter Verwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine Studie mit einer höheren Dosis gegebenenfalls verzichtet werden. Der Limit-Test findet allerdings keine Anwendung, wenn die Expositionswirkungen beim Menschen die Prüfung in einer höheren Dosis angezeigt erscheinen lassen.

1.5.2.5. **Beobachtungszeitraum**

Der Beobachtungszeitraum sollte 21 Tage betragen.

1.5.3. **Versuchsdurchführung**

Nach Verabreichung eines schützenden Wirkstoffs zur Verhinderung von Todesfällen durch akute cholinergische Wirkungen wird die Prüfsubstanz als Einmalgabe verabreicht.

1.5.3.1. Allgemeine Beobachtungen

Die Beobachtungen sollten unmittelbar nach der Exposition beginnen. Alle Hennen sind in den ersten beiden Tagen mehrmals am Tag und danach bis zum 21. Tag oder bis zur vorgesehenen Tötung mindestens einmal täglich zu beobachten. Alle Toxizitätszeichen, einschließlich Zeitpunkt des Beginns, Art, Schweregrad und Dauer von Verhaltensauffälligkeiten, sind zu dokumentieren. Die Ataxie wird auf einer Ordinalskala aus mindestens vier Stufen bewertet, und Paralysen werden dokumentiert. Mindestens zweimal wöchentlich sollten die für die pathologische Untersuchung vorgesehenen Hennen aus dem Käfig genommen und für einen bestimmten Zeitraum zu verstärkter motorischer Aktivität, z. B. durch Begehen einer Leiter, gezwungen werden, um die Beobachtung bereits geringster toxischer Wirkungen zu erleichtern. Moribunde Tiere und Tiere, bei denen schweres Leiden oder starke Schmerzen festgestellt werden, sollten ausgesondert, unter Verwendung einer tierschutzgerechten Methode getötet und seziert werden.

▼B

1.5.3.2. Körpergewicht

Alle Hennen müssen unmittelbar vor der Verabreichung der Prüfsubstanz und danach mindestens einmal wöchentlich gewogen werden.

1.5.3.3. Biochemische Untersuchungen

Je sechs Hennen, die nach Zufallskriterien aus der Behandlungs- und der Vehikelkontrollgruppe ausgewählt werden, sowie drei Hennen aus der positiven Kontrollgruppe (wenn diese Gruppe gleichzeitig getestet wird), sollten einige Tage nach der Gabe der Prüfsubstanz getötet werden, um Gehirn und lumbales Rückenmark zu präparieren und auf hemmende Aktivität gegen Neuropathy Target Esterase zu untersuchen. Auch die Präparation und Untersuchung des Ischiasnervengewebes auf hemmende Aktivität gegen Neuropathy Target Esterase kann aufschlussreich sein. In der Regel werden drei Tiere der Negativkontrolle sowie jeder Behandlungsgruppe nach 24 Stunden und drei nach 48 Stunden getötet, während die drei Hennen der Positivkontrolle nach 24 Stunden getötet werden sollten. Zeigt die Beobachtung der klinischen Zeichen der Intoxikation (z. B. durch Beobachtung des zeitlichen Beginns der cholinergen Zeichen), dass der toxische Wirkstoff möglicherweise ausgesprochen langsam eliminiert wird, empfiehlt es sich gegebenenfalls, von je drei Tieren zu jeweils zwei Zeitpunkten innerhalb von 24 bis spätestens 72 Stunden nach der Verabreichung der Prüfsubstanz Gewebeproben zu entnehmen.

An diesen Proben können auch Bestimmungen der Acetylcholinesterase (AChE) vorgenommen werden, wenn dies angezeigt erscheint. Allerdings kann es in vivo zur spontanen Reaktivierung von AChE kommen, so dass die Wirksamkeit der Prüfsubstanz als AChE-Hemmer unterschätzt wird.

1.5.3.4. Autopsie

Alle Versuchstiere (sowohl die nach Plan getöteten als auch die aufgrund ihres moribunden Zustands getöteten) werden einer Autopsie zur Untersuchung von Gehirn und Rückenmark unterzogen.

1.5.3.5. Histopathologische Untersuchung

Nervengewebe von Tieren, die die Beobachtungsdauer überleben und nicht für biochemische Untersuchungen vorgesehen sind, wird mikroskopisch untersucht. Die Gewebe werden in situ mittels Perfusionsverfahren fixiert. Gewebeschnitte werden unter anderem von Cerebellum (mittlere Längsebene), Medulla oblongata, Rückenmark und peripheren Nerven angefertigt. Die Rückenmarkschnitte sind vom oberen Halswirbelsegment, der mittleren thorakalen und der lumbosakralen Region zu entnehmen. Auch vom distalen Bereich des Nervus tibialis und seiner Verzweigungen zum Musculus gastrocnemius sowie vom Nervus sciaticus sollten Schnitte angefertigt werden. Die Schnitte werden mit geeigneten myelin- und axonspezifischen Färbemitteln angefärbt.

2. **DATEN**

Negative Ergebnisse für die in dieser Methode gewählten Endpunkte (Biochemie, Histopathologie und Verhaltensbeobachtung) erfordern normalerweise keine weiteren Untersuchungen auf eine verzögerte Neurotoxizität. Zweifelhafte oder unklare Ergebnisse für diese Endpunkte erfordern ggf. weitere Untersuchungen.

Die Daten für die einzelnen Tiere sollten aufgeführt werden. Ferner sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden. Daraus müssen für jede Prüfgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Anzahl der verwendeten Tiere bei Beginn der Prüfung, die Anzahl der Tiere mit Läsionen, verhaltensbezogenen oder biochemischen Wirkungen, die Arten und Schweregrade dieser Läsionen bzw. Wirkungen sowie der Anteil der von den verschiedenen Arten und Schweregraden der Läsionen bzw. Wirkungen betroffenen Tiere.

▼B

Die Ergebnisse dieser Studie sind im Hinblick auf Häufigkeit, Schweregrad und Korrelation der verhaltensbezogenen, biochemischen und histopathologischen Wirkungen sowie sonstiger verzeichneter Wirkungen in den Behandlungs- und Kontrollgruppen zu bewerten.

Die numerischen Daten sind nach Möglichkeit durch geeignete und allgemein akzeptierte statistische Verfahren auszuwerten. Diese statistischen Verfahren sollten bei der Festlegung des Designs der Studie ausgewählt werden.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht soll nach Möglichkeit folgende Angaben enthalten:

Versuchstiere:

— verwendete Rasse;

— Anzahl und Alter;

— Herkunft, Haltungsbedingungen usw.;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn.

Prüfbedingungen:

— Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz, zur Stabilität und ggf. zur Homogenität;

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;

— Angaben über Futter- und Wasserqualität;

— Begründung für die Wahl der Dosis;

— Angabe der verabreichten Dosen mit Angaben zu Vehikel, Volumen und physikalischer Form des verabreichten Stoffes;

— Identität und Angaben zur Verabreichung eventueller schützender Wirkstoffe.

3.3. Ergebnisse:

— Angaben zum Körpergewicht;

— Daten der toxischen Reaktionen nach Gruppen, einschließlich Todesfälle;

— Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);

— ausführliche Beschreibung der biochemischen Methoden und Befunde;

— Sektionsbefunde;

— ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;

— ggf. statistische Auswertung der Ergebnisse.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATUR**

Diese Methode entspricht der OHCD TG 418.

▼B

B.38. **VERZÖGERTE NEUROTOXIZITÄT PHOSPHORORGANISCHER SUBSTANZEN BEI WIEDERHOLTER GABE ÜBER 28 TAGE**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Bei der Abschätzung und Bewertung der toxischen Wirkungen von Substanzen muss auch das Potenzial bestimmter Substanzklassen für spezifische neurotoxische Wirkungen, die in anderen Toxizitätsstudien möglicherweise nicht nachweisbar sind, untersucht werden. Bei einigen phosphororganischen Verbindungen wurden verzögerte neurotoxische Wirkungen beobachtet; diese Substanzen kommen für eine Untersuchung mit der vorliegenden Methode in Frage.

In-vitro-Screening-Tests könnten verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren, die eine verzögerte Polyneuropathie hervorrufen können; allerdings lassen negative Ergebnisse von In-vitro-Studien nicht darauf schließen, dass die Prüfsubstanz kein Neurotoxikum ist.

Diese Prüfung auf verzögerte Neurotoxizität nach 28-tägiger Gabe gibt Aufschluss über mögliche Gesundheitsgefahren infolge wiederholter Exposition über einen begrenzten Zeitraum. Die Prüfung erlaubt Rückschlüsse auf die Dosis-Wirkungs-Beziehung und ermöglicht die Abschätzung einer Schwellendosis, unterhalb der keine toxische Wirkung mehr feststellbar ist (NOAEL). Mit Hilfe des NOAEL lassen sich Sicherheitskriterien für die Exposition beim Menschen festlegen.

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

1.2. DEFINITIONEN

Zu den phosphororganischen Substanzen zählen ungeladene phosphororganische Ester, Thioester oder Anhydride von Phosphinsäuren, Phosphonsäuren bzw. Phosphoramidsäuren oder die eng verwandten Thiophosphinsäuren, Thiophosphonsäuren bzw. Thiophosphoramidsäuren oder sonstige Substanzen, welche die bei dieser Substanzklasse bisweilen zu beobachtende verzögerte Neurotoxizität hervorrufen können.

Verzögerte Neurotoxizität ist ein Syndrom, das mit langsamem, verzögertem Auftreten von Ataxien, distalen Axonopathien in Rückenmarks- und peripheren Nerven sowie einer Hemmung und Alterung der Neuropathy Target Esterase (NTE) im Nervengewebe verbunden ist.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Prüfsubstanz wird 28 Tage lang einmal täglich oral an Haushühner verabreicht. Die Tiere werden bis 14 Tage nach der letzten Gabe mindestens einmal täglich auf auffälliges Verhalten, Ataxie und Paralysen hin beobachtet. Biochemische Parameter, insbesondere die Neuropathy Target Esterase (NTE), werden im allgemeinen 24 und 48 Stunden nach Verabreichung der letzten Dosis bei Hennen bestimmt, die nach Zufallskriterien aus jeder Gruppe ausgewählt werden. Zwei Wochen nach der letzten Gabe werden die verbliebenen Hennen getötet, und ausgewählte Nervengewebe werden histopathologisch untersucht.

▼B

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Vorbereitungen**

Gesunde junge erwachsene Hennen, die frei von störenden Viruserkrankungen und Arzneimitteln sind und keine Gangstörungen aufweisen, werden randomisiert, der Behandlungs- oder der Kontrollgruppe zugeteilt und für die Dauer von mindestens 5 Tagen vor Beginn der Studie an die Laborbedingungen akklimatisiert.

Die Käfige oder Gehege sollten so groß sein, dass sich die Tiere frei bewegen können und ihr Gangbild gut zu beobachten ist.

Die orale Gabe der Prüfsubstanz an 7 Tagen in der Woche sollte vorzugsweise mittels Magensonde oder Verabreichung von Gelatinekapseln erfolgen. Flüssigkeiten können unverdünnt oder aufgelöst in einem geeigneten Vehikel wie z. B. Maisöl verabreicht werden. Feste Substanzen sollten nach Möglichkeit aufgelöst werden, da größere Dosen fester Stoffe in Gelatinekapseln möglicherweise nicht wirksam resorbiert werden. Bei nichtwässrigen Vehikeln sollten deren toxische Eigenschaften bekannt sein. Ist dies nicht der Fall, müssen sie vor der Prüfung bestimmt werden.

1.4.2. **Prüfbedingungen**

1.4.2.1. *Versuchstiere*

Junge erwachsene Legehennen (Gallus gallus domesticus) im Alter von 8 bis 12 Monaten werden für den Test empfohlen. Normalgroße Rassen sollten verwendet werden, und die Hennen sollten normalerweise unter Bedingungen aufgewachsen sein, unter denen sie sich frei bewegen konnten.

1.4.2.2. *Anzahl und Geschlecht*

In der Regel sollten mindestens drei Behandlungsgruppen sowie eine Vehikelkontrollgruppe getestet werden. Die Vehikelkontrollgruppe ist, abgesehen von der Verabreichung der Prüfsubstanz, genauso zu behandeln wie die Behandlungsgruppen.

Die Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sollte so bemessen sein, dass mindestens sechs zur Bestimmung biochemischer Parameter (jeweils drei Tiere zu zwei Beobachtungszeitpunkten) getötet werden können und mindestens sechs Tiere für die pathologische Untersuchung bis 14 Tage nach der letzten Gabe überleben.

1.4.2.3. *Dosierungen*

Bei der Wahl der Dosisstufen sind die Ergebnisse einer Akutprüfung auf verzögerte Neurotoxizität sowie weitere vorliegende Daten zur Toxizität oder Kinetik der Prüfsubstanz berücksichtigt worden. Die höchste Dosis sollte so gewählt werden, dass zwar toxische Wirkungen, vorzugsweise eine verzögerte Neurotoxizität, aber keine Todesfälle oder schweres Leiden hervorgerufen werden. Anschließend sollte eine absteigende Folge von Dosisstufen gewählt werden, um dosisabhängige Wirkungen und die niedrigste Dosis ohne zu beobachtende unerwünschte Wirkungen nachzuweisen.

▼B

1.4.2.4. *Limit-Test*

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht pro Tag unter Verwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine Studie mit einer höheren Dosis gegebenenfalls verzichtet werden. Der Limit-Test findet allerdings keine Anwendung, wenn die Expositionswirkungen beim Menschen die Prüfung in einer höheren Dosis angezeigt erscheinen lassen.

1.4.2.5. *Beobachtungszeitraum*

Alle Tiere werden während der Expositionsdauer und bis 14 Tage danach mindestens täglich beobachtet, sofern sie nicht für die Sektion vorgesehen sind.

1.4.3. **Versuchsdurchführung**

Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz für die Dauer von 28 Tagen an 7 Tagen in der Woche.

1.4.3.1. *Allgemeine Beobachtungen*

Die Beobachtungen sollten unmittelbar nach Behandlungsbeginn beginnen. Alle Hennen sind an jedem der 28 Behandlungstage und an den 14 Tagen nach der letzten Gabe oder bis zur vorgesehenen Tötung mindestens einmal täglich zu beobachten. Alle Toxizitätszeichen, einschließlich Zeitpunkt ihres Beginns sowie Art, Schweregrad und Dauer, sind zu dokumentieren. Die Beobachtungen sollten auch, jedoch nicht nur, Verhaltensauffälligkeiten einschließen. Die Ataxie wird auf einer Ordinalskala aus mindestens vier Stufen bewertet, und Paralysen werden ebenfalls dokumentiert. Mindestens zweimal wöchentlich sollten die Hennen aus dem Käfig genommen und für einen bestimmten Zeitraum zu verstärkter motorischer Aktivität, z. B. durch Begehen einer Leiter, gezwungen werden, um die Beobachtung bereits geringster toxischer Wirkungen zu erleichtern. Moribunde Tiere und Tiere, bei denen schweres Leiden oder starke Schmerzen festgestellt werden, sollten ausgesondert, unter Verwendung einer tierschutzgerechten Methode getötet und seziert werden.

1.4.3.2. *Körpergewicht*

Alle Hennen müssen unmittelbar vor der ersten Gabe der Prüfsubstanz und danach mindestens einmal wöchentlich gewogen werden.

1.4.3.3. *Biochemische Untersuchungen*

Je sechs Hennen, die nach Zufallskriterien aus der Behandlungs- und der Vehikelkontrollgruppe ausgewählt werden, sollten einige Tage nach der letzten Gabe der Prüfsubstanz getötet werden, um Gehirn und lumbales Rückenmark zu präparieren und auf hemmende Aktivität gegen Neuropathy Target Esterase (NTE) zu untersuchen. Auch die Präparation und Untersuchung des Ischiasnervengewebes auf hemmende Aktivität gegen Neuropathy Target Esterase kann aufschlussreich sein. In der Regel werden drei Tiere der Kontrollgruppe sowie jeder Behandlungsgruppe nach 24 Stunden und drei 48 Stunden nach der letzten Dosis getötet. Sind aufgrund der Daten aus der Akutstudie oder aus anderen Untersuchungen (z. B. zur Toxikokinetik) andere Tötungszeiten nach der letzten Gabe der Prüfsubstanz angezeigt, sollte entsprechend vorgegangen und das geänderte Vorgehen begründet werden.

An diesen Proben können auch Bestimmungen der Acetylcholinesterase (AChE) vorgenommen werden, wenn dies angezeigt erscheint. Allerdings kann es in vivo zur spontanen Reaktivierung von AChE kommen, so dass die Wirksamkeit der Prüfsubstanz als AChE-Hemmer unterschätzt wird.

▼B

1.4.3.4. *Autopsie*

Alle Versuchstiere (sowohl die nach Plan getöteten als auch die aufgrund ihres moribunden Zustands getöteten) werden einer Autopsie zur Untersuchung von Gehirn und Rückenmark unterzogen.

1.4.3.5. *Histopathologische Untersuchung*

Nervengewebe von Tieren, die die Beobachtungsdauer überleben und nicht für biochemische Untersuchungen vorgesehen sind, wird mikroskopisch untersucht. Die Gewebe werden in situ mittels Perfusionsverfahren fixiert. Gewebeschnitte werden unter anderem von Cerebellum (mittlere Längsebene), Medulla oblongata, Rückenmark und peripheren Nerven angefertigt. Die Rückenmarkschnitte sind vom oberen Halswirbelsegment, der mittleren thorakalen und der lumbosakralen Region zu entnehmen. Auch vom distalen Bereich des Nervus tibialis und seiner Verzweigungen zum Musculus gastrocnemius sowie vom Nervus sciaticus sollten Schnitte angefertigt werden. Die Schnitte werden mit geeigneten myelin- und axonspezifischen Färbemitteln angefärbt. Die mikroskopischen Untersuchungen sind zunächst an den konservierten Geweben aller Tiere in der Kontrollgruppe sowie der höchsten Dosisgruppe vorzunehmen. Ergeben sich Anhaltspunkte für Wirkungen in der höchsten Dosisgruppe, sollte die mikroskopische Untersuchung auch bei den Hennen aus der mittleren und niedrigen Dosisgruppe erfolgen.

2. **DATEN**

Negative Ergebnisse für die in dieser Methode gewählten Endpunkte (Biochemie, Histopathologie und Verhaltensbeobachtung) erfordern normalerweise keine weiteren Untersuchungen auf eine verzögerte Neurotoxizität. Zweifelhafte oder unklare Ergebnisse für diese Endpunkte erfordern ggf. weitere Untersuchungen.

Die Daten für die einzelnen Tiere sollten aufgeführt werden. Ferner sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden. Daraus müssen für jede Prüfgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Anzahl der verwendeten Tiere bei Beginn der Prüfung, die Anzahl der Tiere mit Läsionen, verhaltensbezogenen oder biochemischen Wirkungen, die Arten und Schweregrade dieser Läsionen bzw. Wirkungen sowie der Anteil der von den verschiedenen Arten und Schweregraden der Läsionen bzw. Wirkungen betroffenen Tiere.

Die Ergebnisse dieser Studie sind im Hinblick auf Häufigkeit, Schweregrad und Korrelation der verhaltensbezogenen, biochemischen und histopathologischen Wirkungen sowie sonstiger verzeichneter Wirkungen in den Behandlungs- und Kontrollgruppen zu bewerten.

Die numerischen Daten sind nach Möglichkeit durch geeignete und allgemein akzeptierte statistische Verfahren auszuwerten. Diese statistischen Verfahren sollten bei der Festlegung des Designs der Studie ausgewählt werden.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht soll nach Möglichkeit folgende Angaben enthalten:

Versuchstiere:

— verwendete Rasse;

— Anzahl und Alter der Tiere;

— Herkunft, Haltungsbedingungen usw.;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn.

▼B

Prüfbedingungen:

— Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz, zur Stabilität und zur Homogenität;

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;

— Angaben über Futter- und Wasserqualität;

— Begründung für die Wahl der Dosis;

— Angabe der verabreichten Dosen mit Angaben zu Vehikel, Volumen und physikalischer Form des verabreichten Stoffes;

— Begründung für die Wahl anderer Zeitpunkte zur Bestimmung der biochemischen Parameter (falls nicht nach 24 und 48 Stunden).

Ergebnisse:

— Angaben zum Körpergewicht;

— Daten der toxischen Reaktionen nach Dosisstufen, einschließlich Todesfälle;

— NOAEL;

— Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);

— ausführliche Beschreibung der biochemischen Methoden und Befunde;

— Sektionsbefunde;

— ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;

— ggf. statistische Auswertung der Ergebnisse.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATUR**

Diese Methode entspricht der OECD TG 419.

▼B

## B.39. IN-VIVO-TEST ZUR UNPLANMÄSSIGEN DNA-SYNTHESE (UDS) IN SÄUGETIERLEBERZELLEN

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo (1997).

### 1.1. EINLEITUNG

Der In-vivo-Test zur unplanmäßigen DNA-Synthese in Säugetierleberzellen dient zum Nachweis von Agenzien, die in den Leberzellen der behandelten Tiere eine DNA-Reparatur auslösen (1) (2) (3) (4).

Dieser In-vivo-Test ermöglicht die Untersuchung der gentoxischen Wirkung von Chemikalien in der Leber. Der ermittelte Endpunkt deutet auf eine DNA-Schädigung und anschließende Reparatur in Leberzellen hin. Die Leber ist in der Regel Hauptort des Stoffwechsels der resorbierten Verbindungen. Sie eignet sich also gut zur In-vivo-Bestimmung einer DNA-Schädigung.

Wenn Anzeichen dafür bestehen, dass die Prüfsubstanz das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Test nicht geeignet.

Der Endpunkt der unplanmäßigen DNA-Synthese (UDS) wird durch die Bestimmung der Aufnahme markierter Nukleoside in Zellen, die keine planmäßige (S-Phasen-)DNA-Synthese durchlaufen, ermittelt. Das gängigste Verfahren ist die Bestimmung der Aufnahme von tritiummarkiertem Thymidin[3]H-TdR) durch Autoradiografie. Für In-vivo-UDS-Tests wird vorzugsweise die Leber von Ratten verwendet. Neben Lebergewebe kann auch anderes Gewebe Verwendung finden, doch ist dieses nicht Gegenstand dieser Methode.

Der Nachweis einer UDS-Reaktion hängt von der Zahl der ausgeschnittenen und ersetzten DNA-Basen am Ort der Schädigung ab. Der UDS-Test eignet sich daher insbesondere zum Nachweis der von einer Substanz induzierten „Long-patch"-Reparatur (20-30 Basen). Die „Short-patch"-Reparatur (1-3 Basen) lässt sich hingegen nur mit einem wesentlich geringeren Empfindlichkeitsgrad feststellen. Zudem können mutagene Ereignisse aus der Nichtreparatur, fehlerhaften Reparatur oder fehlerhaften Replikation der DNA-Läsionen herrühren. Das Ausmaß der UDS-Reaktion gibt keinen Aufschluss über die Genauigkeit des Reparaturprozesses. Darüber hinaus ist es möglich, dass ein Mutagen mit der DNA reagiert, die DNA-Schädigung aber nicht über einen Exzisionsreparaturprozess behoben wird. Die Tatsache, dass der UDS-Test keine spezifischen Informationen zur mutagenen Aktivität liefert, wird durch die potenzielle Empfindlichkeit dieses Endpunkts kompensiert, denn er wird im gesamten Genom ermittelt.

Siehe auch allgemeine Einleitung zu Teil B.

### 1.2. DEFINITIONEN

**In Reparatur befindliche Zellen:** Nettokörnerzahl über dem Zellkern (NNG) oberhalb eines vorher festgelegten Schwellenwerts, der von dem jeweiligen Labor zu begründen ist.

**Nettokörnerzahl über dem Zellkern (NNG):** quantitative Maßzahl der UDS-Aktivität von Zellen bei autoradiografischen UDS-Tests, errechnet durch Subtraktion der durchschnittlichen Körnerzahl über kernäquivalenten Bereichen des Zytoplasmas (CG) von der Körnerzahl über dem Zellkern (NG): NNG = NG — CG. Die NNG wird für einzelne Zellen bestimmt, dann für alle Zellen in einer Kultur, in Parallelkulturen usw.

▼B

**Unplanmäßige DNA-Synthese (UDS):** DNA-Reparatursynthese nach Ausschneiden und Entfernen des Abschnitts eines DNA-Strangs, der eine Region mit einer durch chemische Substanzen oder physikalische Agenzien induzierten Schädigung enthält.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Der In-vivo-UDS-Test an Säugetierleberzellen erbringt den Nachweis einer DNA-Reparatursynthese nach Ausschneiden und Entfernen eines DNA-Abschnitts, der eine Region mit einer durch chemische Substanzen oder physikalische Agenzien induzierten Schädigung enthält. Der Test beruht gewöhnlich auf dem Einbau von $^{3}$H-TdR in die DNA von Leberzellen, wo sich nur wenige Zellen in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Die Aufnahme von $^{3}$H-TdR wird in der Regel durch Autoradiografie bestimmt, da dieses Verfahren nicht so anfällig für eine Einwirkung durch S-Phasen-Zellen ist wie beispielsweise die Flüssigkeitsszintillationszählung (LSC).

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Vorbereitungen**

1.4.1.1. *Versuchstiere*

Gewöhnlich werden Ratten verwendet, doch kommen auch andere geeignete Säugetierarten in Frage. Es sollten junge gesunde und geschlechtsreife Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert so gering wie möglich sein und bei beiden Geschlechtern nicht mehr als ± 20 % betragen.

1.4.1.2. *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert von 50-60 % anzustreben.

1.4.1.3. *Vorbereitung der Tiere*

Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so anzuordnen, dass sich ihre Position möglichst wenig auswirkt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Vor Beginn der Studie werden die Tiere in ihren Käfigen über einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

1.4.1.4. *Prüfsubstanz/Vorbereitung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, wenn die Stabilitätsdaten gegen eine Lagerung sprechen.

1.4.2. **Prüfbedingungen**

1.4.2.1. *Lösungsmittel/Vehikel*

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

▼B

1.4.2.2. *Kontrollen*

Für jeden gesondert vorgenommenen Teil des Versuchs sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

Die als Positivkontrollen verwendeten Substanzen sollten erwiesenermaßen eine UDS bei Expositionskonzentrationen hervorrufen, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben. Positivkontrollen, die eine Stoffwechselaktivierung benötigen, sollten in Dosen verwendet werden, die eine mäßige Reaktion hervorrufen (4). Die Dosen sollten so gewählt werden, dass die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Auswerten nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

| Zeitpunkt der Probenahme | Substanz | CAS-Nr. | EINECS-Nr. |
|---|---|---|---|
| Früh (2-4 Std.) | N-Nitrosodimethylamin | 62-75-9 | 200-249-8 |
| Spät (12-16 Std.) | N-2-Fluorenylacetamid (2-AAF) | 53-96-3 | 200-188-6 |

Auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen kommen in Betracht. Es ist vertretbar, dass die Positivkontrolle auf anderem Weg als die Prüfsubstanz verabreicht wird.

1.5. VERFAHREN

1.5.1. **Anzahl und Geschlecht der Tiere**

Es ist eine ausreichende Anzahl von Tieren zu verwenden, um die natürliche biologische Schwankungsbreite der Testreaktion zu berücksichtigen. Jede Gruppe sollte mindestens 3 analysierbare Tiere umfassen. Liegt ein größerer Bestand an historischen Daten vor, so sind für die gleichzeitigen Negativ- und Positivkontrollgruppen nur 1 oder 2 Tiere erforderlich.

Wenn zum Zeitpunkt der Studie Daten aus Untersuchungen zur gleichen Spezies und Expositionsform vorliegen, die belegen, dass zwischen den Geschlechtern kein nennenswerter Unterschied der Toxizität feststellbar ist, reicht die Prüfung von Tieren nur eines — vorzugsweise des männlichen — Geschlechts aus. Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z. B. bei bestimmten pharmazeutischen Wirkstoffen, ist der Versuch an Tieren des betreffenden Geschlechts durchzuführen.

1.5.2. **Behandlungsplan**

Die Prüfsubstanzen werden in der Regel als Einmalgabe verabreicht.

1.5.3. **Dosierungen**

Im Normalfall sind mindestens zwei Dosisstufen zu verwenden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, dass höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen. Die geringere Dosis sollte in der Regel 50 % bis 25 % der hohen Dosis entsprechen.

▼B

Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen.

Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität in der Leber hervorruft (z. B. pyknotische Kerne).

1.5.4. **Limit-Test**

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Gentoxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie verzichtet werden. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

1.5.5. **Verabreichung**

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Eine intraperitoneale Injektion ist allerdings nicht zu empfehlen, da die Leber damit möglicherweise der Prüfsubstanz direkt und nicht über das Kreislaufsystem ausgesetzt wird. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von Reizstoffen oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfvolumens dadurch auf ein Mindestmaß zu reduzieren, dass eine Konzentration gewählt wird. die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

1.5.6. **Präparation der Leberzellen**

Die Präparation der Leberzellen behandelter Tiere erfolgt in der Regel 12-16 Stunden nach der Verabreichung. Im Allgemeinen ist zusätzlich eine frühere Aufarbeitung (gewöhnlich 2-4 Stunden nach der Behandlung) erforderlich, wenn nicht nach 12-16 Stunden eine eindeutige positive Reaktion vorliegt. Auf der Grundlage der toxikokinetischen Daten sind aber bei entsprechender Begründung auch Aufarbeitungen zu anderen Zeitpunkten möglich.

Kurzzeitkulturen von Säugetier-Leberzellen werden in der Regel dadurch angelegt, dass eine Perfusion der Leber in situ mit Collagenase erfolgt und es frisch gewonnenen Leberzellen ermöglicht wird, sich an eine geeignete Wachstumsfläche festzuheften. Die Leberzellen von Tieren der Negativkontrollgruppe sollten eine Lebensfähigkeit (5) von mindestens 50 % aufweisen.

1.5.7. **Bestimmung der UDS**

Frisch isolierte Säugetier-Leberzellen werden über einen angemessenen Zeitraum, z. B. 3-8 Stunden, in einem $^{3}$H-TdR enthaltenden Medium inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit sollte das Medium aus den Zellen entfernt werden, die dann mit einem überschüssiges unmarkiertes Thymidin enthaltenden Medium inkubiert werden können, um die nicht inkorporierte Radioaktivität zu verringern („cold chase“). Anschließend werden die Zellen gewaschen, fixiert und getrocknet. Bei längeren Inkubationszeiten ist eine „cold chase“ möglicherweise nicht erforderlich. Die Objektträger werden in Autoradiografieemulsion getaucht, im Dunkeln „belichtet“ (z. B. gekühlt für 7-14 Tage), entwickelt und gefärbt, und es werden die belichteten Silberkörner gezählt. Von jedem Tier werden zwei bis drei Objektträger hergestellt.

▼B

1.5.8. **Analyse**

Die Objektträgerpräparate sollten eine ausreichende Anzahl von morphologisch normalen Zellen enthalten, um eine aussagefähige Bewertung der UDS zu ermöglichen. Die Präparate werden mikroskopisch auf Zeichen offener Zytotoxizität (z. B. Pyknose, verringerte Werte der radioaktiven Markierung) untersucht.

Vor der Bestimmung der Körnerzahl sind die Objektträger zu kodieren. In der Regel werden je Tier 100 Zellen von mindestens zwei Objektträgern ausgewertet. Die Auswertung von weniger als 100 Zellen/Tier ist zu begründen. Bei der Körnerzahlbestimmung erfolgt keine Zählung der S-Phasen-Kerne, doch kann der Anteil der S-Phasen-Zellen erfasst werden.

Das Ausmaß des $^{3}$H-TdR-Einbaus im Zellkern und Zytoplasma morphologisch normaler Zellen, das an der Ablagerung von Silberkörnern ablesbar ist, sollte durch geeignete Verfahren ermittelt werden.

Die Körnerzahl wird über dem Zellkern (NG) und über kernäquivalenten Bereichen des Zytoplasmas (CG) ermittelt. Als CG-Wert kommt entweder die für den am stärksten markierten Bereich des Zytoplasmas ermittelte Körnerzahl oder der Durchschnittswert von zwei bis drei nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Bereichen in Nähe des Zellkerns in Frage. Auch andere Zählverfahren (z. B. Ganzzellenzählung) können bei entsprechender Begründung angewendet werden (6).

2. **DATEN**

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Es sind die Daten für die einzelnen Objektträger und Tiere zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden. Die Nettokörnerzahl über dem Zellkern (NNG) ist für jede Zelle, für jedes Tier und für jede Dosis und jeden Zeitpunkt zu bestimmen, indem der CG-Wert vom NG-Wert subtrahiert wird. Werden die „in Reparatur befindlichen Zellen“ gezählt, so sollten die Kriterien für die Definition der „in Reparatur befindlichen Zellen“ begründet werden und auf historischen oder gleichzeitigen Negativkontrolldaten beruhen. Numerische Ergebnisse können mit Hilfe statistischer Verfahren bewertet werden. Kommen statistische Tests zur Anwendung, so sind sie vor Durchführung der Studie auszuwählen und zu begründen.

2.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Als Beispiele für Kriterien zur Bestimmung positiver/negativer Reaktionen seien genannt:

positiv
- i) NNG Werte oberhalb eines vorher festgelegten Schwellenwerts, der auf der Grundlage von historischen Daten des Labors zu begründen ist; oder
- ii) NNG Werte, die deutlich über den Werten der gleichzeitigen Kontrolle liegen;

negativ
- i) NNG Werte, die unterhalb des historisch begründeten Schwellenwerts liegen; oder
- ii) NNG Werte, die nicht wesentlich über den Werten der gleichzeitigen Kontrolle liegen.

▼B

Es ist die biologische Relevanz der Daten zu untersuchen, d. h., es sind Parameter wie Variabilität der Tiere, Dosis-Wirkungs-Verhältnis und Zytotoxizität zu berücksichtigen. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen. Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, dass sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Ein positiver Befund des In-vivo-UDS-Tests an Säugetierleberzellen deutet darauf hin, dass die Prüfsubstanz in vivo bei Säugetierleberzellen eine DNA-Schädigung hervorruft, die in vitro durch unplanmäßige DNA-Synthese repariert werden kann. Ein negativer Befund ist ein Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine mit diesem Test nachweisbare DNA-Schädigung induziert.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Prüfsubstanz in den allgemeinen Blutkreislauf bzw. in das spezifische Zielgewebe gelangt (z. B. systemische Toxizität).

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel:

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/-Vehikel, falls bekannt.

Versuchstiere:

— Spezies/Stamm;

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

— Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe.

Prüfbedingungen:

— Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;

— Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;

— Begründung der gewählten Dosisstufen;

— Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;

— Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;

— Begründung für den Verabreichungsweg;

— ggf. Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfsubstanz in den allgemeinen Kreislauf oder in das Zielgewebe gelangt;

▼B

— ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);

— Angaben über Futter- und Wasserqualität;

— nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;

— Methoden zur Bestimmung der Toxizität;

— Methoden zur Leberzellenpräparation und -kultur;

— verwendetes autoradiografisches Verfahren;

— Anzahl der präparierten Objektträger und der ausgewerteten Zeilen;

— Bewertungskriterien;

— Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

— Mittelwerte der Körnerzahlen über dem Zellkern und über dem Zytoplasma sowie der Nettokörnerzahlen über dem Zellkern für jeden einzelnen Objektträger, jedes Tier und jede Gruppe;

— nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;

— ggf. statistische Auswertung;

— Toxizitätszeichen;

— Daten zur gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen;

— Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;

— Anzahl der „in Reparatur befindlichen Zellen“, falls ermittelt;

— Anzahl der S-Phasen-Zellen, falls ermittelt;

— Lebensfähigkeit der Zellen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res., 156,* 1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res., 189,* 123-133.

(3) Kennelly. J. C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM *Recommended Procedures. UKEMS* Subcommittee *on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo. Mutations Res.,* 312, 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initital Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/ln Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.,* 291, 21-27.

(6) Mirsalis, J. C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen,* 4, 553-562.

▼B

B.40. **IN-VITRO-PRÜFUNG AUF HAUTÄTZENDE WIRKUNG: TER-TEST (TRANSCUTANEOUS ELECTRICAL RESISTANCE TEST)**

1. **METHODE**

Diese Testmethode entspricht OECD TG 430 (2004).

1.1. EINLEITUNG

Unter hautätzender Wirkung versteht man die irreversible Schädigung eines getesteten Gewebes nach Anwendung eines Testmaterials (gemäß Definition im Weltweit harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von chemischen Substanzen und Gemischen (GHS — Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures)) (1). Die vorliegende Methode umfasst ein Verfahren, nach dem die Beurteilung der hautätzenden Wirkung nicht an lebenden Tieren durchgeführt wird.

Bei der Beurteilung der hautätzenden Wirkung wurden üblicherweise Labortiere als Versuchstiere eingesetzt (2). Bedenken hinsichtlich der Schmerzen und Leiden der hierfür verwendeten Tiere wurden bei der Überarbeitung von Testmethode B.4 berücksichtigt, mit der die hautätzende Wirkung durch alternative In-vitro-Methoden ermittelt werden kann und somit unnötige Schmerzen und Leiden vermieden werden.

Als erster Schritt auf dem Weg zur Erarbeitung alternativer Tests, die unter gesetzgeberischen Aspekten für die Prüfung auf hautätzende Wirkung eingesetzt werden können, werden Vorvalidierungsstudien (3) durchgeführt. Im Anschluss hieran erfolgte eine formelle Validierungsstudie von In-vitro-Methoden zur Beurteilung der hautätzenden Wirkung (4) (5) (6) (7) (8). Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Studien sowie weiterer Veröffentlichungen erging die Empfehlung, die nachstehenden Tests als geeignet für die In-vivo-Beurteilung auf hautätzende Wirkung einzustufen (9) (10) (11): der Test mit einem menschlichen Hautmodell (siehe Testmethode B.40 bis) sowie der TER-Test (transcutaneous electrical resistance test — die hier beschriebene Methode).

In einer Validierungsstudie und weiteren veröffentlichten Studien wurde festgestellt, dass beim TER-Test (transcutaneous electrical resistance assay) an Ratten (12) (13) zuverlässig zwischen bekannten hautätzenden Stoffen und solchen, die diese Eigenschaften nicht aufweisen, unterschieden werden kann (5) (9).

Der in der vorliegenden Methode beschriebene Test ermöglicht die Feststellung ätzend wirkender chemischer Stoffe und Gemische. Außerdem können damit Stoffe und Gemische festgestellt werden, die keine ätzende Wirkung aufweisen, wenn dies durch eine Weight-of-Evidence-Ermittlung unter Auswertung anderer vorliegender Informationen untermauert wird (z. B. pH-Struktur-Wirkungs-Beziehungen, menschliche und/oder tierische Daten) (1) (2) (11) (14). Informationen zu Hautreizungen vermittelt dieser Test nicht; außerdem ermöglicht er auch nicht die Unterkategorisierung hautätzender Stoffe gemäß den Zulässigkeitskriterien des GHS-Systems (1).

Zur umfassenden Beurteilung lokaler Wirkungen auf die Haut nach einmaliger dermaler Exposition wird empfohlen, die sequenzielle Teststrategie einzuhalten, die in der Anlage zu Testmethode B.4 (2) und im GHS-System (1) festgelegt ist. Diese Teststrategie umfasst die Durchführung von In-vitro-Tests auf hautätzende Wirkung (wie sie in dieser Methode beschrieben werden) und Hautreizungen, bevor Tests an lebenden Tieren in Betracht gezogen werden.

▼B

1.2. DEFINITION

**In-vivo-Prüfung auf hautätzende Wirkung:** Herbeiführung irreversibler Schädigung des Hautgewebes: sichtbare Nekrose durch die Epidermis und in die Dermis nach Auftragen eines Teststoffs über einen Zeitraum von bis zu vier Stunden. Hautätzende Reaktionen sind typischerweise begleitet von Geschwüren, Blutungen, blutigem Schorf sowie am Ende des 14-tägigen Beobachtungszeitraums von Verfärbungen als Folge der Ausbleichung der Haut, Bereichen vollständiger Alopezie sowie Narbenbildung. Bei der Beurteilung fragwürdiger Schädigungen ist die Histopathologie mit zu berücksichtigen.

**TER (Transcutaneous Electrical Resistance):** ein Maß für den elektrischen Widerstand der Haut, angegeben als Widerstand in Ohm. Ein einfaches und stabiles Verfahren zur Beurteilung der Sperrfunktion, indem der Ionendurchtritt durch die Haut mithilfe einer Wheatstone-Messbrücke aufgezeichnet wird.

1.3. REFERENZSTOFFE

*Tabelle 1*

**Referenzchemikalien**

| Bezeichnung | EINECS-Nr. | CAS-Nr. | |
|---|---|---|---|
| 1,2-Diaminopropan | 201-155-9 | 78-90-0 | Stark hautätzend |
| Acrylsäure | 201-177-9 | 79-10-7 | Stark hautätzend |
| 2-tert. Butylphenol | 201-807-2 | 88-18-6 | Hautätzend |
| Kaliumhydroxid(10 %) | 215-181-3 | 1310-58-3 | Hautätzend |
| Schwefelsäure (10 %) | 231-639-5 | 7664-93-9 | Hautätzend |
| Octansäure (Caprylsäure) | 204-677-5 | 124-07-02 | Hautätzend |
| 4-Amino-1,2,4-Triazol | 209-533-5 | 584-13-4 | Nicht hautätzend |
| Eugenol | 202-589-1 | 97-53-0 | Nicht hautätzend |
| Phenethylbromid | 203-130-8 | 103-63-9 | Nicht hautätzend |
| Tetrachlorethylen | 204-825-9 | 27-18-4 | Nicht hautätzend |
| Isostearinsäure | 250-178-0 | 30399-84-9 | Nicht hautätzend |
| 4-(Methylthio)-Benzaldehyd | 222-365-7 | 3446-89-7 | Nicht hautätzend |

Die meisten der in obiger Liste angegebenen Chemikalien wurden der Liste der für die internationale Validierungsstudie der CEVMA ausgewählten Chemikalien entnommen (4). Die Auswahl stützt sich auf folgende Kriterien:

i) gleiche Anzahl hautätzender und nicht hautätzender Stoffe,

▼B

ii) gewerblich erhältliche Stoffe, die die meisten maßgeblichen chemischen Klassen abdecken,

iii) Aufnahme sowohl stark hautätzender als auch weniger hautätzender Stoffe, um eine Unterscheidung nach dem Grad der hautätzenden Wirkung zu ermöglichen,

iv) Auswahl von Chemikalien, die für eine Laborverwendung geeignet sind, ohne dass dabei — außer der hautätzenden Wirkung — anderweitige schwer wiegende Gefahren auftreten.

1.4. PRINZIP DER TESTMETHODE

Das Testmaterial wird in einem Zweikammersystem bis zu 24 Stunden lang auf den Epidermisflächen von Hautstücken aufgebracht, wobei die Hautstücke als Trennwand zwischen den beiden Kammern fungieren. Die Hautstücke werden 28-30 Tage alten Ratten entnommen, die zuvor tierschutzgerecht getötet wurden. Hautätzende Materialien werden anhand ihrer Fähigkeit ermittelt, einen Verlust der normalen Beschaffenheit und Sperrfunktion der Hornhaut (Stratum Corneum) herbeizuführen, welcher als Senkung des TER unter einen bestimmten Schwellenwert (12) gemessen wird. Beim TER von Ratten wurde ein Grenzwert von 5 kΩ auf der Grundlage umfangreicher Datenbestände für ein breites Spektrum unterschiedlicher Chemikalien gewählt, wobei die überwiegende Mehrzahl der Werte entweder eindeutig deutlich oberhalb dieses Grenzwerts lag (oft > 10 kΩ) oder aber deutlich unterhalb dieses Werts (oft < 3 kΩ) (12). Im Allgemeinen sinkt der TER bei Materialien, die bei Tieren nicht hautätzend wirken, aber hautreizende bzw. nicht hautreizende Eigenschaften aufweisen, nicht bis unter diesen Schwellenwert. Außerdem kann sich durch die Verwendung anderer Hautherstellungen oder anderer Testgeräte der Schwellenwert verändern, wodurch eine zusätzliche Validierung notwendig wird.

Im Testverfahren ist zur Bestätigung der Tests auf positive Ergebnisse im TER (einschließlich Werten um ca. 5 kΩ) ein Farbbindungsschritt vorgesehen. Durch den Farbbindungsschritt wird festgestellt, ob die steigende Ionenpermeabilität auf die materielle Zerstörung der Hornhaut (Stratum Corneum) zurückzuführen ist. Durch die TER-Methode mit Rattenhaut konnte eine gute Vorhersagegenauigkeit der hautätzenden In-vivo-Wirkung bei dem nach Testmethode B.4 (2) untersuchten Kaninchen nachgewiesen werden. Zu beachten ist dabei, dass der In-vivo-Test an Hasen hinsichtlich der hautätzenden Wirkung und Hautreizung im Vergleich zum Test mit menschlichen Hautstücken ausgesprochen konservativ angelegt ist (15).

1.5. BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.5.1. **Tiere**

Für diesen Test werden Ratten verwendet, da die Empfindlichkeit der Haut dieser Tiere gegenüber Chemikalien in diesem Test bereits früher nachgewiesen wurde (10). Alter (wenn sich die Haut vollständig gebildet hat) und Abstammung der Ratte sind von besonderer Bedeutung, damit gewährleistet ist, dass sich die Fellfollikel in der Ruhephase befinden, bevor das Fellwachstum der erwachsenen Tiere beginnt.

▼B

An den jungen, ca. 22 Tage alten männlichen oder weiblichen Ratten (Wistar-Ratten oder vergleichbare Abstammung) wird das Fell am Rücken und an den Flanken mit einem geeigneten Instrument sorgfältig geschoren. Anschließend werden die Tiere mit vorsichtigen Wischbewegungen gewaschen, wobei die geschorenen Flächen in eine Antibiotikalösung getaucht werden (die Lösung enthält beispielsweise Streptomycin, Penicillin, Chloramphenicol und Amphotericin in Konzentrationen, die ein bakterielles Wachstum verhindern). Die Tiere werden dann am dritten oder vierten Tag nach dem ersten Waschvorgang erneut gewaschen und innerhalb von 3 Tagen nach dem zweiten Waschvorgang verwendet, wenn sich die Hornhaut vom Schervorgang erholt hat.

1.5.2. **Gewinnung der Hautstücke**

Die Versuchstiere werden im Alter von 28-30 Tagen tierschutzgerecht getötet; dieses Alter ist von entscheidender Bedeutung. Die dorsal-laterale Haut der Tiere wird entfernt und von überschüssigem subkutanem Fett befreit, das von der Haut sorgfältig abgeschält wird. Es werden Hautstücke mit einem Durchmesser von je ca. 20 mm entnommen. Die Haut kann vor der Verwendung der Hautstücke eingelagert werden, wenn es sich zeigt, dass die positiven und negativen Kontrolldaten mit den an frischer Haut ermittelten Daten übereinstimmen.

Jedes Hautstück wird so über das Ende eines PTFE-(Polytetrafluorethylen)-Rohres gelegt, dass die Epidermisoberfläche auf dem Ende des Rohres aufliegt. Zur Fixierung des Hautstücks wird ein O-Ring aus Gummi straff über das Rohrende gezogen, so dass die Haut fixiert wird, und überflüssiges Hautgewebe wird abgeschnitten. Die Abmessungen des Rohrs und des O-Rings sind in Abbildung 2 angegeben. Der O-Ring wird sodann mit gereinigter Naturvaseline zum Ende des PTFE-Rohrs hin gründlich abgedichtet. Das Rohr wird durch eine Federklemme in einer Rezeptorkammer gehalten, die Magnesiumsulfatlösung (154 mM) enthält (Abbildung 1). Das Hautstück ist vollständig in die $MgSO_4$-Lösung einzutauchen. Aus einer einzigen Rattenhaut können bis zu 10-15 Hautstücke entnommen werden.

Vor Beginn der Tests wird zu Qualitätssicherungszwecken bei jeder Tierhaut der elektrische Widerstand an zwei Hautstücken gemessen. Beide Hautstücke müssen einen Widerstand von mehr als 10 kΩ für die übrigen für den Test verwendeten Hautstücke aufweisen. Liegt der Widerstand unter 10 kΩ, sind die übrigen Hautstücke der betreffenden Tierhaut zu vernichten.

1.5.3. **Aufbringen der Test- und Kontrollsubstanzen**

Für jede Studie sind gleichzeitige Positiv- und Negativ-Kontrollen zu verwenden, um eine angemessene Eignung des Experimentalmodells sicherzustellen. Es sind Hautstücke eines einzigen Tieres zu verwenden. Als Positiv- und Negativ-Kontrollsubstanzen werden 10 M Chlorwasserstoffsäure bzw. destilliertes Wasser zu verwenden.

Die flüssigen Testsubstanzen (150 µl) werden im Rohrinneren gleichmäßig auf die epidermale Oberfläche aufgebracht. Bei Tests an Feststoffen wird eine ausreichende Menge des Feststoffs gleichmäßig auf das Hautstück aufgebracht, so dass gewährleistet ist, dass die gesamte Epidermisoberfläche bedeckt ist. Auf den Feststoff wird entionisiertes Wasser (150 µl) aufgebracht und das Rohr vorsichtig bewegt. Um optimalen Kontakt der Testsubstanzen mit der Haut zu erreichen, müssen einige Feststoffe gegebenenfalls auf 30 °C erwärmt werden, so dass die Testsubstanz schmilzt oder weich wird, oder die Testsubstanz muss zu einem Granulat oder Pulver zermahlen werden.

▼B

Für jede Test- und Kontrollsubstanz werden je drei Hautstücke verwendet. Die Testsubstanzen werden 24 Stunden lang bei 20-23 ºC aufgebracht. Die Testsubstanz wird durch Waschen unter fließendem Wasser bei maximal 30 ºC gewaschen, bis kein weiteres Material mehr entfernt werden kann.

1.5.4. **TER-Messungen**

Der Hautwiderstand wird als TER mit einer Wheatstone'schen Wechselstrom-Messbrücke mit niedriger Spannung gemessen (13). Die Kenndaten der Messbrücke lauten: Betriebsspannung 1-3 Volt, sinus- oder rechteckförmiger Wechselstrom mit 50-1 000 Hz, Messbereich mindestens 0,1-30 kΩ. Die in der Validierungsstudie verwendete Datenbrücke misst Induktivität, Kapazität und Widerstand bis 2 000 H, 2 000 µF bzw. 2 MΩ bei Frequenzen von 100 Hz oder 1 kHz unter Verwendung serieller oder paralleler Werte. Für die TER-Messungen werden Messungen der hautätzenden Wirkung in Widerständen bei einer Frequenz von 100 Hz und unter Verwendung serieller Werte verwendet. Vor der Messung des elektrischen Widerstands wird die Oberflächenspannung der Haut durch Zugabe einer ausreichenden Menge von 70 %igem Ethanol verringert, so dass die Epidermis bedeckt ist. Nach einigen Sekunden wird das Ethanol aus dem Rohr entfernt und das Hautgewebe durch Hinzufügen von 3 ml $MgSO_4$-Lösung (154 mM) befeuchtet. Zur Messung des Widerstands in kΩ/Hautstück (Abbildung 1) werden die Elektroden der Datenbrücke auf beiden Seiten des Hautstücks angebracht. Die Gesamtabmessungen der Elektroden sowie die Länge der Elektrode unterhalb der Abgreifklemmen sind in Abbildung 2 dargestellt. Die an der Innenelektrode angebrachte Abgreifklemme liegt während der Widerstandsmessung oben auf dem PTFE-Rohr auf, so dass stets eine gleich bleibende Elektrodenlänge in die $MgSO_4$-Lösung eingetaucht bleibt. Die äußere Elektrode ist in der Rezeptorkammer so angeordnet, dass sie am Kammerboden ansteht. Der Abstand zwischen der Federklemme und dem unteren Ende des PTFE-Rohrs bleibt konstant (Abbildung 2), da dieser Abstand den erzielten Widerstandswert beeinflusst. Folglich muss auch der Abstand zwischen der Innenelektrode und dem Hautstück konstant und möglichst gering sein (1-2 mm).

Ist der gemessene Widerstand größer als 20 kΩ, so kann dies daran liegen, dass ein Rest der Testsubstanz die Epidermisoberfläche des Hautstücks bedeckt. Zur weiteren Entfernung dieser Schicht kann beispielsweise versucht werden, das PTFE-Rohr mit dem durch einen Gummihandschuh geschützten Daumen zu verschließen und das Rohr ca. 10 Sekunden lang zu schütteln; anschließend wird die $MgSO_4$–Lösung weggeschüttet und die Widerstandsmessung mit frischer $MgSO_4$-Lösung wiederholt.

Eigenschaften und Abmessungen der Testapparatur und das verwendete Versuchsverfahren können die ermittelten TER-Werte beeinflussen. Der Schwellenwert von 5 kΩ für hautätzende Wirkung wurde aus Daten entwickelt, die mit der/dem in dieser Methode beschriebenen speziellen Versuchsanordnung und Versuchsverfahren ermittelt wurden. Abweichende Schwellen- und Kontrollwerte gelten möglicherweise, wenn sich die Testbedingungen ändern oder eine andere Versuchsanordnung verwendet wird. Daher müssen die Schwellenwerte für die Methodik und den Widerstand durch Prüfung einer Reihe von Referenznormalen kalibriert werden, die aus den in der Validierungsstudie (4) (5) verwendeten Chemikalien ausgewählt wurden, oder aus Chemikalienklassen, die den untersuchten Chemikalien ähneln. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über geeignete Referenzchemikalien.

▼B

1.5.5. **Farbbindungsmethoden**

Bei bestimmten nicht hautätzenden Materialien, denen die Haut ausgesetzt ist, kann der Widerstand unter den Schwellenwert von 5 kΩ sinken, wodurch es zum Ionendurchtritt durch die Hornhaut kommt und der elektrische Widerstand absinkt (5). So können beispielsweise neutrale organische Stoffe und Chemikalien mit oberflächenaktiven Eigenschaften (u. a. Detergenzien, Emulgatoren und andere Tenside) die Hautlipide entziehen, wodurch die Trennschicht ionendurchlässiger wird. Liegen die TER-Werte der Testsubstanzen also unter oder um 5 kΩ und sind keine optischen Anzeichen einer Schädigung zu erkennen, ist eine Beurteilung des Farbeindringvermögens an den Kontroll- und behandelten Hautgeweben durchzuführen, um festzustellen, ob die ermittelten TER-Werte durch gestiegene Hautpermeabilität oder durch hautätzende Wirkung zustande kamen (3) (5). In letzterem Fall dringt, wenn eine Unterbrechung der Hornhaut vorliegt, der auf die Hautoberfläche aufgetragene Farbstoff Sulforhodamin B rasch ein und verursacht eine Verfärbung des darunter liegenden Hautgewebes. Dieser Farbstoff ist gegenüber einer breiten Palette von Chemikalien stabil und wird durch das nachstehend beschriebene Extraktionsverfahren nicht beeinflusst.

1.5.5.1. *Anwendung und Entfernung von Sulforhodamin-B-Farbstoff*

Nach der Beurteilung der TER-Tests wird das Magnesiumsulfat aus dem Röhrchen abgeschüttet und die Haut sorgfältig auf erkennbare Schäden untersucht. Sind keine erkennbaren größeren Schädigungen festzustellen, wird Farbstoff Sulforhodamin B (Acid Red 52; C.I. 45100; EINECS-Nummer 222-529-8; CAS-Nummer 3520-42-1), 150 µl in einer 10 %igen (w/v) Verdünnung in destilliertem Wasser 2 Stunden lang auf die Epidermisoberfläche jedes Hautstücks aufgetragen. Diese Hautstücke werden anschließend bei einer Temperatur bis zur Raumtemperatur unter fließendem Wasser ca. 10 Sekunden lang abgewaschen, um überschüssige/ungebundene Farbe zu entfernen. Jedes Hautstück wird sorgfältig vom PTFE-Rohr entfernt und in ein Gefäß (z. B. ein 20-ml-Szintillationsfläschchen) eingelegt, das entionisiertes Wasser (8 ml) enthält. Die Fläschchen werden 5 Minuten lang vorsichtig geschüttelt, um restliche ungebundene Farbe zu entfernen. Nach Wiederholung des Spülvorgangs werden die Hautstücke entnommen und in Fläschchen eingelegt, die 5 ml 30 %iges (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in destilliertem Wasser enthalten, und über Nacht bei 60 °C aufbewahrt.

Nach dieser Inkubation werden die einzelnen Hautstücke entnommen und entsorgt und die verbleibende Lösung 8 Minuten lang bei 21 °C zentrifugiert (relative Zentrifugalkraft ~175 × g). Eine 1-ml-Probe des oberflächenaktiven Stoffs wird 1:5 (v/v) (d. h. 1 ml + 4 ml) mit 30 %igem (w/v) SDS in destilliertem Wasser verdünnt. Die optische Dichte (OD) der Lösung wird bei 565 nm gemessen.

1.5.5.2. *Berechnung des Farbgehalts*

Der Gehalt an Sulforhodamin-B-Farbstoff je Hautstück wird mittels der OD-Werte (5) berechnet (molarer Extinktionskoeffizient von Sulforhodamin B bei 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$, Molekulargewicht = 580). Der Farbstoffgehalt wird für jedes der drei Hautstücke durch eine entsprechende Kalibrierungskurve bestimmt und dann der mittlere Farbstoffgehalt für die Wiederholungs-Gleichtests berechnet.

2. **DATEN**

Die Widerstandswerte (kΩ) und ggf. der mittlere Farbstoffgehalt (µg/Hautstück) für das Testmaterial sowie für Positiv- und Negativkontrollen sind in Tabellenform (Einzelversuchsdaten und Mittelwerte ± statistische Abweichung) einschließlich der Daten für Wiederholungs-Gleichtests und Mehrfachbestimmungen sowie der Mittelwerte und Einzelwerte in Berichten zusammenzufassen.

▼B

2.1. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die mittleren TER-Werte werden akzeptiert, wenn die Ergebnisse der gleichzeitigen Positiv- und Negativkontrollen innerhalb der akzeptablen Bereiche für die Methode im Testlabor liegen. Die akzeptablen Widerstandsbereiche für die oben beschriebene Methode und Versuchsanordnung lauten wie folgt:

| Kontrolle | Substanz | Widerstandsbereich (kΩ) |
|---|---|---|
| Positiv | 10M Chlorwasserstoffsäure | 0,5 - 1,0 |
| Negativ | Destilliertes Wasser | 10-25 |

Die ermittelten Mittelwerte der Farbbindung werden nur akzeptiert, sofern die Ergebnisse der gleichzeitig getesteten Kontrollen innerhalb definierter Akzeptanzgrenzen der betreffenden Methode liegen. Für die Kontrollsubstanzen der oben beschriebenen Methodik und Versuchsanordnung werden folgende Akzeptanzbereiche vorgeschlagen:

| Kontrolle | Substanz | Farbgehaltsbereich (µg/Hautstück) |
|---|---|---|
| Positiv | 10M Chlorwasserstoffsäure | 40-100 |
| Negativ | Destilliertes Wasser | 15-35 |

Die Testsubstanz gilt als nicht hautätzend:

i) wenn der Mittelwert des für die Testsubstanz ermittelten TER-Werts größer als 5 kΩ ist oder

ii) wenn der Mittelwert des TER-Werts gleich 5 kΩ oder kleiner ist und

— das Hautstück keine wahrnehmbaren Veränderungen erkennen lässt, und

— der mittlere Farbstoffgehalt des Hautstücks deutlich unter dem mittleren Farbstoffgehalt des Hautstücks der gleichzeitig mit 10M HCl durchgeführten Positivkontrolle liegt.

Die Testsubstanz gilt als hautätzend:

i) wenn der Mittelwert des TER-Werts gleich 5 kΩ oder kleiner ist und das Hautstück offensichtliche Schädigungen aufweist oder

ii) wenn der Mittelwert des TER-Werts gleich 5 kΩ oder kleiner ist und

— das Hautstück keine offensichtlichen Schädigungen aufweist, aber

— der mittlere Farbstoffgehalt größer oder gleich dem mittleren Farbstoffgehalt der gleichzeitig mit 10M HCl ermittelten Positivkontrolle ist.

▼B

3. **BERICHTERSTATTUNG**

3.1. TESTBERICHT

Der Testbericht muss folgende Informationen enthalten:

Test- und Kontrollsubstanzen:

— chemische Bezeichnung(en) wie IUPAC oder CAS-Bezeichnung und CAS-Nummer, sofern bekannt;

— Reinheit und Zusammensetzung der Substanz oder Zubereitung (in Gewichts- %), physikalische Eigenschaften;

— physikalisch-chemische Eigenschaften wie physikalischer Zustand, pH-Wert, Stabilität, Wasserlöslichkeit, die für die Durchführung der Untersuchung relevant sind;

— Behandlung der Test-/Kontrollsubstanzen vor dem Test, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);

— Stabilität, sofern bekannt.

Versuchstiere:

— Abstammung und Geschlecht;

— Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Verwendung als Spendertiere;

— Herkunft, Unterbringungsbedingungen, Ernährung usw.;

— Details der Herstellung der Hautstücke.

Testbedingungen:

— Eichkurven für die Versuchsapparaturen;

— Eichkurven für die Durchführung des Farbbindungstests;

— Details des Testverfahrens für die TER-Messungen;

— Details des Testverfahrens für die Beurteilung der Farbbindefähigkeit (sofern relevant);

— Beschreibung etwaiger an den Testverfahren vorgenommener Änderungen;

— Beschreibung der zugrunde gelegten Beurteilungskriterien.

Ergebnisse:

— Darstellung der Daten der TER- und Farbbindungstests in Tabellenform (sofern relevant) für Einzeltiere und einzelne Hautproben;

— Beschreibung etwaiger beobachteter Wirkungen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

(2) Testmethode B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/Corrosion (Akute Toxizität: Hautreizung/hautätzende Wirkung).

(3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.

(4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, 471-482.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 12, 483-524.

(6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62 S.

(7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

(8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

(9) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(10) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

(11) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st –2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27. März 2002, OECD ENV/EHS; auf Anfrage beim Sekretariat erhältlich.

(12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507-512.

▼B

(13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro:* results of an inter-laboratory trial. Toxic, in Vitro 6, 191-194.

(14) Worth A.P, Fentem J.H., Balls M, Botham P.A, Curren R.D, Earl L.K, Esdaile D.J, Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

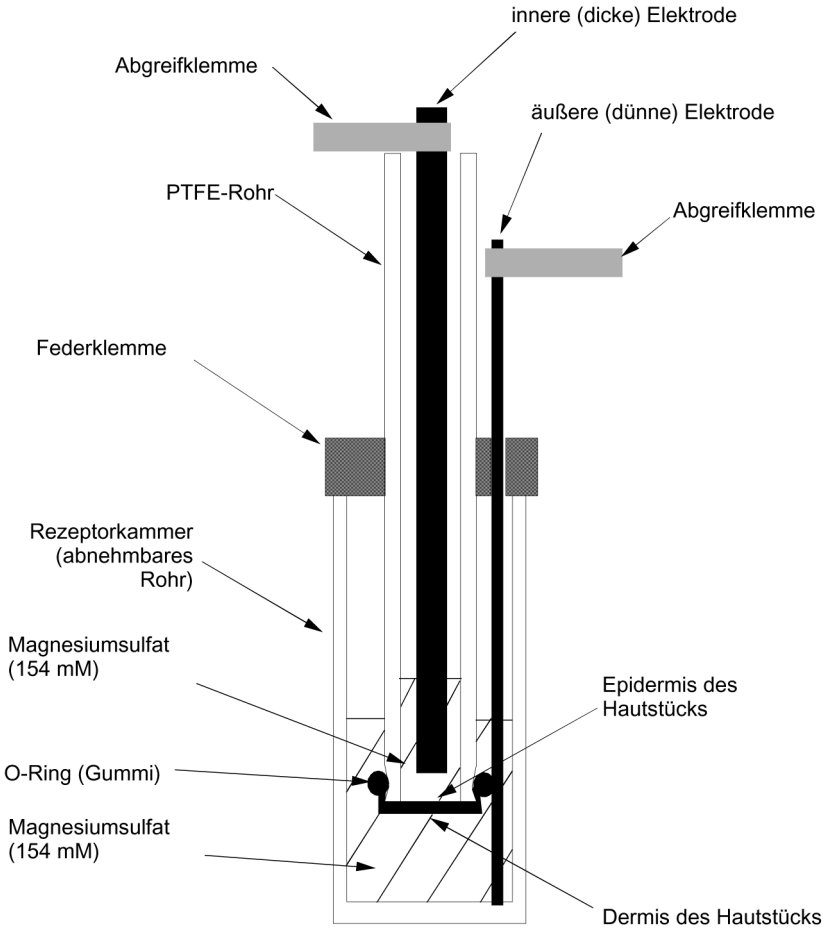
(15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845-852.

(16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A. and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxic, in Vitro. 2, 7-17.

▼B

*Abbildung 1*

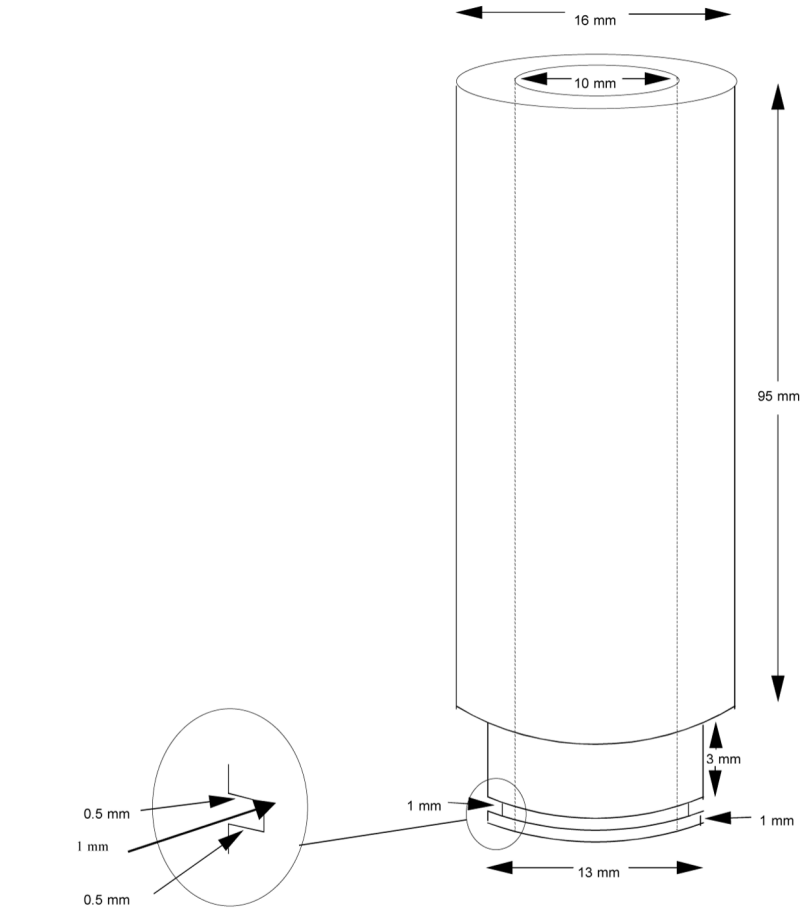
**Apparatur für den TER-Test mit Rattenhaut**

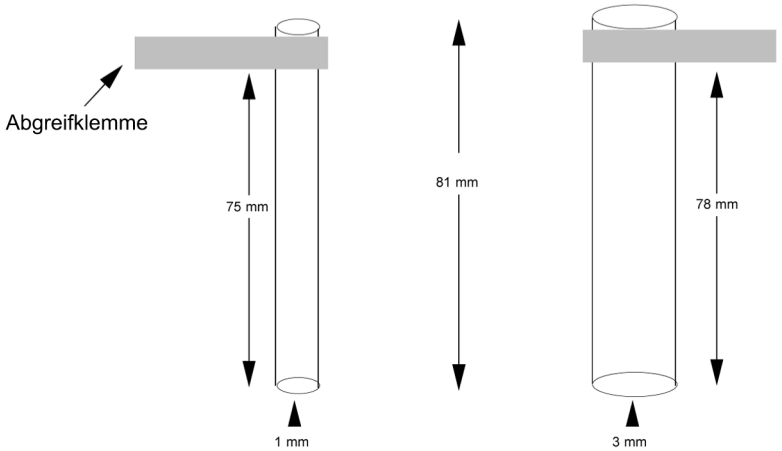


▼B

*Abbildung 2*

**Abmessungen der Polytetrafluorethylen- (PFTE-) und Rezeptorrohre und der verwendeten Elektroden**



▼B

**Kritische Faktoren der obigen Apparaturen**

— Innendurchmesser des PTFE-Rohrs,

— Länge der Elektroden in Relation zum PTFE-Rohr und zum Rezeptorrohr, so dass die Hautscheibe nicht mit den Elektroden in Kontakt kommt und die Elektrode auf einer Standardlänge mit der $MgSO_4$-Lösung in Kontakt steht,

— die Menge an $MgSO_4$-Lösung im Rezeptorrohr muss in Relation zum Füllstand im PTFE-Rohr den in Abbildung 1 dargestellten Flüssigkeitsstand ergeben,

— das Hautstück muss so am PTFE-Rohr befestigt sein, dass der elektrische Widerstand ein richtiges Maß für die Hauteigenschaften darstellt.

▼B

B.40.bis. **IN-VITRO-PRÜFUNG AUF HAUTÄTZENDE WIRKUNG: TEST MIT MENSCHLICHEM HAUTMODELL**

1. **METHODE**

Diese Testmethode entspricht OECD TG 431 (2004).

1.1. EINLEITUNG

Unter hautätzender Wirkung versteht man die irreversible Schädigung eines getesteten Gewebes nach Anwendung eines Testmaterials (gemäß Definition im weltweit harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von chemischen Substanzen und Gemischen (GHS — Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures)) (1). Bei dieser Testmethode ist die Verwendung lebender Tiere oder tierischen Gewebes für die Beurteilung der hautätzenden Wirkung nicht erforderlich.

Bei der Beurteilung der hautätzenden Wirkung wurden üblicherweise Labortiere als Versuchstiere eingesetzt (2). Bedenken hinsichtlich der Schmerzen und Leiden der hierfür verwendeten Tiere wurden bei der Überarbeitung von Testmethode B.4 berücksichtigt, mit der die hautätzende Wirkung durch alternative In-vitro-Methoden ermittelt werden kann und somit unnötige Schmerzen und Leiden vermieden werden.

Als erster Schritt auf dem Weg zur Erarbeitung alternativer Tests, die unter gesetzgeberischen Aspekten für die Prüfung auf hautätzende Wirkung eingesetzt werden können, wurden Vorvalidierungsstudien (3) durchgeführt. Im Anschluss hieran erfolgte eine formelle Validierungsstudie von In-vitro-Methoden zur Beurteilung der hautätzenden Wirkung (4) (5) (6) (7) (8). Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Studien sowie weiterer Veröffentlichungen (9) erging die Empfehlung, die nachstehenden Tests als geeignet für die In-vivo-Beurteilung auf hautätzende Wirkung einzustufen (10) (11) (12) (13): den Test mit einem menschlichen Hautmodell (die hier beschriebene Testmethode) sowie den TER-Test (transcutaneous electrical resistance test — siehe Testmethode B.40).

In Validierungsstudien wurde festgestellt, dass bei Tests mit dem menschlichen Hautmodell (3) (4) (5) (9) zuverlässig zwischen bekannten hautätzenden Stoffen und solchen, die diese Eigenschaften nicht aufweisen, unterschieden werden kann. Das Testprotokoll kann auch Angaben zur Unterscheidung zwischen stark und weniger stark hautätzend wirkenden Substanzen liefern.

Der in der vorliegenden Methode beschriebene Test ermöglicht die Feststellung ätzend wirkender chemischer Stoffe und Gemische. Außerdem können damit Stoffe und Gemische festgestellt werden, die keine ätzende Wirkung aufweisen, wenn dies durch eine Weight-of-Evidence-Ermittlung unter Auswertung anderer vorliegender Informationen untermauert wird (z. B. pH, Struktur-Wirkungs-Beziehungen, menschliche und/oder tierische Daten) (1) (2) (13) (14). Informationen zu Hautreizungen vermittelt dieser Test normalerweise nicht; außerdem ermöglicht er auch nicht die Unterkategorisierung hautätzender Stoffe gemäß den Zulässigkeitskriterien des GHS-Systems (1).

Zur umfassenden Beurteilung lokaler Wirkungen auf die Haut nach einmaliger dermaler Exposition wird empfohlen, die sequenzielle Teststrategie einzuhalten, die in der Anlage zu Testmethode B.4 (2) und im GHS-System (1) festgelegt ist. Diese Teststrategie umfasst die Durchführung von In-vitro-Tests auf hautätzende Wirkung (wie sie in dieser Methode beschrieben werden) und Hautreizungen, bevor Tests an lebenden Tieren in Betracht gezogen werden.

▼B

1.2. DEFINITIONEN

**In-vivo-Prüfung auf hautätzende Wirkung:** Herbeiführung irreversibler Schädigung des Hautgewebes: sichtbare Nekrose durch die Epidermis und in die Dermis nach Auftragen eines Teststoffs über einen Zeitraum von bis zu 4 Stunden. Hautätzende Reaktionen sind typischerweise begleitet von Geschwüren, Blutungen, blutigem Schorf sowie am Ende des 14-tägigen Beobachtungszeitraums von Verfärbungen als Folge der Ausbleichung der Haut, Bereichen vollständiger Alopezie sowie Narbenbildung. Bei der Beurteilung fragwürdiger Schädigungen ist die Histopathologie mit zu berücksichtigen.

**Viabilität der Zellen:** Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellenpopulation (z. B. Fähigkeit der zellulären mitochondrialen Dehydrogenasen, die lebenswichtige Farbstoff-MTT zu reduzieren), die je nach gemessenem Endpunkt und verwendetem Testaufbau mit der Gesamtzahl und/oder Vitalität der Zellen korreliert.

1.3. REFERENZSTOFFE

*Tabelle 1*

**Referenzchemikalien**

| Bezeichnung | EINECS-Nr. | CAS-Nr. | |
|---|---|---|---|
| 1,2-Diaminopropan | 201-155-9 | 78-90-0 | Stark hautätzend |
| Acrylsäure | 201-177-9 | 79-10-7 | Stark hautätzend |
| 2-tert. Butylphenol | 201-807-2 | 88-18-6 | Hautätzend |
| Kaliumhydroxid (10 %) | 215-181-3 | 1310-58-3 | Hautätzend |
| Schwefelsäure (10 %) | 231-639-5 | 7664-93-9 | Hautätzend |
| Octansäure (Caprylsäure) | 204-677-5 | 124-07-02 | Hautätzend |
| 4-Amino-1,2,4-Triazol | 209-533-5 | 584-13-4 | Nicht hautätzend |
| Eugenol | 202-589-1 | 97-53-0 | Nicht hautätzend |
| Phenethylbromid | 203-130-8 | 103-63-9 | Nicht hautätzend |
| Tetrachlorethylen | 204-825-9 | 27-18-4 | Nicht hautätzend |
| Isostearinsäure | 250-178-0 | 30399-84-9 | Nicht hautätzend |
| 4-(Methylthio)-Benzaldehyd | 222-365-7 | 3446-89-7 | Nicht hautätzend |

Die meisten der in obiger Liste angegebenen Chemikalien wurden der Liste der für die internationale Validierungsstudie der CEVMA ausgewählten Chemikalien entnommen (4). Die Auswahl stützt sich auf folgende Kriterien:

i) gleiche Anzahl hautätzender und nicht hautätzender Stoffe,

ii) gewerblich erhältliche Stoffe, die die meisten maßgeblichen chemischen Klassen abdecken,

iii) Aufnahme sowohl stark hautätzender als auch weniger hautätzender Stoffe, um eine Unterscheidung nach dem Grad der hautätzenden Wirkung zu ermöglichen,

▼B

iv) Auswahl von Chemikalien, die für eine Laborverwendung geeignet sind, ohne dass dabei — außer der hautätzenden Wirkung — anderweitige schwer wiegende Gefahren auftreten.

1.4. PRINZIP DER TESTMETHODE

Die Testsubstanz wird topisch auf ein dreidimensionales Modell menschlicher Haut aufgebracht, das mindestens eine rekonstruierte Epidermis mit funktionsfähiger Hornhaut aufweist. Ätzende Materialien werden aufgrund ihrer Fähigkeit ermittelt, bei einer spezifischen Expositionsdauer eine Verringerung der Viabilität (Lebensfähigkeit) der Zellen (dies kann beispielsweise mit dem MTT-Reduktionstest festgestellt werden (15)) unter festgelegte Schwellenwerte herbeizuführen. Dieses Testprinzip basiert auf der Hypothese, dass ätzende Chemikalien in der Lage sind, durch Diffusion oder Erosion die Hornhaut zu durchdringen, und darüber hinaus eine zytotoxische Wirkung auf die darunter liegenden Zellschichten ausüben.

1.4.1. **Testverfahren**

1.4.1.1. *Modelle menschlicher Haut*

Modelle menschlicher Haut können gewerblich aufgebaut oder bezogen werden (z. B. die Modelle EpiDerm™ und EPISKIN™) (16) (17) (18) (19) oder im Versuchslabor entwickelt oder aufgebaut werden (20) (21). Es versteht sich, dass die Verwendung menschlicher Haut einzelstaatlichen und internationalen ethischen Kriterien und Auflagen unterliegt. Jedes neue Modell ist zu validieren (mindestens in dem unter 1.4.1.1.2 beschriebenen Umfang). Modelle menschlicher Haut, die für diese Tests verwendet werden, müssen folgende Auflagen erfüllen:

1.4.1.1.1. Allgemeine Bedingungen für die Modelle

Die Epithelschicht ist aus menschlichen Keratinozyten aufzubauen. Unter der funktionsfähigen Hornhaut müssen mehrere Lagen lebensfähiger Epithelzellen vorhanden sein. Das Hautmodell kann außerdem eine Schicht aus Stromalkomponenten aufweisen. Die Hornhaut muss aus mehreren Schichten bestehen und das notwendige Lipidprofil für den Aufbau einer funktionsfähigen Sperre aufweisen, die gegen das rasche Durchdringen zytotoxischer Markerstoffe beständig ist. Die Rückhalteeigenschaften des Modells müssen so gestaltet sein, dass der Durchtritt von Material rund um die Hornhaut in das lebensfähige Gewebe verhindert wird. Durch den Durchtritt der Testchemikalien um die Hornhaut kommt es zu einer mangelhaften Modellierung der Einwirkung auf die Haut. Das Hautmodell muss frei von bakterieller Kontamination (einschließlich Mykoplasma) und Pilzkontamination sein.

1.4.1.1.2. Bedingungen für das Funktionsmodell

Die Größenordnung der Viabilität wird normalerweise durch die MTT oder andere metabolisch konvertierte vitale Farbstoffe quantifiziert. In diesen Fällen muss die optische Dichte (OD) des extrahierten (solubilisierten) Farbstoffs des negativen Kontrollgewebes mindestens dem Zwanzigfachen der OD des Extraktionslösemittels entsprechen (siehe Übersicht unter (22)). Das negative Kontrollgewebe muss während der Testexpositionsdauer in der Kultur stabile Eigenschaften aufweisen (d. h. zu ähnlichen Viabilitätsmessergebnissen führen). Die Hornhaut muss so robust sein, dass sie gegen das rasche Eindringen bestimmter zytotoxischer Markerchemikalien (z. B. 1 % Triton X-100) ausreichend beständig ist. Diese Eigenschaft kann anhand der Expositionszeit bestimmt werden, die notwendig ist, um die Zellviabilität um 50 % ($ET_{50}$) zu reduzieren (bei den Modellen EpiDerm™ und EPISKIN™ liegt sie beispielsweise bei > 2 Stunden). Die Reproduktionsfähigkeit des Gewebes muss im zeitlichen Verlauf und vorzugsweise zwischen den Labors nachgewiesen werden. Darüber hinaus muss das Gewebe sich für die Vorhersage der hautätzenden Eigenschaften der Referenzchemikalien (siehe Tabelle 1) bei Verwendung im ausgewählten Testprotokoll eignen.

▼B

1.4.1.2. *Anwendung der Test- und Kontrollsubstanzen*

Für jede Behandlung (Expositionszeit) einschließlich der Kontrollen werden zwei Wiederholungs-Gleichtests des Gewebes verwendet. Bei flüssigen Materialien muss eine ausreichende Menge der Testsubstanz gleichmäßig aufgetragen werden, so dass die Hautoberfläche bedeckt ist; hierfür ist eine Mindestmenge von 25 µl/cm$^2$ zu verwenden. Bei Feststoffen ist eine ausreichende Menge der Testsubstanz gleichmäßig aufzutragen, so dass die Haut gleichmäßig bedeckt ist, und anschließend mit entionisiertem oder destilliertem Wasser zu befeuchten, so dass guter Kontakt mit der Haut gewährleistet ist. Soweit zweckmäßig, sind Feststoffe vor der Applikation zu einem Pulver zu mahlen. Es ist eine für die Testsubstanz geeignete Applikationsmethode zu wählen (siehe beispielsweise (5)). Am Ende der Expositionszeit ist das Testmaterial mit einer geeigneten Pufferlösung oder 0,9 %iger NaCl-Lösung sorgfältig von der Hautoberfläche abzuwaschen.

Zu jeder Studie sind gleichzeitige Positiv- und Negativkontrollen durchzuführen, damit eine angemessene Eignung des Experimentalmodells gewährleistet ist. Als Substanz für die Positivkontrolle wird Eisessig oder 8N KOH empfohlen. Als Substanz für die Negativkontrollen wird 0,9 %ige NaCl-Lösung oder Wasser empfohlen.

1.4.1.3. *Messungen der Zellviabilität*

Zur Messung der Zellviabilität dürfen nur quantitative, validierte Methoden eingesetzt werden. Außerdem muss das Maß für die Viabilität mit der Verwendung in einem dreidimensionalen Gewebekonstrukt kompatibel sein. Eine unspezifische Farbstoffbindung darf die Viabilitätsmessung nicht beeinträchtigen. Protein-Bindefarbstoffe und solche Farbstoffe, bei denen keine metabolische Konversion erfolgt (z. B. Neutralrot), sind daher nicht geeignet. Der am häufigsten verwendete Test ist die MTT-Reduktion — 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyltetrazol-Bromid, Thiazolylblau: EINECS-Nummer 206-069-5, CAS-Nummer 298-93-1 —, die nachweislich genaue und reproduzierbare Ergebnisse liefert (5); allerdings ist auch die Verwendung anderer Substanzen zulässig. Die Hautprobe wird ca. 3 Stunden in eine MTT-Lösung geeigneter Konzentration (z. B. 0,3-1 mg/ml) bei einer geeigneten Inkubationstemperatur eingelegt. Die blaue Formazonausfällung wird anschließend mit einem Lösemittel (Isopropanol) extrahiert und die Formazonkonzentration durch Bestimmung des OD-Wertes bei einer Wellenlänge zwischen 540 und 595 nm gemessen.

Die chemische Wirkung des Testmaterials auf den Vitalfarbstoff kann die Wirkung des Zellmetabolismus nachahmen, wodurch es zu falschen Viabilitätsschätzungen kommen kann. Derartige Erscheinungen wurden in Fällen beobachtet, in denen das Testmaterial durch Spülen nicht vollständig von der Haut entfernt wurde (9). Wenn das Testmaterial direkt auf den Vitalfarbstoff wirkt, ist durch zusätzliche Kontrollen festzustellen, ob die Testsubstanzen die Viabilitätsmessungen beeinflussen (9) (23), und es sind ggf. entsprechende Korrekturen vorzunehmen.

2. **DATEN**

Für jedes Gewebe sind die OD-Werte und die berechnete prozentuale Zellviabilität des Testmaterials, Positiv- und Negativkontrollen in Tabellenform im Bericht anzugeben, einschließlich der Daten von Mehrfachbestimmungen und Wiederholungstests sowie der Mittelwerte und Einzeldaten.

▼B

2.1. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die für jede Testprobe ermittelten OD-Werte können zur Berechnung einer prozentualen Viabilität im Vergleich zur Negativkontrolle herangezogen werden, die willkürlich gleich 100 % gesetzt wird. Der Schwellenwert der prozentualen Zellviabilität, der zur Unterscheidung zwischen ätzenden und nicht ätzenden Testsubstanzen verwendet wird (bzw. zur Differenzierung des ätzenden Potenzials in weiteren Unterklassen), oder die statistischen Verfahren zur Beurteilung der Ergebnisse und Bestimmung ätzender Materialien müssen in eindeutiger Form definiert und dokumentiert werden, und es muss die Richtigkeit dieser Werte bestätigt werden. Im Allgemeinen werden diese Schwellenwerte bei der Testoptimierung festgelegt, während einer Vorvalidierungsphase getestet und in einer Validierungsstudie bestätigt. Die Vorhersage der hautätzenden Wirkung beim EpiDerm™-Modell lautet beispielsweise (9):

Die Testsubstanz gilt als „hautätzend“:

i) wenn die Viabilität nach einer 3-minütigen Exposition weniger als 50 % beträgt oder

ii) wenn die Viabilität nach einer 3-minütigen Exposition gleich 50 % oder höher ist und die Viabilität nach einer einstündigen Exposition weniger als 15 % beträgt.

Die Testsubstanz gilt als „nicht hautätzend“:

i) wenn die Viabilität nach einer 3-minütigen Exposition gleich 50 % oder höher ist und die Viabilität nach einer einstündigen Exposition gleich 15 % oder höher ist.

3. **BERICHTERSTATTUNG**

3.1. TESTBERICHT

Der Testbericht muss folgende Informationen enthalten:

Test- und Kontrollsubstanzen:

— chemische Bezeichnung(en) wie IUPAC oder CAS-Bezeichnung und CAS-Nummer, sofern bekannt;

— Reinheit und Zusammensetzung der Substanz oder Zubereitung (in Gewichtsprozent);

— physikalisch-chemische Eigenschaften wie physikalischer Zustand, pH-Wert, Stabilität, Wasserlöslichkeit, die für die Durchführung der Untersuchung relevant sind;

— Behandlung der Test-/Kontrollsubstanzen vor dem Test, sofern relevant (z. B. Erwärmen, Mahlen);

— Stabilität, sofern bekannt.

Begründung für das verwendete Hautmodell und Protokoll.

Testbedingungen:

— verwendetes Zellsystem;

— Eichdaten für das zur Messung der Zellviabilität verwendete Messgerät (z. B. Spektrofotometer);

▼B

— umfassende Begleitinformationen für das verwendete spezifische Hautmodell (einschließlich der Validität des Modells);

— Details zum verwendeten Testverfahren;

— verwendete Testdosen;

— Beschreibung etwaiger Änderungen am Testverfahren;

— Verweis auf historische Verlaufsdaten zu dem Modell.

— Beschreibung der zugrunde gelegten Beurteilungskriterien.

Ergebnisse:

— tabellarische Darstellung der Daten aus Einzelproben;

— Beschreibung sonstiger beobachteter Wirkungen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **HINWEISE**

(1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001 doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

(2) Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/ Corrosion (akute Toxizität: Hautreizung/hautätzende Wirkung).

(3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, 219-255.

(4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, 471-482.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team Toxic. In Vitro 12, 483-524.

(6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62 S.

(7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, CA., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

(8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

(9) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C, Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C, Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, 371-401.

(10) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(11) ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365-67.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200) and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http:/iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis^rd.pdf.

(13) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, auf Anfrage beim Sekretariat erhältlich.

(14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, 709-720.

(15) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, 55-63.

(16) Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. In Vitro 8, 889-891.

(17) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211-225.

(18) Tinois E., Gaetani Q., Gayraud B., Dupont D., Rougier A., Pouradier D.X. (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In vitro Skin Toxicology. Edited by A. Rougier, A.M. Goldberg and H.I. Maibach: 133-140.

(19) Tinois E., Tiollier J., Gaucherand M., Dumas H., Tardy M., Thivolet J. (1991). In vitro and post -transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193, 310-319.

(20) Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163-171.

(21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747-756.

▼B

(22) Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 69-84.

(23) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C, Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. InVitro 15, 57-93.

▼B

B.41. **IN-VITRO-3T3-NRU-FOTOTOXIZITÄTSTEST**

1. **METHODE**

Diese Methode entspricht OECD TG 432 (2004).

1.1. EINLEITUNG

Unter Fototoxizität versteht man die toxische Reaktion eines auf den Körper aufgebrachten chemischen Stoffs, die bei anschließender Lichtexposition (in einer bei niedrigerer Dosierung wahrnehmbaren Form) entsteht oder verstärkt wird oder die durch Bestrahlung der Haut nach systematischer Verabreichung eines chemischen Stoffs induziert wird.

Der In-vitro-3T3-NRU-Fototoxizitätstest dient zur Erfassung des fototoxischen Potenzials einer Testsubstanz, das nach Lichtexposition durch die erkannte Chemikalie induziert wird. Bei diesem Test wird die Fotozytotoxizität anhand der relativen Reduktion der Viabilität der Zellen, die der Chemikalie ausgesetzt sind, unter Einwirkung bzw. Nichteinwirkung von Licht beurteilt. Die durch diesen Test festgestellten Substanzen zeigen nach systemischer Verabreichung und Aufbringung auf der Haut oder nach topischer Anwendung in vivo voraussichtlich fototoxische Wirkung.

Fototoxische Wirkung wurde bei zahlreichen Arten von Chemikalien beobachtet (1) (2) (3) (4). Gemeinsames Merkmal dieser Chemikalien ist, dass sie Lichtenergie im Sonnenlichtbereich absorbieren können. Nach dem ersten fotochemischen Gesetz (dem Grotthaus-Draperschen-Gesetz) ist für eine Fotoreaktion eine ausreichende Lichtquantenabsorption erforderlich. Bevor biologische Tests in Frage kommen, muss daher nach OECD Test Guideline 101 ein UV/vis-Absorptionsspektrum der Testchemikalie ermittelt werden. Es wird davon ausgegangen, dass — wenn der molare Extinktions-/Absorptionskoeffizient unter 10 Liter × $mol^{-1}$ × $cm^{-1}$ liegt — der chemische Stoff kein fotoreaktives Potenzial besitzt. Diese Chemikalie braucht dann evtl. nicht durch den In-vitro-3T3-NRU-Fototoxizitätstest oder einen anderen biologischen Test auf schädliche fotochemische Wirkungen getestet zu werden (1) (5). Siehe auch Anlage 1.

Zuverlässigkeit und Relevanz des In-vitro-3T3-NRU-Fototoxizitätstests wurden in neuerer Zeit untersucht (6) (7) (8) (9). Es wurde nachgewiesen, dass mit dem In-vitro-3T3-NRU-Fototoxizitätstest akute fototoxische Wirkungen bei Tieren und Menschen in vivo vorhergesagt werden können. Der Test ist nicht für die Vorhersage schädlicher Wirkungen ausgelegt, die sich aus einer kombinierten Wirkung eines chemischen Stoffs und von Licht ergeben, d. h., Fotogenotoxizität, Fotoallergie oder Fotokarzinogenität und andere Erscheinungen werden durch diesen Test nicht erfasst, und auch die Beurteilung der fototoxischen Potenz ist damit nicht möglich. Auch indirekte Mechanismen der Fototoxizität, Wirkungen der Stoffwechselprodukte der Testsubstanz oder Wirkungen der Gemische deckt dieser Test nicht ab.

Die Verwendung von metabolisierenden Systemen ist bei sämtlichen In-vitro-Tests eine generelle Voraussetzung für die Vorhersage des genotoxischen und karzinogenen Potenzials; allerdings liegen bis jetzt in der Fototoxikologie nur seltene Fälle vor, in denen eine metabolische Transformation erforderlich ist, damit die Chemikalie als In-vivo- oder In-vitro-Fototoxin wirken kann. Daher ist es derzeit weder notwendig noch wissenschaftlich gerechtfertigt, dass der vorliegende Test mit einem Stoffwechselaktivierungssystem durchgeführt wird.

▼B

1.2. DEFINITIONEN

**Bestrahlungsstärke:** die Intensität des auf eine Oberfläche auftreffenden ultravioletten (UV) oder sichtbaren Lichts, gemessen in $W/m^2$ oder $mW/cm^2$.

**Lichtdosis:** die Menge (= Intensität × Zeit) der auf eine Oberfläche auftreffenden ultravioletten (UV) oder sichtbaren Strahlung, ausgedrückt in Joule (= W × s) je Fläche, z. B. $J/m^2$ oder $J/cm^2$.

**UV-Licht, Bandbreiten:** Die von der Internationalen Beleuchtungskommission (CIE) empfohlenen Bezeichnungen sind: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) und UVC (100-280 nm). Andere Bezeichnungen werden ebenfalls verwendet; die Trennung zwischen UVB und UVA erfolgt oft bei 320 nm; UVA kann in UV-A1 und UV-A2 unterteilt werden, wobei die Trennung bei ca. 340 nm liegt.

**Zellviabilität:** Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellpopulation (z. B. Aufnahme des Vitalfarbstoffs „Neutralrot" in Zell-Lysosomen), die je nach dem gemessenen Endpunkt und der angewandten Versuchsauslegung mit der Gesamtzahl und/oder der Vitalität der Zellen korreliert.

**Relative Zellviabilität:** Zellviabilität, ausgedrückt in Relation zu Negativkontrollen (Lösemittel), die das gesamte Testverfahren (entweder +Irr oder –Irr) durchlaufen, jedoch nicht mit einer Testchemikalie behandelt wurden.

**PIF (Fotoirritationsfaktor):** ein Faktor, der durch Vergleich von zwei gleich wirksamen zytotoxischen Konzentrationen ($IC_{50}$) der chemischen Testsubstanz in Abwesenheit (–Irr) und in Anwesenheit (+Irr) nicht zytotoxischer Strahlung mit UVA/vis-Licht ermittelt wird.

**$IC_{50}$**: Konzentration der Testchemikalie, bei der die Zellviabilität um 50 % reduziert wird.

**MPE (Mean Photo Effect):** eine Messgröße, die von einer mathematischen Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Kurven hergeleitet wurde, die in Abwesenheit (–Irr) und in Anwesenheit (+Irr) nicht zytotoxischer Strahlung mit UVA/vis-Licht erzielt wurden.

**Fototoxizität:** eine akute toxische Reaktion, die nach der ersten Exposition der Haut mit bestimmten chemischen Stoffen bei anschließender Lichtexposition eintritt oder die auf ähnliche Weise durch Bestrahlung der Haut nach systemischer Verabreichung eines chemischen Stoffs induziert wird.

1.3. PRINZIP DER TESTMETHODE

Der In-vitro-3T3-NRU-Fototoxizitätstest basiert auf dem Vergleich der Zytotoxizität eines chemischen Stoffs, der mit Exposition und ohne Exposition einer nicht zytotoxischen Dosis simulierten Sonnenlichts getestet wird. Die Zytotoxizität wird bei diesem Test ausgedrückt als konzentrationsabhängige Reduktion der Aufnahme des Vitalfarbstoffs Neutralrot, wenn diese 24 Stunden nach der Behandlung mit der Testchemikalie und Bestrahlung gemessen wird (10). Neutralrot (NR) ist ein schwach kationischer Farbstoff, der durch Nichtdiffusion rasch in Zellmembranen eindringt und sich intrazellulär in Lysosomen ansammelt. Veränderungen der Zellenoberfläche der sensitiven Lysosomalmembran führen zu lysosomaler Fragilität und weiteren Veränderungen, die nach und nach irreversibel werden. Derartige, durch die Wirkung von Xenobiotika verursachte Veränderungen bewirken eine verringerte Aufnahme und Bindung von Neutralrot (NR). Auf diese Weise ist eine Unterscheidung zwischen lebensfähigen (viablen), geschädigten und toten Zellen möglich; auf dieser Unterscheidung baut auch der hier beschriebene Test auf.

▼B

Balb/c-3T3-Zellen werden zwecks Bildung eines Monolayers 24 Stunden kultiviert. Zwei „96-well"-Platten je Testchemikalie werden sodann mit acht verschiedenen Konzentrationen der Chemikalie 1 Stunde lang vorinkubiert. Daraufhin wird eine der zwei Platten mit der höchsten nicht zytotoxischen Bestrahlungsdosis bestrahlt, während die andere Platte im Dunkeln aufbewahrt wird. In beiden Platten wird dann das Behandlungsmedium durch ein Kulturmedium ersetzt, und nach weiteren 24 Stunden Inkubation wird die Zellviabilität anhand der Neutralrot-Aufnahme bestimmt. Die Zellviabilität, ausgedrückt als Prozentsatz unbehandelter Lösemittelkontrollen, wird für jede Testkonzentration berechnet. Um das fototoxische Potenzial vorherzusagen, wird die mit und ohne Strahlung erzielte Konzentrations-Wirkungs-Kurve verglichen, in der Regel für den $IC_{50}$-Wert (d. h. die Konzentration, die die Zellviabilität gegenüber unbehandelten Kontrollen um 50 % vermindert).

1.4. BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.4.1. **Zubereitungen**

1.4.1.1. *Zellen*

Eine permanente Mäuse-Fibroblastenzelllinie — Balb/c 3T3, Klon 31 — entweder von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, oder von der European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Vereinigtes Königreich — wurde in der Validierungsstudie verwendet und wird daher zur Beschaffung aus einem qualifizierten Zellendepot empfohlen. Andere Zellen oder Zelllinien können erfolgreich mit demselben Testverfahren verwendet werden, wenn die Kulturbedingungen den spezifischen Bedürfnissen der Zellen angepasst werden, jedoch muss die gleichwertige Eignung der Zellen nachgewiesen werden.

Zellen sollten regelmäßig auf die Abwesenheit von Mykoplasma-Kontamination hin geprüft und nur verwendet werden, wenn keine derartige Kontamination festgestellt wird (11).

Die UV-Empfindlichkeit der Zellen muss regelmäßig nach den in der vorliegenden Verfahrensbeschreibung dargestellten Qualitätssicherungsverfahren kontrolliert werden. Da die UVA-Sensitivität von Zellen mit der erreichbaren Passagenzahl zunehmen kann, sollten Balb/c-3T3-Zellen mit einer möglichst niedrigen Passagenzahl, vorzugsweise weniger als 100, verwendet werden (siehe 1.4.2.2.2 und Anlage 2).

1.4.1.2. *Medien und Kulturbedingungen*

Für Routine-Zellpassagen und während des Testverfahrens sollten geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen angewendet werden. Bei Balb/c-3T3-Zellen sind dies DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit einem Zusatz von 10 % Serum neugeborener Kälber, 4 mM Glutamin, Penicillin (100 IU) und Streptomycin (100 (µg/ml) sowie Feuchtinkubation bei 37 °C, 5-7,5 % $CO_2$ (je nach Puffer, siehe Abschnitt 1.4.1.4, zweiter Absatz). Es ist dabei besonders wichtig, dass die Zell-Kulturbedingungen eine Zellzykluszeit innerhalb des normalen historischen Bereichs der verwendeten Zellen oder Zelllinien sicherstellen.

1.4.1.3. *Ansetzen der Kulturen*

Zellen aus tiefgefrorenen Mutterkulturen werden in einem Kulturmedium in angemessener Dichte ausgesät und mindestens einmal vor ihrer Verwendung im In-vitro-3T3-NRU-Fototoxizitätstest passagiert.

▼B

Für den Fototoxizitätstest werden Zellen in einem Kulturmedium in einer geeigneten Dichte ausgesät, die sicherstellt, dass die Kulturen zum Ende des Tests, d. h. wenn die Zellviabilität 48 Stunden nach dem Aussäen der Zellen bestimmt wird, ihre maximale Dichte (Konfluenz) noch nicht erreicht haben. Für Balb/c 3-T3-Zellen, die in „96-well"-Platten kultiviert werden, beträgt die empfohlene Zelldichte $1 \times 10^4$ Zellen je „well".

Für jede Testchemikalie werden Zellen identisch in zwei separate „96-well"-Platten ausgesät, die sodann gleichzeitig während des gesamten Testverfahrens unter identischen Kulturbedingungen behandelt werden, abgesehen von dem Zeitraum, in dem eine der Platten (+Irr) bestrahlt und die andere im Dunkeln (–Irr) aufbewahrt wird.

1.4.1.4. *Zubereitung der Testsubstanzen*

Testchemikalien müssen unmittelbar vor ihrer Verwendung frisch zubereitet werden, es sei denn, Haltbarkeitsdaten rechtfertigen eine Lagerung der Präparation. Es wird empfohlen, die Behandlung sämtlicher Chemikalien und die Erstbehandlung der Zellen unter Ausleuchtungsbedingungen durchzuführen, bei denen eine Fotoaktivierung oder Degradation der Testsubstanz vor der Bestrahlung vermieden wird.

Die Testchemikalien sollten in einer gepufferten Salzlösung, z. B. EBSS (Earle's Balanced Salt Solution), oder anderen physiologisch ausgewogenen Pufferlösungen, gelöst werden, die, um Interferenzen während der Bestrahlung zu vermeiden, frei sein müssen von Proteinbestandteilen und Licht absorbierenden Bestandteilen (z. B. pH-Indikationsfarben und Vitaminen). Da die Zellen während der Bestrahlung ca. 50 Minuten lang außerhalb des $CO_2$-Inkubators aufbewahrt werden, ist sorgfältig darauf zu achten, dass eine Alkalisierung vermieden wird. Werden schwache Pufferlösungen wie EBSS verwendet, lässt sich dies erreichen, indem die Inkubation der Zellen unter 7,5 %igem $CO_2$ erfolgt. Werden die Zellen bei nur 5 %igem $CO_2$ inkubiert, ist eine stärkere Pufferlösung zu verwenden.

Testchemikalien mit eingeschränkter Wasserlöslichkeit sind in einem geeigneten Lösemittel zu lösen. Wird ein Lösemittel verwendet, muss es in allen Kulturen mit konstantem Volumen vorhanden sein, d. h. in den Negativkontrollen (Lösemittelkontrollen) sowie in sämtlichen Konzentrationen der Testchemikalie, und darf bei dieser Konzentration keine zytotoxische Wirkung zeigen. Die Konzentrationen der Testchemikalien sind so zu wählen, dass Ausfällungen oder Trübungen der Lösung vermieden werden.

Dimethylsulfoxid (DMSO) und Ethanol (EtOH) werden als Lösemittel empfohlen. Andere Lösemittel mit geringer Zytotoxizität sind unter Umständen ebenfalls geeignet. Vor der Verwendung sind jedoch alle Lösemittel sorgfältig auf spezifische Eigenschaften zu untersuchen, wie Reaktion mit der Testchemikalie, Auslöschen der fototoxischen Wirkung, Einfangen von Radikalen und/oder Stabilität der Chemikalie im Lösemittel.

Wirbelmischung (Vortex) und/oder Anwendung von Ultraschall und/oder Erwärmung auf geeignete Temperaturen kommen als Möglichkeiten in Betracht, um die Löslichkeit zu fördern, sofern hierdurch nicht die Stabilität der Testchemikalie beeinträchtigt wird.

▼B

1.4.1.5. *Bestrahlungsbedingungen*

1.4.1.5.1. Lichtquelle

Die Wahl der geeigneten Lichtquelle und geeigneter Filter ist ein kritischer Faktor bei den Fototoxizitätstests. Für fototoxische In-vivo-Reaktionen sind in der Regel UVA und sichtbare Bereiche verantwortlich (3) (12), während UVB weniger relevant, aber selbst hochgradig zytotoxisch ist, da seine Zytotoxizität zwischen 313 und 280 nm um ein Tausendfaches zunimmt (13). Kriterien für die Wahl einer geeigneten Lichtquelle müssen die wesentliche Voraussetzung einschließen, dass die Lichtquelle Wellenlängen aussendet, die von der chemischen Testsubstanz absorbiert werden (Absorptionsspektrum), und dass die (in einer akzeptablen Zeit erreichbare) Lichtdosis für den Nachweis bekannter fotozytotoxischer Chemikalien ausreichen muss. Darüber hinaus dürfen die jeweils verwendeten Wellenlängen und Dosen, z. B. der Wärmeemission (Infrarotbereich), für das Testsystem nicht unnötig schädlich sein.

Die Simulierung von Sonnenlicht mit Solarsimulatoren wird als optimale Kunstlichtquelle betrachtet. Die Strahlungsleistungsverteilung des gefilterten Solarsimulators muss der in (14) dargestellten Verteilung von Tageslicht im Freien entsprechen. Sowohl Xenon-Lichtbogenlampen als auch (dotierte) Quecksilber-Metallhalogenid-Lichtbogenlampen werden in Solarsimulatoren verwendet (15). Letztere haben den Vorteil, dass sie weniger Wärme emittieren und preiswerter sind, doch ist die Übereinstimmung mit dem Sonnenlicht weniger perfekt als bei Xenon-Lichtbogenlampen. Da alle Solarsimulatoren signifikante Mengen UVB aussenden, müssen sie mit geeigneten Filtern versehen werden, um die hoch zytotoxischen UVB-Wellenlängen zu mindern. Da die Kunststoffmaterialien für Zellkulturen UV-Stabilisatoren enthalten, muss das Spektrum durch den gleichen „96-well"-Plattendeckel gemessen werden, wie er auch in dem Versuch verwendet wird. Unabhängig von Maßnahmen zur Dämpfung eines Teils des Spektrums durch Filterung oder durch unvermeidbare Filtereffekte der Testeinrichtungen darf das unterhalb dieser Filter aufgezeichnete Spektrum nicht vom standardisierten Tageslicht im Freien abweichen (14). Die spektrale Energieverteilung des in der Validierungsstudie zum In-vitro-3T3-NRU-Fototoxizitätstest verwendeten gefilterten Solarsimulators wurde als Beispiel veröffentlicht (8) (16). Siehe dazu auch Anlage 2, Abbildung 1.

1.4.1.5.2. Dosimetrie

Die Lichtintensität (Bestrahlungsstärke) sollte regelmäßig vor jedem Fototoxizitätstest unter Verwendung eines geeigneten Breitband-UV-Meters geprüft werden. Die Lichtintensität ist durch die gleiche Ausführung der „96-well"-Plattendeckel zu messen, wie sie auch in dem Versuch verwendet wird. Das UV-Meter muss für die Lichtquelle kalibriert sein. Die Leistungsfähigkeit des UV-Meters ist sicherzustellen. Zu diesem Zweck wird die Verwendung eines zweiten Referenz-UV-Meters des gleichen Typs und der gleichen Kalibrierung empfohlen. Im Idealfall sollte in größeren Abständen mit einem Spektroradiometer die spektrale Energieverteilung der gefilterten Lichtquelle gemessen und die Kalibrierung des Breitband-UV-Meters geprüft werden.

Eine Dosis von 5 J/cm$^2$ (im UVA-Bereich gemessen) wurde als nicht zytotoxisch gegenüber Balb/c-3T3-Zellen und als ausreichend stark ermittelt, um fototoxische Chemikalien zu erkennen und damit fototoxische Reaktionen auszulösen (6) (17); so wurde beispielsweise die Bestrahlungsstärke auf 1,7 mW/cm$^2$ eingestellt, um innerhalb von 50 Minuten 5 J/cm$^2$ zu erreichen. Siehe hierzu Anlage 2, Abbildung 2. Wenn eine andere Zelllinie oder eine unterschiedliche Lichtquelle verwendet wird, muss die UVA-Dosis ggf. so angepasst werden, dass Unschädlichkeit gegenüber Zellen und eine ausreichende Stärke zur Erkennung von Standardfototoxinen gegeben ist. Die Zeit der Lichtexposition wird auf folgendem Wege berechnet:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{Strahlungsdosis } (J/cm^2) \times 1000}{\text{Strahlung } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1\ J = 1\ Wsec)$$

1.4.2. **Testbedingungen**

1.4.2.1. *Konzentrationen der Testsubstanz*

Die in Anwesenheit (+Irr) und in Abwesenheit (–Irr) von Licht zu testenden Konzentrationsbereiche eines chemischen Stoffs sollten in Dosis-Vorversuchen auf angemessene Weise ermittelt werden. Ggf. empfiehlt es sich, die Löslichkeit eingangs und nach 60 min (bzw. nach der jeweils zugrunde gelegten Behandlungszeit) zu ermitteln, da sich die Löslichkeit zeitabhängig oder im Belichtungsverlauf ändern kann. Um eine durch ungeeignete Bedingungen der Kulturen oder hochgradig saure oder alkalische Chemikalien verursachte Toxizität zu vermeiden, muss der pH-Wert der Zellkulturen mit zugesetzter Testchemikalie im Bereich zwischen 6,5 und 7,8 liegen.

Die höchste Konzentration der Testsubstanz muss innerhalb der physiologischen Testbedingungen liegen, d. h., osmotischer Stress und pH-Stress sind zu vermeiden. Je nach Testchemikalie sind ggf. andere physikalisch-chemische Eigenschaften als Faktoren in Betracht zu ziehen, durch die die höchste Testkonzentration begrenzt wird. Bei relativ unlöslichen Substanzen, die bei Konzentrationen bis zum Sättigungspunkt nicht toxisch sind, ist die höchste erreichbare Konzentration zu verwenden. Grundsätzlich ist eine Ausfällung der Testchemikalie bei einer der Testkonzentrationen zu vermeiden. Die Maximalkonzentration der Testsubstanz darf 1 000 (μg/ml nicht überschreiten; die Osmolalität darf 10 mmol nicht überschreiten. Es ist eine geometrische Verdünnungsreihe von 8 Testsubstanzenkonzentrationen mit konstantem Verdünnungsfaktor zu verwenden (siehe Abschnitt 2.1, zweiter Absatz).

Liegen (aus Vorversuchen) Informationen darüber vor, dass die Testchemikalie bis zur Grenzkonzentration im Dunkelversuch (–Irr) nicht zytotoxisch ist, aber bei Bestrahlung (+Irr) hochgradig zytotoxisch ist, können die Konzentrationsbereiche, die für den (+Irr)-Versuch zugrunde gelegt werden müssen, von den Bereichen für den (–Irr)-Versuch abweichen, damit die Forderung einer ausreichenden Datenqualität erfüllt ist.

1.4.2.2. *Kontrollen*

1.4.2.2.1. Strahlungsempfindlichkeit der Zellen, Ermittlung historischer Daten

Die Zellen sind regelmäßig (etwa jede fünfte Passage) auf Empfindlichkeit gegenüber der Lichtquelle zu kontrollieren; dazu wird ihre Viabilität nach Belichtung mit steigenden Strahlungsdosen beurteilt. Bei dieser Beurteilung sind mehrere verschiedene Strahlungsdosen — einschließlich Dosen, die deutlich über denen des 3T3-NRU-Fototoxizitätstests liegen — zu verwenden. Eine Quantifizierung dieser Dosen ist am einfachsten durch Messung der UV-Anteile der Lichtquelle möglich. Die Zellen werden mit der im In-vitro-3T3-NRU-Fototoxizitätstest verwendeten und am darauf folgenden Tag bestrahlten Dichte ausgesät. Die Zellviabilität wird einen Tag später anhand der Aufnahme von Neutralrot ermittelt. Es muss sich nachweisen lassen, dass die resultierende höchste nicht zytotoxische Dosis (z. B. in der Validierungsstudie: 5 J/cm$^2$ (UVA)) für eine korrekte Klassifizierung der Referenzchemikalien (Tabelle 1) ausreicht.

▼B

1.4.2.2.2. Strahlungsempfindlichkeit, Kontrolle des laufenden Tests

Der Test erfüllt die Qualitätskriterien, wenn die bestrahlten Negativ-/Lösemittelkontrollen im Vergleich zu nicht bestrahlten Negativ-/-Lösemittelkontrollen eine Viabilität von mehr als 80 % aufweisen.

1.4.2.2.3. Viabilität der Lösemittelkontrollen

Die absolute optische Dichte ($OD_{540\ NRU}$) des aus den Lösemittelkontrollen extrahierten Neutralrot gibt an, ob die je „well" ausgesäten $1 \times 10^4$ Zellen bei normaler Verdopplungszeit während der zwei Tages des Tests gut gewachsen sind. Der Test erfüllt die Akzeptanzkriterien, wenn der mittlere $OD_{540\ NRU}$ der unbehandelten Kontrollen > 0,4 ist (d. h. rund das Zwanzigfache des Hintergrund-Lösemittelabsorptionsmaßes).

1.4.2.2.4. Positivkontrolle

Ein bekannter fototoxischer chemischer Stoff soll zeitgleich mit jedem In-vitro-3T3-NRU-Fototoxizitätstest getestet werden. Chlorpromazin (CPZ) wird empfohlen. Für mit dem Standardprotokoll im In-vitro-3T3-NRU-Fototoxizitätstest getestetes CPZ wurden folgende Test-Akzeptanzkriterien festgelegt: bestrahltes CPZ (+Irr): $IC_{50}$ = 0,1 bis 2,0 µg/ml, nicht bestrahltes CPZ (–Irr): $IC_{50}$ = 7,0 bis 90,0 µg/ml. Der Fotoirritationsfaktor (PIF) sollte > 6 sein. Das historische Verhalten der Positivkontrolle ist zu überwachen.

Andere bekannte, für die Chemikalienklasse oder Löslichkeitsmerkmale der bewerteten Chemikalie geeignete fototoxische Chemikalien können an Stelle von Chlorpromazin als gleichzeitige Positivkontrollen verwendet werden.

1.4.3. **Testverfahren (6) (7) (8) (16) (17)**

1.4.3.1. *1. Tag*

100 µl Kulturmedium werden in die peripheren „wells" einer „96-well"-Gewebekultur-Mikrotiterplatte gegeben (= Blindproben). In die übrigen „wells" werden 100 µl der Zellsuspension von $1 \times 10^5$ Zellen/ml (= $1 \times 10^4$ Zellen/well) pipettiert. Für jede Reihe einzelner Testsubstanzkonzentrationen werden zwei Platten zubereitet; eine weitere Platte wird für die Lösemittel- und Positivkontrollen zubereitet.

Die Zellen werden 24 Stunden lang (siehe 1.4.1.2) inkubiert, bis sie einen halbkonfluenten Monolayer bilden. Diese Inkubationszeit ermöglicht die Erholung der Zellen, das Anhaften und ein exponentielles Wachstum.

1.4.3.2. *2. Tag*

Nach der Inkubation wird das Kulturmedium dekantiert. Darauf folgt ein Waschgang mit der für die Inkubation verwendeten Pufferlösung. 100 µl der Pufferlösung, welche die geeignete Konzentration der Testchemikalie oder des Lösemittels (Lösemittelkontrolle) enthält, werden hinzugefügt. Es sind 8 verschiedene Konzentrationen der Testchemikalie zu verwenden. Die Zellen werden mit der Testchemikalie im Dunkeln 60 Minuten lang inkubiert (siehe Abschnitt 1.4.1.2 und Abschnitt 1.4.1.4, zweiter Absatz).

Aus den zwei für jede Reihe der Testsubstanzkonzentrationen und Kontrollen vorbereiteten Platten wird — normalerweise willkürlich — eine Platte für die Bestimmung der Zytotoxizität (–Irr) ausgewählt (d. h. die Kontrollplatte) sowie eine Platte (die Behandlungsplatte) für die Bestimmung der Fotozytotoxizität (+Irr).

▼B

Zur Durchführung der +Irr-Belichtung werden die Zellen bei Raumtemperatur 50 Minuten lang durch den Deckel der „96-well"-Platte mit der höchsten Strahlungsdosis bestrahlt, die nicht zytotoxisch ist (siehe auch Anlage 2). Nicht bestrahlte Platten (–Irr) werden 50 Minuten lang (= Lichtexpositionszeit) bei Raumtemperatur in einem dunklen Kasten gehalten.

Die Testflüssigkeit wird dekantiert. Es folgen zwei Waschgänge mit 150 µl der für die Inkubation verwendeten Pufferlösung, jedoch ohne das Testmaterial. Die Pufferlösung wird durch ein Kulturmedium ersetzt und über Nacht (18-22 h) inkubiert (siehe 1.4.1.2).

1.4.3.3. *3. Tag*

1.4.3.3.1. Mikroskopische Evaluierung

Die Zellen werden unter einem Phasen-Kontrast-Mikroskop auf Wachstum, Morphologie und Intaktheit der Monolayer untersucht. Morphologische Veränderungen der Zelle und Wirkungen auf das Zellwachstum sind aufzuzeichnen.

1.4.3.3.2. Neutralrot-Aufnahme-Test

Die Zellen werden mit 150 µl vorgewärmter Pufferlösung gewaschen. Die Waschlösung wird durch vorsichtiges Absaugen entfernt. 100 µl einer 50 µg/ml Neutralrotsubstanz (NR) (3-Amino-7-Dimethylamino-2-Methylphenazin-Hydrochlorid, EINECS-Nummer 209-035-8, CAS-Nummer 553-24-2, C.I. 50040) in einem Medium ohne Serum werden hinzugefügt (16) und 3 Stunden lang gemäß den Angaben in Abschnitt 1.4.1.2 inkubiert. Nach der Inkubation wird das NR-Medium entfernt, und die Zellen werden mit 150 µl Pufferlösung gewaschen. Die überschüssige Pufferlösung wird vollkommen dekantiert und durch Absaugen oder Zentrifugieren entfernt.

Es werden genau 150 µl NR-Desorptionslösung (frisch zubereitet aus 49 Teilen Wasser + 50 Teilen Ethanol + 1 Teil Essigsäure) hinzugefügt.

Die Mikrotiter-Platte wird 10 Minuten lang auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler vorsichtig geschüttelt, bis das NR aus den Zellen extrahiert ist und eine homogene Lösung bildet.

Die optische Dichte der NR-Extrakte wird bei 540 nm in einem Spektralfotometer gemessen, wobei die Blindproben als Referenz verwendet werden. Die Daten sind in angemessenem Dateiformat für spätere Analysen aufzuzeichnen.

2. **DATEN**

2.1. QUALITÄT UND QUANTITÄT DER DATEN

Die Testdaten sollten eine sinnvolle Analyse der in Anwesenheit und in Abwesenheit von Strahlung ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Reaktionen sowie, wenn möglich, die Konzentration der Testchemikalien, bei der die Zellviabilität auf 50 % ($IC_{50}$) sinkt, ermöglichen. Sofern Zytotoxizität festgestellt wird, sollten sowohl der Konzentrationsbereich als auch der Abstand einzelner Konzentrationen so gewählt sein, dass die experimentellen Daten in einer Kurve dargestellt werden können.

Bei klar positiven und klar negativen Ergebnissen (siehe Abschnitt 2.3, erster Absatz) ist gegebenenfalls der Hauptversuch — begleitet von einem oder mehreren Vorversuchen — ausreichend.

▼B

Mehrdeutige, grenzwertige oder unklare Ergebnisse sind durch weitere Tests abzuklären (siehe hierzu auch Abschnitt 2.4, zweiter Absatz). In derartigen Fällen ist auch eine Änderung der Versuchsbedingungen in Betracht zu ziehen. Zu den Versuchsbedingungen, die geändert werden könnten, zählen der Konzentrationsbereich und -raum, die Vorinkubationszeit und die Strahlungsexpositionszeit. Für Chemikalien, die in Wasser instabil sind, ist evtl. eine kürzere Expositionszeit ausreichend.

2.2. ERGEBNISBEWERTUNG

Zur Evaluierung der Daten kann ein Fotoirritationsfaktor (PIF) oder der Mean Photo Effect (MPE) berechnet werden.

Zur Berechnung der Maße für die Fotozytotoxizität (siehe unten) müssen die Dosis-Wirkungs-Werte näherungsweise durch eine geeignete kontinuierliche Dosis-Wirkungs-Kurve (Modell) dargestellt werden. Die Anpassung der Kurve an die Daten erfolgt normalerweise nach dem nichtlinearen Regressionsverfahren (18). Zur Beurteilung des Einflusses der Datenvariabilität auf die angepasste Kurve wird die Verwendung eines Bootstrap-Verfahrens empfohlen.

Der Fotoirritationsfaktor (PIF) wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Ist die Berechnung von $IC_{50}$ bei Anwesenheit oder Abwesenheit von Licht nicht möglich, kann der PIF des Testmaterials nicht ermittelt werden. Der MPE (Mean Photo Effect) basiert auf dem Vergleich der vollständigen Konzentrations-Wirkungs-Kurven (19). Er wird definiert als der gewichtete Durchschnitt einer repräsentativen Gruppe von Fotoeffektwerten.

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Der Fotoeffekt $PE_c$ bei einer beliebigen Konzentration C ist definiert als das Produkt des Wirkungseffekts $RE_c$ und des Dosiseffekts $DE_c$, d. h. $PE_c = RE_c \times DE_c$. Der Wirkungseffekt $RE_c$ bezeichnet die Differenz zwischen den bei Abwesenheit und Anwesenheit von Licht ermittelten Wirkungen, d. h. $RE_c = R_c$ (–Irr) — $R_c$ (+Irr). Der Dosiseffekt wird ausgedrückt durch

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

Dabei stellt C* die Äquivalenzkonzentration dar, d. h. die Konzentration, bei der die +Irr-Wirkung der –Irr-Wirkung bei Konzentration C entspricht. Kann C* nicht ermittelt werden, weil die Wirkungswerte der +Irr-Kurve systematisch über oder unter RC(–Irr) liegen, wird der Dosiseffekt gleich 1 gesetzt. Die Gewichtungsfaktoren $w_i$ werden durch den höchsten Wirkungswert ausgedrückt, d. h. $w_i$ = MAX $\{R_i$ (+Irr), $R_i$ (–Irr)$\}$. Das Konzentrationsgitter $C_i$ wird so gewählt, dass die gleiche Anzahl Punkte in jedes der Konzentrationsintervalle fällt, die durch die im Versuch verwendeten Konzentrationswerte definiert sind. Die Berechnung von MPE wird auf den maximalen Konzentrationswert beschränkt, bei dem mindestens eine der beiden Kurven noch einen Wirkungswert von mindestens 10 % aufweist. Liegt diese Maximalkonzentration über der höchsten Konzentration, die im +Irr-Versuch verwendet wurde, wird der restliche Teil der +Irr-Kurve gleich dem Wirkungswert „0“ gesetzt. Je nachdem, ob der MPE-Wert größer als ein auf geeignete Weise gewählter Schwellenwert (MPEc = 0,15) ist oder nicht, wird die Chemikalie als fototoxisch eingestuft.

▼B

Ein Softwarepaket für die Berechnung von PIF und MPE ist bei (20) erhältlich.

2.3. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Nach der Validierungsstudie (8) bedeutet eine Testsubstanz mit PIF < 2 oder MPE < 0,1 die Prognose „keine Fototoxizität". Ein PIF > 2 und < 5 oder ein MPE > 0,1 und < 0,15 entspricht der Prognose: „Fototoxizität wahrscheinlich"; ein PIF > 5 oder ein MPE > 0,15 bedeutet: „Fototoxizität".

Bei jedem Labor, das den einleitenden Aufbau dieses Versuchs vornimmt, sind die in Tabelle 1 aufgeführten Referenzmaterialien zu testen, bevor die Testsubstanzen zur fototoxischen Beurteilung getestet werden. Die PIF- oder MPE-Werte müssen in Nähe der in Tabelle 1 angegebenen Werte liegen.

**Tabelle 1**

| Bezeichnung der Chemikalie | EINECS-Nr. | CAS-Nr. | PIF | MPE | Absorptions-peak | Lösemittel ([1]) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Amiodaron HCl | 243-293-2 | [19774-82-4] | >3,25 | 0,27 - 0,54 | 242 nm<br>300 nm<br>(Schulter) | Ethanol |
| Choloropro-mazin HCl | 200-701-3 | [69-09-0] | >14,4 | 0,33 - 0,63 | 309 nm | Ethanol |
| Norfloxacin | 274-614-4 | [70458-96-7] | >71,6 | 0,34 - 0,90 | 316 nm | Acetonitril |
| Anthracen | 204-371-1 | [120-12-7] | >18,5 | 0,19 - 0,81 | 356 nm | Acetonitril |
| Protoporphyrin IX, Dinatrium | 256-815-9 | [50865-01-5] | >45,3 | 0,54 - 0,74 | 402 nm | Ethanol |
| L-Histidin | | [7006-35-1] | kein PIF | 0,05 - 0,10 | 211 nm | Wasser |
| Hexacholoro-phen | 200-733-8 | [70-30-4] | 1,1 - 1,7 | 0,00 - 0,05 | 299 nm<br>317 nm<br>(Schulter) | Ethanol |
| Natriumlauryl-sulfat | 205-788-1 | [151-21-3] | 1,0 - 1,9 | 0,00 - 0,05 | Keine Ab-sorption | Wasser |

([1]) Lösemittel für die Messung der Absorption.

2.4. INTERPRETATION DER DATEN

Werden fototoxische Wirkungen nur bei der höchsten Testkonzentration festgestellt (insbesondere bei wasserlöslichen Testchemikalien), sind zur Gefahrenbeurteilung evtl. noch weitere Gesichtspunkte in Betracht zu ziehen, so z. B. Daten zur Absorption über die Haut sowie zur Ansammlung der Chemikalie in der Haut und/oder Daten aus anderen Tests, z. B. In-vitro-Tests der Chemikalie auf tierischer bzw. menschlicher Haut oder Hautmodellen.

▼B

Wird keine Toxizität nachgewiesen (+Irr und –Irr) und sind die Konzentrationen, die getestet werden können, durch mangelhafte Löslichkeit begrenzt, ist die Vergleichbarkeit der Testsubstanz mit dem durchgeführten Test zweifelhaft; in diesem Fall ist die Durchführung konfirmativer Tests, z. B. mit einem anderen Modell, in Betracht zu ziehen.

3. **BERICHTERSTATTUNG**

TESTBERICHT

Der Testbericht muss mindestens folgende Informationen umfassen:

Testsubstanz:

— Kenndaten, übliche generische Namen und IUPAC- und CAS-Nummern, sofern bekannt,

— physikalische Eigenschaften und Reinheit,

— physikalisch-chemische Eigenschaften, die für die Durchführung der Studie relevant sind,

— UV/vis-Absorptionsspektrum,

— Stabilität und Fotostabilität, sofern bekannt;

Lösemittel:

— Begründung der Wahl des Lösemittels,

— Löslichkeit der Testchemikalie in diesem Lösemittel,

— Prozentsatz des in dem Behandlungsmedium vorhandenen Lösemittels;

Zellen:

— Art und Quelle der Zellen,

— Fehlen von Mykoplasma,

— Zahl der Zellpassagen, sofern bekannt,

— Strahlungssensitivität von Zellen, bestimmt mit dem im In-vitro-3T3-NRU-Fototoxizitätstest verwendeten Bestrahlungsgerät;

Testbedingungen (1); *Inkubation vor und nach der Behandlung:*

— Art und Zusammensetzung des Kulturmediums,

— Inkubationsbedingungen ($CO_2$-Konzentration, Temperatur, Feuchtigkeit),

— Inkubationsdauer (Vorbehandlung, Nachbehandlung);

Testbedingungen (2); *Behandlung mit der Chemikalie:*

— Begründung der Wahl der in Anwesenheit und in Abwesenheit von Strahlungseinwirkung verwendeten Konzentrationen der Testchemikalie,

— im Falle beschränkter Löslichkeit der Testchemikalie und bei Abwesenheit von Zytotoxizität: Begründung der höchsten getesteten Konzentration,

— Art und Zusammensetzung des Behandlungsmediums (gepufferte Salzlösung),

— Dauer der chemischen Behandlung;

Testbedingungen (3); *Bestrahlung:*

— Begründung der Wahl der verwendeten Lichtquelle,

▼B

— Hersteller und Art der Lichtquelle und des Radiometers,

— Charakterisierung der spektralen Energieverteilung der Lichtquelle,

— Durchlass-/Absorptionsmerkmale des bzw. der verwendeten Filter

— Merkmale des Strahlenmessgeräts und Einzelheiten der Kalibrierung,

— Abstand der Lichtquelle vom Testsystem,

— UVA-Strahlung bei dieser Entfernung, ausgedrückt in $mW/cm^2$,

— Dauer der UV/vis-Lichtexposition,

— UVA-Dosis (Strahlung × Zeit), ausgedrückt in $J/cm^2$,

— Temperatur der Zellkulturen während der Bestrahlung und der gleichzeitig im Dunkeln gehaltenen Zellkulturen;

Testbedingungen (4); *Neutralrot-Viabilitätstest:*

— Zusammensetzung des Neutralrot-Mediums,

— Dauer der Neutralrot-Inkubation,

— Inkubationsbedingungen ($CO_2$-Konzentration, Temperatur, Feuchtigkeit),

— Neutralrot-Extraktionsbedingungen (Extraktionsmittel, Dauer),

— Wellenlänge, die für die fotometrische Messung der optischen Dichte von Neutralrot verwendet wurde,

— zweite Referenzwellenlänge, sofern verwendet,

— Inhalt der fotometrischen Referenz (Blindprobe), sofern verwendet;

Ergebnisse:

— bei den einzelnen Konzentrationen der Testchemikalie ermittelte Zellviabilität, ausgedrückt als Prozentsatz der mittleren Viabilität der Lösemittelkontrollen,

— Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Konzentration der Testchemikalie vs. relative Zellviabilität) der gleichzeitig durchgeführten +Irr- und –Irr-Versuche,

— Analyse der Konzentrations-Wirkungs-Kurven: sofern möglich, Angabe der $IC_{50}$(+Irr)- und $IC_{50}$(–Irr)-Werte,

— Vergleich der zwei in Anwesenheit und in Abwesenheit von UVA/vis-Bestrahlung ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurven entweder durch Berechnung des Fotoirritationsfaktors (PIF) oder durch Berechnung des Mean Photo Effect (MPE),

— Testakzeptanzkriterien; Lösemittelkontrolle des Tests,

— absolute Viabilität (optische Dichte des NR-Extrakts) von bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen,

— historische Daten zur Negativkontrolle, Mittelwerte und Standardabweichungen,

— Testakzeptanzkriterien, Positivkontrolle des Tests,

▼B

— $IC_{50}$(+Irr) und $IC_{50}$(–Irr) und PIF/MPE der Positivkontroll-Chemikalie,

— historische Daten zur Positivkontroll-Chemikalie: $IC_{50}$(+Irr) und $IC_{50}$(–Irr) und PIF/MPE, Mittelwerte und Standardabweichungen;

Diskussion der Ergebnisse;

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7, 95-102.

(2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry“ Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam, XI-XXXV.

(3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.

(4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology“ Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, 79-110.

(5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water“ Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793-796.

(7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3. November 1997, ATLA, 26, 7-8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/-COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305-327.

(9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS; auf Anfrage beim Sekretariat erhältlich.

(10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119-124.

(11) Hay, RJ. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

▼B

(12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology“, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, 515-530.

(13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

(14) ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 S.

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

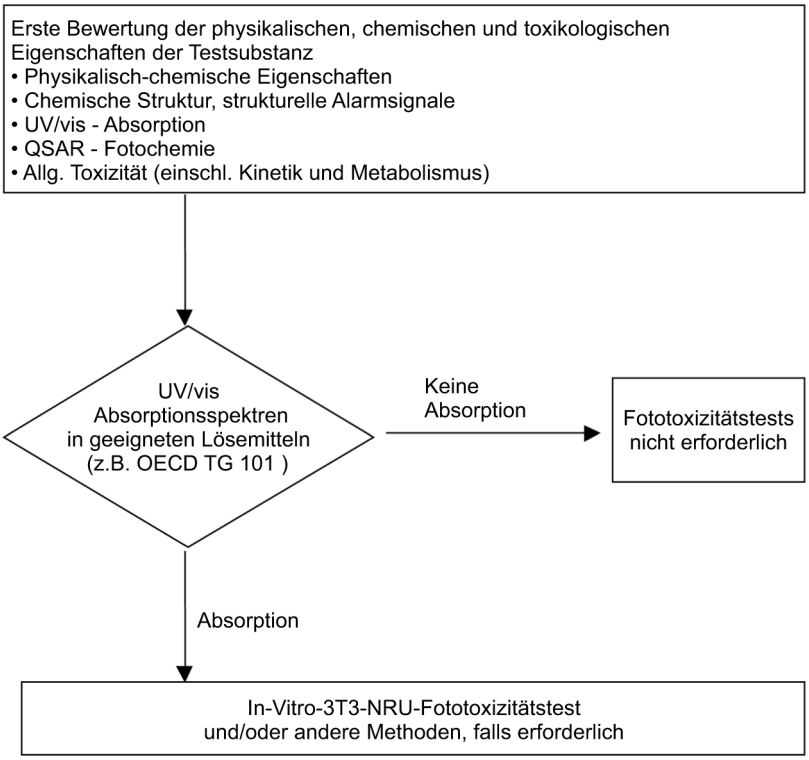
(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0.2340.en_2649_34377_2349687_1_1_1_1.00. html

▼B

*Anlage 1*

**Rolle des 3T3 NRU-PT in einer sequenziellen Prüfstrategie für Fototoxizitätstests von Chemikalien**

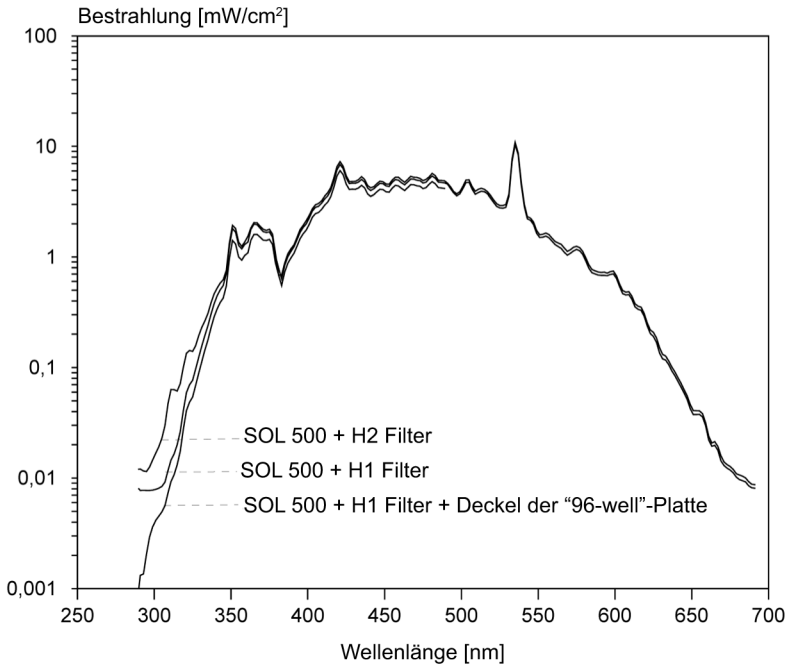


▼B

*Anlage 2*

*Abbildung 1*

**Spektrale Leistungsverteilung eines gefilterten Solarsimulators**




(Siehe 1.4.1.5, zweiter Absatz)

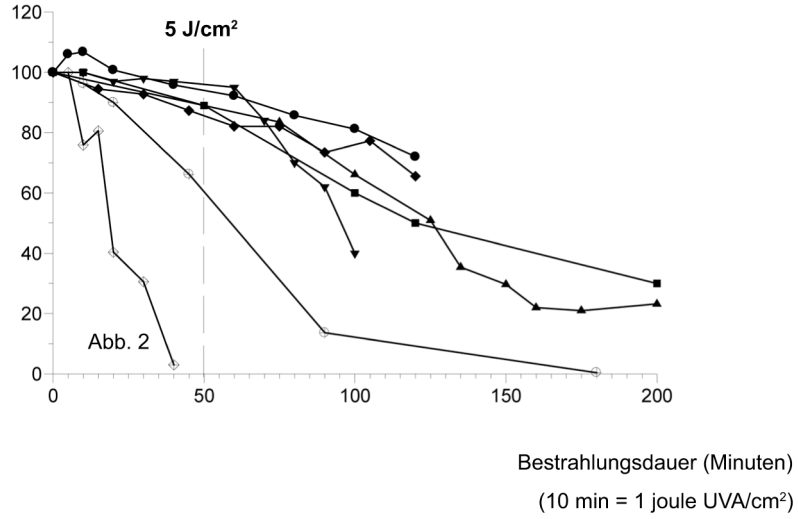
Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für eine akzeptable spektrale Leistungsverteilung eines gefilterten Solarsimulators. Sie stammt aus der Quelle mit dotiertem Metallhalid, die im Validierungsversuch des 3T3-NRU-PT verwendet wurde (6) (8) (17). Die Wirkung der beiden verschiedenen Filter und der zusätzliche Filtereffekt des Deckels einer „96-well“-Zellkulturplatte werden hier dargestellt. Der H2-Filter wurde nur mit Testsystemen verwendet, die eine größere UVB-Menge tolerieren können (Hautmodelltest und Fotohämolysetest mit roten Blutzellen). Im 3T3-NRU-PT wurde der H1-Filter verwendet. Die Abbildung zeigt, dass der zusätzliche Filtereffekt des Plattendeckels in erster Linie im UVB-Bereich beobachtet wurde, so dass im Bestrahlungsspektrum noch genug UVB verbleibt, um Chemikalien zu erkennen, die typischerweise im UVB-Bereich absorbiert werden, z. B. Amiodaron (siehe Tabelle 1).

▼B

*Abbildung 2*

**Bestrahlungsempfindlichkeit von Balb/c-3T3-Zellen (im UVA-Bereich gemessen)**

Zellviabilität (Aufnahme von Neutralrot in % bei Dunkelkontrollen)




(Siehe 1.4.1.5.2, zweiter Absatz, 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Empfindlichkeit der Balb/c-3T3-Zellen gegen Bestrahlung durch den Solarsimulator, der im Validierungsversuch des 3T3-NRU-Fototoxizitätstests (nach Messung im UVA-Bereich) verwendet wird. Die Abbildung zeigt die in sieben verschiedenen Labors in der Vorvalidierungsstudie ermittelten Ergebnisse (1). Die beiden Kurven mit offenen Symbolen wurden mit gealterten Zellen ermittelt (hohe Passagenzahl), die durch neue Zellenbestände ersetzt werden mussten. Die Kurven mit fett gedruckten Symbolen zeigen Zellen mit einer ausreichenden Bestrahlungstoleranz.

Aus diesen Daten wurde die höchste nicht zytotoxische Bestrahlungsdosis von 5 J/cm$^2$ abgeleitet (senkrechte gestrichelte Linie). Die waagerechte gestrichelte Linie zeigt zusätzlich die in Abschnitt 1.4.2.2 angegebene maximal zulässige Bestrahlungswirkung.

▼M3

B.42. **HAUTSENSIBILISIERUNG: LOKALER LYMPHKNOTENTEST**

EINLEITUNG

1. Die OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien und die auf ihnen beruhenden EU-Prüfmethoden werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Die ursprüngliche Prüfmethode zur Bestimmung der Hautsensibilisierung bei der Maus, der Lokale Lymphknotentest (Local Lymph Node Assay bzw. LLNA; OECD-Prüfrichtlinie 429; Kapitel B.42 dieses Anhangs), wurde bereits vor einiger Zeit zugelassen (1). Verschiedene Veröffentlichungen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) gehen genauer auf die Validierung des LLNA und auf die mit ihm verbundenen wissenschaftlichen Arbeiten ein. Der aktualisierte LLNA beruht auf der Auswertung von Experimenten und wissenschaftlichen Daten (12). Es handelt sich um die zweite Prüfmethode zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) bei Tieren. Die andere Prüfmethode (OECD-Prüfrichtlinie 406; Kapitel B.6 dieses Anhangs), namentlich der Meerschweinchen-Maximierungstest und der Bühler-Test, stützt sich auf Tests am Meerschweinchen (13). Der LLNA bietet gegenüber B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 (13) gewisse Vorteile im Hinblick auf den Tierschutz. Die vorliegende aktualisierte LLNA-Prüfmethode beinhaltet eine Reihe von Leistungsstandards (Anlage 1) in Übereinstimmung mit den Grundsätzen des OECD-Leitliniendokuments Nr. 34 (14). Diese können zur Bewertung des Validierungsstatus neuer und/oder modifizierter Prüfmethoden herangezogen werden, die dem LLNA in funktionaler oder mechanistischer Weise ähnlich sind.

2. Bei dem LLNA wird die Induktionsphase der Hautsensibilisierung untersucht, und der Test liefert quantitative Daten für die Dosis-Wirkungs-Bewertungen. Es wird darauf hingewiesen, dass die leichten/mittelgradigen Sensibilisatoren, die als geeignete Positivkontrollen bei Prüfmethoden für Meerschweinchen empfohlen werden (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13), ebenfalls für die Verwendung beim LLNA geeignet sind (6) (8) (15). Eine LLNA-Methode mit reduziertem Versuchstierbedarf (rLLNA), bei der bis zu 40 % weniger Tiere eingesetzt werden, wird ebenfalls als Option dieser Prüfmethode beschrieben (16) (17) (18). Der rLLNA kann verwendet werden, wenn aufgrund von Rechtsvorschriften lediglich die Bestätigung einer negativen Prädiktion des Hautsensibilisierungspotenzials gefordert ist, vorausgesetzt dass alle anderen Spezifikationen des LLNA-Protokolls, wie in dieser Prüfmethode beschrieben, eingehalten werden. Die Prädiktion eines negativen Ergebnisses sollte auf der Grundlage aller verfügbaren Informationen vorgenommen werden, wie in Absatz 4 beschrieben. Vor Anwendung der rLLNA-Methode sollten entsprechende Erläuterungen und eine wissenschaftliche Begründung für ihre Verwendung vorgelegt werden. Sollte der rLLNA entgegen allen Erwartungen zu einem positiven oder nicht eindeutigen Ergebnis führen, können weitere Tests erforderlich sein, um diese Daten zu deuten oder zu präzisieren. Der rLLNA sollte nicht für die Feststellung schädlicher Wirkungen von Prüfsubstanzen mit Hautsensibilisierungspotenzial verwendet werden, wenn Informationen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung benötigt werden, wie z. B. als Unterkategorisierung für die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen und das Global Harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

3. Die verwendeten Begriffsbestimmungen sind in Anlage 2 aufgeführt.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

4. Mit dem LLNA steht eine alternative Methode zum Nachweis von Chemikalien mit potenziell hautsensibilisierenden Eigenschaften zur Verfügung. Dies bedeutet nicht notwendigerweise, dass der LLNA zwingend in jedem Fall anstelle der Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13) eingesetzt werden muss. Vielmehr erweist er sich als gleichermaßen wertvoller Test und kann als Alternative gewählt werden, bei der im Allgemeinen keine weitere Bestätigung von positiven wie auch negativen Ergebnissen erforderlich ist. Das Prüflabor sollte vor der Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz auswerten und berücksichtigen. Zu diesen Informationen zählen die Identität und die

▼M3

chemische Struktur der Prüfsubstanz, ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, die Ergebnisse aller sonstigen *in vitro*- oder *in vivo*-Toxizitätsprüfungen der Prüfsubstanz sowie toxikologische Daten zu strukturell verwandten Chemikalien. Diese Informationen sind zu berücksichtigen, um die Eignung des LLNA für die jeweilige Substanz festzustellen (bestimmte chemische Stoffe sind mit dem LLNA nicht kompatibel — siehe Absatz 5) und die Festlegung der Dosis zu erleichtern.

5. Beim LLNA handelt es sich um eine *in vivo*-Methode. Das bedeutet, dass die kontaktsensibilisierenden Eigenschaften weiterhin an Tieren bewertet werden. Der Test erlaubt es jedoch, die Anzahl der für diesen Zweck benötigten Tiere zu reduzieren. Es kommt hinzu, dass der LLNA eine substanzielle Verfeinerung (weniger Schmerzen und Leiden) im Hinblick auf die Behandlung der Versuchstiere bei Tests auf allergische Kontaktsensibilisierung darstellt. Der LLNA beruht auf der Bewertung immunologischer Reaktionen, die während der Induktionsphase der Sensibilisierung durch chemische Stoffe ausgelöst werden. Anders als die Tests an Meerschweinchen (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13), erfordert der LLNA nicht, dass provozierte Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut ausgelöst werden. Außerdem wird beim LLNA, anders als beim Meerschweinchen-Maximierungstest, auf den Einsatz eines Adjuvans verzichtet (13). Daher erleiden die Tiere beim LLNA weniger Schmerzen und Qualen. Trotz der Vorteile, die der LLNA gegenüber B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 aufweist, sollte nicht verkannt werden, dass er mit gewissen Einschränkungen behaftet ist, die die Anwendung von Kapitel B.6 oder OECD-Prüfrichtlinie 406 (13) erforderlich machen können (*z. B.* falsch negative Ergebnisse des LLNA bei bestimmten Metallen, falsch positive Ergebnisse bei bestimmten hautreizenden Stoffen [wie etwa bei tensidähnlichen Chemikalien] (19) (20), oder Löslichkeit der Prüfsubstanz). Zudem können chemische Klassen oder Substanzen mit Funktionsgruppen, die erwiesenermaßen als potenzielle Verwechslungsfaktoren wirken können (21), den Einsatz von Meerschweinchen-Tests erforderlich machen (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13). Angesichts der begrenzten Validierungsdaten, die im Wesentlichen auf Pestizidformulierungen beruhen, ist die Wahrscheinlichkeit positiver Ergebnisse für diese Art von Prüfsubstanzen beim LLNA größer als beim Meerschweinchen-Test (22). Bei der Prüfung von Formulierungen könnte man jedoch in Erwägung ziehen, ähnliche Stoffe mit bekannten Ergebnissen als Vergleichssubstanzen einzuschließen, um das ordnungsgemäße Funktionieren des LLNA nachzuweisen (siehe Absatz 16). Abgesehen von diesen bekannten Beschränkungen dürfte der LLNA für die Prüfung aller Substanzen geeignet sein, sofern mit diesen Substanzen keine Eigenschaften verbunden sind, die die Genauigkeit des LLNA beeinträchtigen könnten.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

6. Der LLNA beruht auf dem Prinzip, dass sensibilisierende Stoffe eine Lymphozytenproliferation in den drainierenden Lymphknoten an der Stelle der Applikation des chemischen Stoffes induzieren. Diese Proliferation verläuft proportional zur Dosis und zur Wirkstärke des applizierten Allergens und bietet sich als einfache Möglichkeit an, eine quantitative Messung der Sensibilisierung zu erhalten. Die Proliferation wird gemessen, indem man die mittlere Proliferation jeder Prüfgruppe mit der mittleren Proliferation der mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe (VK) vergleicht. Das Verhältnis der mittleren Proliferation in jeder Behandlungsgruppe zu dem in der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe, auch als Stimulationsindex (SI) bezeichnet, wird festgelegt und sollte $\geq 3$ betragen, ehe eine Prüfsubstanz als potenzieller Hautsensibilisator klassifiziert wird. Die hier beschriebenen Methoden beruhen auf der Nutzung der radioaktiven *in vivo*-Markierung zur Messung einer erhöhten Anzahl proliferierender Zellen in den drainierenden aurikulären Lymphknoten. Allerdings kann man sich bei der Bewertung der Anzahl proliferierender Zellen auch auf andere Endpunkte stützen, sofern die Leistungsstandards vollständig eingehalten werden (Anlage 1).

▼M3

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

**Auswahl von Versuchstierarten**

7. Für diesen Test ist die Maus die Spezies der Wahl. Es werden junge ausgewachsene weibliche Mäuse (CBA/Ca- oder CBA/J-Stamm) verwendet, die weder geworfen haben noch trächtig sind. Bei Versuchsbeginn sollten die Tiere 8-12 Wochen alt sein; die Gewichtsunterschiede sollten minimal sein und 20 % des mittleren Gewichts nicht übersteigen. Alternativ können Tests an anderen Stämmen und männlichen Tieren erfolgen, wenn anhand von hinlänglich großen Datenangaben nachgewiesen werden kann, dass keine signifikanten stamm- und/oder geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Reaktion auf den LLNA bestehen.

**Haltungs- und Fütterungsbedingungen**

8. Mäuse sollten in Gruppen gehalten werden (23), wenn nicht angemessene wissenschaftliche Begründungen eine Einzelhaltung nahelegen. Die Temperatur im Versuchsraum sollte 22 ± 3 °C betragen. Obwohl die relative Luftfeuchtigkeit mindestens 30 % betragen und zu anderen Zeiten als während der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen soll, ist ein Wert von 50-60 % anzustreben. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, und eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung ist zu gewährleisten.

**Vorbereitung der Tiere**

9. Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zur individuellen Identifizierung gekennzeichnet (aber nicht am Ohr) und vor Beginn der Dosierung für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen gewöhnt. Vor Behandlungsbeginn werden alle Tiere untersucht, um sicherzustellen, dass keine sichtbaren Hautverletzungen bestehen.

**Vorbereitung der Dosierlösungen**

10. Feste Chemikalien sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in Lösungsmitteln/Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Chemikalien können direkt appliziert oder zuvor verdünnt werden. Unlösliche Chemikalien, wie sie in der Regel in Medizinprodukten vorliegen, sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in einem geeigneten Lösungsmittel einer übertrieben starken Extraktion unterzogen werden, um alle extrahierbaren Inhaltsstoffe vor der Prüfung sichtbar zu machen. Die Prüfsubstanzen sollten täglich zubereitet werden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

**Überprüfung der Zuverlässigkeit:**

11. Anhand von positiven Kontrollchemikalien (PC) wird die ordnungsgemäße Leistung des Tests nachgewiesen. Hierzu ist eine angemessene und reproduzierbare Empfindlichkeit der Reaktion auf eine sensibilisierende Prüfsubstanz erforderlich, wobei die Reaktionsstärke gut charakterisiert ist. Es wird die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrolle empfohlen, da diese die Fähigkeit des Labors belegt, jeden Test erfolgreich durchzuführen und eine Bewertung der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Labors ermöglicht. Eine Positivkontrolle für jede Studie wird auch von einigen Regulierungsbehörden vorgeschrieben. Daher wird Anwendern empfohlen, vor Durchführung des LLNA die zuständigen Behörden zu konsultieren. Dementsprechend wird die routinemäßige Verwendung einer gleichzeitigen Positivkontrolle angeraten, um die Notwendigkeit zusätzlicher Tierversuche zur Erfüllung von Anforderungen, die aus der Verwendung einer nur periodischen Positivkontrolle resultieren könnten, zu vermeiden (siehe Absatz 12). Die PC sollte eine positive Reaktion auf den LLNA bei einem Expositionsniveau hervorrufen, das einen Anstieg des Stimulationsindex (SI > 3 im Vergleich zur Negativkontrollgruppe, NK) bewirkt. Die positive Kontrolldosis soll so gewählt werden, dass sie keine übermäßige Hautreizung oder systemische Toxizität verursacht und

▼M3

die Induktion reproduzierbar, aber nicht exzessiv ist (*d. h.* ein SI > 20 wäre exzessiv). Bevorzugte positive Kontrollstoffe sind 25 % Hexylcinnaminaldehyd (Chemical Abstracts Service [CAS]-Nr. 101-86-0) in Aceton: Olivenöl (4:1, v/v) und 5 % Mercaptobenzothiazol (CAS-Nr. 149-30-4) in *N,N*-Dimethylformamid (siehe Anhang 1, Tabelle 1). Unter bestimmten Umständen können in ausreichend begründeten Fällen andere Kontrollsubstanzen eingesetzt werden, die den genannten Kriterien entsprechen.

12. Obwohl die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrollgruppe empfohlen wird, können in gewissen Situationen periodische Prüfungen (*d. h.* in Abständen ≤ 6 Monaten) der Positivkontrolle für Labors ausreichen, die den LLNA regelmäßig (*d. h.* mindestens einmal pro Monat) durchführen und über eine etablierte historische Kontrolldatenbasis verfügen, die die Fähigkeit des Labors bestätigt, reproduzierbare und genaue Ergebnisse mit Positivkontrollen zu erzielen. Eine angemessene Beherrschung des LLNA kann erfolgreich nachgewiesen werden, indem durchgehend positive Ergebnisse mit den positiven Kontrollchemikalien in mindestens 10 unabhängigen Prüfungen erzielt werden, die innerhalb eines angemessenen Zeitraums (*d. h.* in weniger als einem Jahr) durchgeführt wurden.

13. Eine gleichzeitige Positivkontrollgruppe sollte immer einbezogen werden, wenn Verfahrensänderungen im LLNA auftreten (*z. B.* Wechsel des geschulten Personals, Änderung der Materialien bei den Prüfmethoden und/oder der Reagenzien, Änderung der Ausrüstung, Änderung der Herkunft der Versuchstiere). Solche Änderungen sollten in Laborberichten dokumentiert werden. Ferner ist der Einfluss dieser Änderungen auf die Aussagefähigkeit der zuvor eingerichteten historischen Datenbank zu bedenken. Dabei sollte die Notwendigkeit überdacht werden, eine neue historische Datenbank einzurichten, um die gleichbleibende Qualität der positiven Kontrollergebnisse zu dokumentieren.

14. Die Prüfer sollten sich der Tatsache bewusst sein, dass die Entscheidung, eine PC-Studie periodisch statt gleichzeitig durchzuführen, Auswirkungen auf die Aussagefähigkeit und Akzeptanz negativer Studienergebnisse haben kann, die ohne gleichzeitige Positivkontrolle im Zeitraum zwischen den einzelnen periodischen PC-Studien auftreten können. Wenn zum Beispiel ein falsch negatives Ergebnis in der periodischen PC-Studie auftritt, können negative Ergebnisse für die Prüfsubstanz, die in dem Zeitraum zwischen der letzten akzeptablen periodischen PC-Studie und der inakzeptablen periodischen PC-Studie aufgetreten waren, in Frage gestellt werden. Die Auswirkungen solcher Ergebnisse sollten sorgfältig bedacht werden, wenn entschieden wird, ob gleichzeitige oder nur periodische PC-Studien durchgeführt werden sollen. Auch ist die Verwendung einer geringeren Anzahl an Versuchstieren bei der gleichzeitigen Positivkontroll-Gruppe zu bedenken, wenn dies wissenschaftlich zu begründen ist und wenn das Labor auf der Grundlage laborspezifischer historischer Daten nachweist, dass eine geringere Anzahl an Mäusen ausreicht (12).

15. Obwohl eine positive Kontrollchemikalie in dem Vehikel geprüft werden sollte, von dem bekannt ist, dass es eine gleichbleibende Reaktion hervorruft (*z. B.* Aceton: Olivenöl; 4:1, v/v), können in bestimmten Rechtssituationen auch Prüfungen in einem Nichtstandard-Vehikel (klinisch/chemisch relevante Formulierung) erforderlich sein (24). Wenn die gleichzeitige Positivkontrolle in einem anderen Vehikel als der Prüfsubstanz getestet wird, sollte eine gesonderte Vehikelkontrolle für die gleichzeitige PC einbezogen werden.

16. In Fällen, in denen Prüfsubstanzen einer bestimmten chemischen Klasse oder eine Reihe von Reaktionen bewertet werden, können Referenzsubstanzen nützlich sein, um nachzuweisen, dass die Prüfmethode zur Feststellung des Hautsensibilisierungspotenzials dieser Art von Substanzen ordnungsgemäß funktioniert. Geeignete Referenzsubstanzen sollten die folgenden Eigenschaften haben:

— strukturelle und funktionale Ähnlichkeit mit der Klasse der getesteten Prüfsubstanz;

— bekannte physikalische/chemische Eigenschaften;

— zugrunde liegende Daten aus dem LLNA;

— zugrunde liegende Daten aus anderen Tiermodellen und/oder von Menschen.

▼M3

TESTVERFAHREN

**Anzahl der Versuchstiere und Dosierungen**

17. Mindestens vier Tiere pro Dosisgruppe mit jeweils mindestens drei Konzentrationen der Prüfsubstanz werden benötigt; zusätzlich braucht man eine Negativkontrollgruppe, die nur mit dem Vehikel für die Prüfsubstanz behandelt wird, sowie eine Positivkontrolle (gleichzeitig oder jüngeren Datums, auf der Grundlage der Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11-14. Tests mit Mehrfachdosen der PC sollten in Erwägung gezogen werden, insbesondere wenn die Positivkontrolle intermittierend getestet wird. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

18. Die Auswahl der Dosis und des Vehikels soll anhand der Empfehlungen in (3) (5) erfolgen. Für aufeinanderfolgende Dosierungen werden normalerweise geeignete abgestufte Konzentrationen gewählt, wie z. B. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % usw. Die Auswahl der Konzentrationsfolge sollte angemessen wissenschaftlich begründet werden. Alle vorhandenen toxikologischen Angaben (*z. B.* über die akute Toxizität und Hautreizung) sowie strukturelle und physiochemische Angaben zu der jeweiligen Prüfsubstanz (und/oder strukturverwandten Substanzen) sollten bei der Festlegung von drei aufeinander folgenden Konzentrationen berücksichtigt werden, so dass bei der höchsten Konzentration einerseits die Exposition maximiert und andererseits eine systemische Toxizität und/oder eine übermäßige lokale Hautreizung ausgeschlossen werden (3) (25). Mangels solcher Informationen kann ein anfänglicher Dosisfindungstest erforderlich sein (siehe Absätze 21-24).

19. Das Vehikel sollte das Testergebnis nicht beeinflussen oder beeinträchtigen und sollte so gewählt werden, dass die Löslichkeit zur Erzielung einer möglichst hohen Konzentration maximiert und gleichzeitig eine für das Applizieren der Prüfsubstanz geeignete Lösung/Suspension hergestellt werden kann. Empfohlene Vehikel sind Aceton: Olivenöl (4:1, v/v), *N,N*-Dimethylformamid, Methylethylketon, Propylenglykol und Dimethylsulphoxid (19), wobei mit hinreichender wissenschaftlicher Begründung auch andere Vehikel verwendet werden können. Unter bestimmten Umständen muss ein klinisch relevantes Lösungsmittel oder die handelsübliche Zubereitung, in der die Prüfsubstanz vermarktet wird, als zusätzliche Kontrolle genutzt werden. Besondere Sorgfalt sollte darauf verwendet werden, zu gewährleisten, dass in das Vehikelsystem durch die Verwendung geeigneter Lösungsvermittler (*z. B.* 1 % Pluronic® L92) hydrophile Stoffe eingearbeitet werden, die die Haut befeuchten und nicht sofort ablaufen. Folglich sind vollständig wässrige Vehikel zu vermeiden.

20. Die Bearbeitung von Lymphknoten einzelner Mäuse ermöglicht die Bewertung der Variabilität von Tieren sowie einen statistischen Vergleich zwischen der Prüfsubstanz und Messungen an der Vehikelkontrollgruppe (siehe Absatz 35). Zudem besteht eine realistische Möglichkeit, die Anzahl der Mäuse in der Positivkontrollgruppe zu verringern, wenn Einzeltierdaten erhoben werden (12). Außerdem verlangen einige Regulierungsbehörden die Erhebung von Daten einzelner Tiere. Dennoch werden gepoolte Tierdaten von einigen Regulierungsbehörden als akzeptabel erachtet. In dieser Situation können Benutzer wahlweise einzelne oder gepoolte Tierdaten verwenden.

**Dosisfindungstest**

21. Wenn über die höchst mögliche Dosierung keine Informationen vorliegen (siehe Absatz 18), sollte ein Dosisfindungstest durchgeführt werden, um die geeignete Dosierung für den LLNA festzulegen. Der Dosisfindungstest soll eine Orientierung bei der Auswahl der höchst möglichen Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA in Fällen liefern, in denen keine Informationen über Konzentrationen vorliegen, die zur systemischen Toxizität (siehe Absatz 24) und/oder zu übermäßiger Hautreizung führen (siehe Absatz 23). Die höchsten geprüften Dosisstufen sollten 100 % der Prüfsubstanz bei Flüssigkeiten bzw. die höchst möglichen Konzentrationen bei Feststoffen oder Suspensionen sein.

▼M3

22. Der Dosisfindungstest wird unter Bedingungen durchgeführt, die denen der Hauptstudie des LLNA genau entsprechen. Allerdings gibt es hier keine Bewertung der Lymphknotenproliferation und es können weniger Tiere pro Dosisgruppe eingesetzt werden. Es werden ein oder zwei Tiere pro Dosisgruppe empfohlen. Alle Mäuse werden täglich auf klinische Zeichen für systemische Toxizität oder lokale Reizungen an der Applikationsstelle untersucht. Das Körpergewicht wird vor dem Test und vor dem Abschluss (Tag 6) protokolliert. Beide Ohren jeder Maus werden auf Anzeichen für Erytheme untersucht und mit Hilfe von Tabelle 1 bewertet (25). Die Ohrdicke wird mit Hilfe eines Ohrdickenmessgeräts (*z. B.* digitaler Mikrometer oder Peacock Dickenmessuhr) an Tag 1 vor der Dosierung, Tag 3 (ca. 48 Stunden nach der ersten Dosis) und Tag 6 bestimmt. Zusätzlich kann an Tag 6 die Ohrdicke durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben ermittelt werden. Dies sollte nach der tierschutzgerechten Tötung der Tiere erfolgen. Eine übermäßige lokale Hautreizung wird durch eine Erythem-Punktzahl von ≥ 3 und/oder eine Zunahme der Ohrdicke von ≥ 25 % an jedem beliebigen Messtag angezeigt (26) (27). Als höchste Dosis für die Hauptuntersuchung des LLNA wird die nächst niedrigere Dosis in der Konzentrationsreihe des Dosisfindungstests gewählt (siehe Absatz 18), die keine systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung verursacht.

*Tabelle 1*

**Erythem-Klassifizierung**

| Beobachtung | Punktzahl |
|---|---|
| Kein Erythem | 0 |
| Sehr leichtes Erythem (kaum wahrnehmbar) | 1 |
| Klar abgegrenztes Erythem | 2 |
| Mäßiges bis ausgeprägtes Erythem | 3 |
| Schweres Erythem (dunkelrot) bis hin zur Schorfbildung, so dass eine Bewertung nicht möglich ist | 4 |

23. Zusätzlich zu einer Zunahme der Ohrdicke um 25 % (26) (27) wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der Ohrdicke bei den behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen zugrunde gelegt, um Reizstoffe in dem LLNA zu identifizieren (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Obwohl ein statistisch signifikanter Anstieg der Ohrdicke von weniger als 25 % auftreten kann, konnte kein spezifischer Zusammenhang mit einer übermäßigen Hautreizung festgestellt werden (30) (32) (33) (34).

24. Die folgenden klinischen Beobachtungen können, sofern sie Bestandteil einer Gesamtbewertung sind, auf systemische Toxizität hinweisen (35) (36) und somit die höchst mögliche Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA anzeigen: Änderungen der Funktionen des Nervensystems (*z. B.* Piloerektion, Ataxie, Tremor und Krämpfe); Verhaltensänderungen (*z. B.* Aggressivität, Änderungen bei der Fellpflege, auffallende Änderung des Aktivitätsniveaus); Änderungen des Atemmusters (d. h. Änderung der Häufigkeit und Intensität des Atmens wie Dyspnoe, Keuchen, rasselnder Atem) sowie Änderungen der Futter- und Wasseraufnahme. Zusätzlich sollten Anzeichen von Lethargie und/oder Teilnahmslosigkeit sowie alle klinischen Anzeichen für mehr als leichte oder momentane Schmerzen und Qual, eine Gewichtsreduktion von > 5 % zwischen Tag 1 und Tag 6 und die Sterblichkeit in der Bewertung berücksichtigt werden. Moribunde Tiere oder Tiere, die Anzeichen starker und andauernder Qualen zeigen, sollten tierschutzgerecht getötet werden (37).

▼M3

**Versuchsplan der Hauptuntersuchung**

25. Der Versuchsplan des Tests ist wie folgt:

— Tag 1: Jedes Tier wird einzeln gekennzeichnet und das Gewicht sowie jede klinische Beobachtung werden protokolliert. Es werden 25 µL der Prüfsubstanz in der geeigneten Verdünnung, des Vehikels allein oder der Positivkontrolle (gleichzeitig oder jüngeren Datums gemäß den Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11-15) auf die Rückseite jedes Ohrs appliziert.

— Tage 2 und 3: Die am Tag 1 durchgeführte Applikationsprozedur wird wiederholt.

— Tage 4 und 5: Keine Behandlung.

— Tag 6: Das Gewicht jedes Tiers wird protokolliert. Es werden 250 µL sterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit 20 µCi ($7{,}4\times10^5$ Bq) von tritiiertem ($^3$H)-Methylthymidin in die Schwanzvenen aller Mäuse in den Prüf- und Kontrollgruppen injiziert. Alternativ dazu können 250 µL sterile PBS mit 2 µCi ($7{,}4\times10^4$ Bq) von $^{125}$I-Ioddeoxyuridin und $10^{-5}$M Fluorodeoxyuridin in die Schwanzvenen aller Mäuse injiziert werden. Fünf Stunden (5 h) später werden die Tiere tierschutzgerecht getötet. Die drainierenden aurikulären Lymphknoten jedes Mäuseohrs werden entfernt und für jedes Tier in PBS gepoolt (Einzeltiermethode); alternativ hierzu können auch die Lymphknoten jedes Ohrs entfernt und für jede der Versuchsgruppen in PBS gepoolt werden (Methode der gepoolten Behandlungsgruppe). Einzelheiten und Diagramme der Lymphknotenidentifikation und -entfernung sind unter Referenz (12) aufgeführt. Zur weiteren Kontrolle der lokalen Hautreaktion in der Hauptuntersuchung können zusätzliche Parameter wie die Auswertung des Ohr-Erythems oder Ohrdickemessungen (mittels eines Dickenmessgeräts oder durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben bei der Nekropsie) in das Untersuchungsprotokoll aufgenommen werden.

**Vorbereitung der Zellsuspensionen**

26. Aus den Lymphknotenzellen (LNC), die mittels der Einzeltiermethode oder mittels der Methode der gepoolten Behandlungsgruppe paarweise entnommen wurden, wird durch vorsichtigen mechanischen Aufschluss in einem Edelstahlfilter mit einer Maschenweite von 200 Mikron oder mittels einer anderen geeigneten Technik eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die LNC werden zweimal mit einem Überschuss an PBS gewaschen und die DNA wird bei 4 °C 18 Stunden lang mit 5 %iger Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt (3). Die Pellets werden entweder in 1 mL TCA resuspendiert und in Szintillationsfläschchen eingetragen, die 10 mL einer Szintillationsflüssigkeit für die $^3$H-Zählung enthalten, oder direkt in Gammazähler zur $^{125}$I-Bestimmung überführt.

**Bestimmung der Zellproliferation (der aufgenommenen Radioaktivität)**

27. Die Aufnahme von $^3$H-Methylthymidin wird mittels β-Szintillationszählung als Zerfallsereignisse pro Minute (disintegrations per minute; DPM) gemessen. Die Aufnahme von $^{125}$I-Ioddeoxyuridin wird mittels $^{125}$I-Zählung bestimmt und ebenfalls als DPM angegeben. In Abhängigkeit von der genutzten Methode wird die Aufnahme als DPM/Maus (Einzeltiermethode) oder als DPM/Behandlungsgruppe (Methode der gepoolten Behandlungsgruppe) angegeben.

**Reduzierter LLNA**

28. In gewissen Situationen, in denen aufgrund von Rechtsvorschriften lediglich die Bestätigung einer negativen Prädiktion über das Hautsensibilisierungspotenzial gefordert ist, kann ein optionales rLLNA-Protokoll (16) (17) (18) mit weniger Versuchstieren verwendet werden, vorausgesetzt dass alle anderen Protokollspezifikationen für den LLNA in dieser Prüfmethode eingehalten werden. Vor Einsatz des rLLNA sollten entsprechende Erläuterungen und eine wissenschaftliche Begründung für seine Verwendung vorgelegt werden. Sollte ein positives oder nicht eindeutiges Ergebnis erzielt werden, können weitere Tests erforderlich sein, um diese Daten zu deuten oder zu klären.

▼M3

29. Die zahlenmäßige Reduktion der Dosisgruppen ist der einzige Unterschied zwischen den Prüfmethodenprotokollen des LLNA und des rLLNA. Aus diesem Grund liefert der rLLNA keine Informationen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung. Der rLLNA sollte folglich nicht eingesetzt werden, wenn Informationen über die Dosis-Wirkungs-Beziehung benötigt werden. Ebenso wie im Multidosis-LLNA sollte die im rLLNA bewertete Konzentration der Prüfsubstanz die höchst mögliche Konzentration sein, die keine offensichtliche systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus verursacht (siehe Absatz 18).

BEOBACHTUNGEN

**Klinische Beobachtungen**

30. Jede Maus sollte mindestens einmal täglich sorgfältig auf klinische Zeichen, d. h. lokale Reizung an der Applikationsstelle, oder auf systemische Toxizität untersucht werden. Alle Beobachtungen werden systematisch in Einzelprotokollen dokumentiert, die für jedes Tier geführt werden. Die Überwachungspläne sollten Kriterien beinhalten, anhand derer Mäuse mit systemischer Toxizität, übermäßiger lokaler Hautreizung oder Hautätzung schnell zu Zwecken der schmerzlosen Tötung identifiziert werden können (37).

**Körpergewicht**

31. In Abschnitt 25 wurde bereits ausgeführt, dass das Körpergewicht der einzelnen Tiere zu Versuchsbeginn und zum Zeitpunkt der tierschutzgerechten Tötung der Tiere laut Versuchsplan festgestellt werden soll.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

32. Die Ergebnisse für jede Behandlungsgruppe werden als Stimulationsindex (SI) angegeben. Bei Einsatz der Einzeltiermethode erhält man den SI durch Teilen der mittleren DPM pro Maus innerhalb jeder Prüfgruppe und der Positivkontrollgruppe durch die mittleren DPM pro Maus für die Lösungsmittel/Vehikelkontrollgruppe. Der durchschnittliche SI beträgt demnach für die mit Vehikel behandelten Kontrollen 1. Bei Einsatz der Methode der gepoolten Behandlungsgruppe erhält man den SI, indem die für jede Behandlungsgruppe ermittelte Gesamtaufnahme an Radioaktivität durch die Aufnahme in der gepoolten Vehikelkontrollgruppe dividiert wird; hieraus ergibt sich der mittlere SI.

33. In dem Entscheidungsprozess gilt ein Ergebnis als positiv, wenn der SI $\geq 3$ ist. Die Stärke der Dosis-Wirkung, die statistische Signifikanz und die gleichbleibende Qualität der Lösungsmittel-/Vehikel-Reaktion sowie der Reaktion der Positivkontrolle können aber auch benutzt werden, um festzulegen, ob ein Grenzergebnis als positiv bezeichnet werden soll (4) (5) (6).

34. Sofern Klärungsbedarf in Bezug auf die Ergebnisse besteht, sollten die verschiedenen Eigenschaften der Prüfsubstanz beachtet werden, wobei es unter anderem zu klären gilt, ob ein struktureller Zusammenhang mit bekannten Hautsensibilisatoren besteht, ob sie eine übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus hervorruft und wie die festgestellte Art der Reaktion bezüglich der Dosis ist. Diese und weitere Aspekte werden an anderer Stelle ausführlich erörtert (7).

35. Werden die Daten zur Radioaktivität für jede einzelne Maus erhoben, kann eine statistische Analyse zu Vorhandensein und Grad des Dosis-Wirkungs-Verhältnisses in den Daten durchgeführt werden. Jede statistische Auswertung könnte eine Bewertung der Dosis-Wirkungs-Beziehung sowie geeignete Testgruppen-Vergleiche beinhalten (*z. B.* Gruppe mit paarweiser Dosierung gegen gleichzeitige Vehikelkontrollgruppe). Die statistischen Analysen könnten z. B. die lineare Regression, den Williams-Test zur Bewertung von Dosis-Wirkungs-Trends oder den Dunnett-Test für paarweise Vergleiche beinhalten. Bei der Auswahl einer geeigneten Methode für die statistische Analyse sollte sich der Prüfer möglicher ungleicher Varianzen und anderer damit zusammenhängender Probleme stets bewusst sein, denn diese erfordern unter Umständen eine Datentransformation oder ein nicht-parametrisches statistisches Verfahren. Auf jeden Fall muss der Prüfer unter Umständen SI-Berechnungen und statistische Analysen mit und ohne bestimmte Datenpunkte (manchmal als „Ausreißer“ bezeichnet) vornehmen.

▼M3

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Daten**

36. Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Bei Einsatz der Einzeltiermethode sollten sie die DPM-Einzelwerte, die mittleren DPM-Gruppenwerte pro Tier, die damit verbundene Fehlervariable (*z. B.* SD, SEM) und den mittleren SI für jede Dosisgruppe, verglichen mit der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe angeben. Bei Einsatz der Methode der gepoolten Behandlungsgruppe werden die mittleren/medianen DPM und der mittlere SI für jede Dosisgruppe mit der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe verglichen.

**Prüfbericht**

37. Der Testbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüf- und Kontrollsubstanzen:

— Angaben zur Identität (*z. B.* CAS-Nummer und EG-Nummer, falls vorhanden; Bezugsquelle; Reinheit; bekannte Verunreinigungen; Chargennummer);

— physikalische Beschaffenheit und physikalisch-chemische Eigenschaften (*z. B.* Flüchtigkeit, Stabilität, Löslichkeit);

— bei Mischungen Zusammensetzung und relative Anteile der Bestandteile in Prozent;

Lösungsmittel/Vehikel:

— Angaben zur Identität (Reinheit, Konzentration, gegebenenfalls verwendete Mengen);

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

Versuchstiere:

— Herkunft der CBA-Mäuse;

— mikrobiologischer Status der Tiere, soweit bekannt;

— Anzahl und Alter der Tiere;

— Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

Prüfbedingungen:

— Angaben zur Vorbereitung und Applikation der Prüfsubstanz;

— Begründung der gewählten Dosierung (mit Ergebnissen des eventuell durchgeführten Dosisfindungstests);

— verwendete Konzentrationen des Vehikels und der Prüfsubstanz sowie Gesamtmenge der applizierten Prüfsubstanz;

— Angaben über Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Wasserquelle);

— nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;

— Methoden zur Bestimmung der Toxizität;

— Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv oder negativ;

— Einzelheiten zu eventuellen Protokollabweichungen und eine Erklärung dazu, wie sich diese Abweichung auf Prüfdesign und Ergebnisse auswirkt.

Überprüfung der Zuverlässigkeit:

— Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der letzten Überprüfung der Zuverlässigkeit mit Angaben zu verwendeten Prüfsubstanzen, Konzentration und Vehikel;

— gleichzeitige und/oder historische PC und gleichzeitige Daten zur NK für das Prüflabor;

▼M3

— wenn keine gleichzeitige PC eingeschlossen war, Datum und Laborbericht über die jüngste periodische PC sowie ein Bericht mit ausführlichen Angaben über die historischen positiven Kontrolldaten des Labors mit Angabe der Gründe, warum keine gleichzeitige PC genutzt wurde;

Ergebnisse:

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Beginn der Prüfung und zum Zeitpunkt der Tötung laut Versuchsplan, sowie mittlere und zugehörige Fehlervariable (*z. B.* SD, SEM) für jede Behandlungsgruppe;

— Beginn und zeitlicher Verlauf der toxischen Erscheinungen für jedes Tier, einschließlich gegebenenfalls Hautreizungen an der Stelle der Verabreichung;

— eine Tabelle der DPM-Werte sowie der SI-Werte jeder einzelnen Maus (Einzeltiermethode) oder der mittleren/medianen Werte (Methode der gepoolten Behandlungsgruppe) jeder Behandlungsgruppe;

— mittlere verbundene Fehlervariable (*z. B.* SD, SEM) für DPM/Maus für jede Behandlungsgruppe sowie die Ergebnisse der Ausreißer-Analyse für jede Behandlungsgruppe bei Einsatz der Einzeltiermethode;

— berechneter SI und geeignete Messung der Variabilität, welche die Variabilität der Tiere sowohl in der Behandlungsgruppe als auch in der Kontrollgruppe berücksichtigt, sofern die Einzeltiermethode benutzt wird;

— Dosis-Wirkungs-Beziehung;

— gegebenenfalls statistische Analysen;

Diskussion der Ergebnisse:

— kurze Kommentierung der Ergebnisse, der Dosis-Wirkungs-Beziehung und gegebenenfalls statistische Analysen mit Schlussfolgerungen zur Frage, ob die Prüfsubstanz als Hautsensibilisator eingestuft werden soll.

LITERATUR

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Abrufbar unter: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

*Anlage 1*

**Leistungsstandards für die Bewertung vorgeschlagener ähnlicher oder modifizierter Llna-Prüfmethoden zur Einschätzung der Hautsensibilisierung**

EINLEITUNG

1. Ziel der Leistungsstandards (Performance Standards; PS) ist es, die Grundlage zu vermitteln, auf der neue Prüfmethoden, seien diese geschützt (d. h. per Urheberrecht, Handelsmarken, eingetragene Marken) oder nicht geschützt, als ausreichend genau und zuverlässig für spezifische Prüfzwecke beurteilt werden können. Diese auf validierten und akzeptierten Prüfmethoden basierenden Leistungsstandards können verwendet werden, um die Zuverlässigkeit und Genauigkeit anderer vergleichbarer Methoden (umgangssprachlich als „Me-too"-Tests bezeichnet) zu bewerten, die auf ähnlichen wissenschaftlichen Prinzipien beruhen und denselben biologischen oder toxischen Effekt messen oder vorhersagen (14).

2. Vor der Annahme modifizierter Methoden (d. h. vorgeschlagener potenzieller Verbesserungen einer genehmigten Prüfmethode) sollte eine Bewertung erfolgen, um die Auswirkung der vorgeschlagenen Änderungen auf die Leistung des Tests und das Maß zu bewerten, in dem eine solche Änderung die verfügbare Information für andere Elemente des Validierungsprozesses beeinflusst. Je nach Anzahl und Art der vorgeschlagenen Änderungen, den generierten Daten und der Begleitdokumentation für diese Änderungen, sollten sie entweder dem für neue Tests beschriebenen Validierungsprozess, oder — gegebenenfalls — einer begrenzten Zuverlässigkeits- und Relevanzprüfung nach etablierten Leistungsstandards unterzogen werden (14).

3. Vorgeschlagene vergleichbare oder modifizierte Methoden zur Verwendung nach der vorliegenden Prüfmethode sollten anhand von Chemikalien, die die volle Bandbreite der LLNA-Einstufungen repräsentieren, auf ihre Zuverlässigkeit und Genauigkeit untersucht werden. Um den ungerechtfertigten Einsatz von Tieren zu vermeiden, wird Modell-Entwicklern nachdrücklich empfohlen, sich vor Beginn der Validierungsstudien in Übereinstimmung mit den in dieser Prüfmethode niedergelegten Leistungsstandards und Leitlinien an die zuständigen Behörden zu wenden.

4. Diese Leistungsstandards beruhen auf den US-ICCVAM, EC-ECVAM sowie den harmonisierten japanischen Leistungsstandards JaCVAM (12) und können zur Bewertung der Validität vergleichbarer oder modifizierter Versionen des LLNA herangezogen werden. Diese Leistungsstandards umfassen die wesentlichen Elemente der Prüfmethoden, empfohlene Referenzsubstanzen und die Standards für Genauigkeit und Zuverlässigkeit, welche die vorgeschlagene Methode erfüllen oder übertreffen sollten.

I. **Wesentliche Elemente der Prüfmethode**

5. Um sicherzustellen, dass eine vergleichbare oder modifizierte LLNA-Methode dem LLNA funktionell und mechanistisch entspricht und dass sie dieselben biologischen Wirkungen misst, sollten die folgenden Elemente in das Protokoll der Prüfmethode aufgenommen werden:

— Die Prüfsubstanz sollte oberflächlich an beiden Mäuseohren appliziert werden.

— Die Lymphozytenproliferation sollte in den drainierenden Lymphknoten an der Stelle der Applikation der Prüfsubstanz gemessen werden.

— Die Lymphozytenproliferation sollte während der Induktionsphase der Hautsensibilisierung gemessen werden.

▼M3

— Bei Prüfsubstanzen sollte die gewählte Höchstdosis die höchstmögliche Konzentration sein, die keine systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus verursacht. Bei positiven Referenzsubstanzen sollte die höchste Dosis mindestens so hoch sein wie die LLNA EC3-Werte der entsprechenden Referenzsubstanzen (siehe Tabelle 1), ohne dass eine systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus verursacht wird.

— In jede Studie sollte eine gleichzeitige Vehikelkontrolle aufgenommen werden sowie gegebenenfalls eine gleichzeitige Positivkontrolle.

— Es sollten mindestens vier Tiere pro Dosisgruppe verwendet werden.

— Es können entweder Einzeltierdaten oder gepoolte Daten verwendet werden.

Ist eines dieser Kriterien nicht erfüllt, können diese Leistungsstandards nicht zur Validierung der vergleichbaren oder modifizierten Methode verwendet werden.

II. **Mindestliste der Referenzsubstanzen**

6. Die US-ICCVAM, EC-ECVAM und die harmonisierten japanischen Leistungsstandards JaCVAM PS (12) geben 18 Mindest-Referenzsubstanzen an, die verwendet werden sollten, sowie vier wahlfreie in den Leistungsstandards des LLNA enthaltene Referenzsubstanzen (Substanzen, die im Vergleich zu den Ergebnissen von Tests am Menschen oder am Meerschweinchen (B.6, oder OECD-Prüfrichtlinie 406) (13) im LLNA entweder falsch positive oder falsch negative Ergebnisse hervorriefen und daher möglicherweise eine gleichwertige oder bessere Leistung als der LLNA nachweisen könnten). Die Auswahl dieser chemischen Stoffe erfolgte nach folgenden Kriterien:

— die Liste der Referenzsubstanzen enthielt die Typen von Stoffen, die üblicherweise auf ihr Hautsensibilisierungspotenzial untersucht werden sowie die ganze Bandbreite der Reaktionen, die mittels des LLNA gemessen oder vorhergesagt werden können;

— die Substanzen hatten klar definierte chemische Strukturen;

— für jede Substanz lagen LLNA-Daten aus Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13) und (soweit möglich) Daten aus Tests am Menschen vor, und

— die Substanzen waren problemlos im Handel erhältlich.

Die empfohlenen Referenzsubstanzen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Studien mit den vorgeschlagenen Referenzsubstanzen sollten in dem Vehikel bewertet werden, mit dem sie in Tabelle 1 aufgelistet sind. Sollte eine angegebene Substanz nicht verfügbar sein, können andere Substanzen, die die genannten Auswahlkriterien erfüllen, mit entsprechender Begründung verwendet werden.

▼M3

*Tabelle 1*

**Empfohlene chemische Rreferenzsubstanzen für die Leistungsstandards des LLNA**

| Nummer | Chemikalien (1) | CAS-Nr. | Form | Veh (2) | EC3 % (3) | N (4) | 0,5 x — 2,0 x EC3 | Tatsächlicher EC3-Bereich | LLNA vs. GP | LLNA vs. Test am Menschen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (CMI)/2-methyl-4-isothiazolin-3-on (MI) (5) | 26172-55-4/2682-20-4 | Liq | DMF | 0,009 | 1 | 0,0045-0,018 | NC | +/+ | +/+ |
| 2 | DNCB | 97-00-7 | Sol | AOO | 0,049 | 15 | 0,025-0,099 | 0.02-0.094 | +/+ | +/+ |
| 3 | 4-Phenylenediamin | 106-50-3 | Sol | AOO | 0,11 | 6 | 0,055-0,22 | 0.07-0.16 | +/+ | +/+ |
| 4 | Cobaltchlorid | 7646-79-9 | Sol | DMSO | 0,6 | 2 | 0,3-1,2 | 0.4-0.8 | +/+ | +/+ |
| 5 | Isoeugenol | 97-54-1 | Liq | AOO | 1,5 | 47 | 0,77-3,1 | 0.5-3.3 | +/+ | +/+ |
| 6 | 2-Mercaptobenzothiazol | 149-30-4 | Sol | DMF | 1,7 | 1 | 0,85-3,4 | NC | +/+ | +/+ |
| 7 | Citral | 5392-40-5 | Liq | AOO | 9,2 | 6 | 4,6-18,3 | 5,1-13 | +/+ | +/+ |
| 8 | HCA | 101-86-0 | Liq | AOO | 9,7 | 21 | 4,8-19,5 | 4,4-14,7 | +/+ | +/+ |
| 9 | Eugenol | 97-53-0 | Liq | AOO | 10,1 | 11 | 5,05-20,2 | 4,9-15 | +/+ | +/+ |
| 10 | Phenylbenzoat | 93-99-2 | Sol | AOO | 13,6 | 3 | 6,8-27,2 | 1,2-20 | +/+ | +/+ |
| 11 | Zimtalkohol | 104-54-1 | Sol | AOO | 21 | 1 | 10,5-42 | NC | +/+ | +/+ |
| 12 | Imidazolidinylharnstoff | 39236-46-9 | Sol | DMF | 24 | 1 | 12-48 | NC | +/+ | +/+ |
| 13 | Methylmethacrylat | 80-62-6 | Liq | AOO | 90 | 1 | 45-100 | NC | +/+ | +/+ |
| 14 | Chlorbenzol | 108-90-7 | Liq | AOO | 25 | 1 | NA | NA | –/– | –/ (*) |
| 15 | Isopropanol | 67-63-0 | Liq | AOO | 50 | 1 | NA | NA | –/– | –/+ |

▼M3

| Nummer | Chemikalien ([1]) | CAS-Nr. | Form | Veh ([2]) | EC3 % ([3]) | N ([4]) | 0,5 x — 2,0 x EC3 | Tatsächlicher EC3-Bereich | LLNA vs. GP | LLNA vs. Test am Menschen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 16 | Milchsäure | 50-21-5 | Liq | DMSO | 25 | 1 | NA | NA | –/– | –/ (*) |
| 17 | Methylsalicylat | 119-36-8 | Liq | AOO | 20 | 9 | NA | NA | –/– | –/– |
| 18 | Salicylsäure | 69-72-7 | Sol | AOO | 25 | 1 | NA | NA | –/– | –/– |
| Wahlfreie Substanzen zum Nachweis einer verbesserten Leistung im Vergleich zum LLNA | | | | | | | | | | |
| 19 | Natriumlaurylsulphat | 151-21-3 | Sol | DMF | 8,1 | 5 | 4,05-16,2 | 1,5-17,1 | +/– | +/– |
| 20 | Ethylenglykoldimethacrylat | 97-90-5 | Liq | MEK | 28 | 1 | 14-56 | NC | +/– | +/+ |
| 21 | Xylol | 1330-20-7 | Liq | AOO | 95,8 | 1 | 47,9-100 | NC | +/ (**) | +/– |
| 22 | Nickelchlorid | 7718-54-9 | Sol | DMSO | 5 | 2 | NA | NA | –/+ | –/+ |

Abkürzungen: AOO = Aceton: Olivenöl (4:1, v/v); CAS-Nr. = Chemical Abstracts Service Number; DMF = *N,N*-Dimethylformamid; DMSO = Dimethylsulfoxid; DNCB = 2,4-Dinitrochlorobenzol; EC3 = geschätzte Konzentration, die zur Erzeugung des Stimulationsindex von 3 benötigt wird; GP = Ergebnis des Meerschweinchen-Tests (B. 6 oder OECD-Prüfrichtlinie 406) (13); HCA = Hexylcinnaminaldehyd; Liq = flüssig; LLNA = Ergebnis des lokalen Lymphknotentests an der Maus (B. 42 oder OECD-Prüfrichtlinie 429) (1); MEK = Methylethylketon; NA = nicht zutreffend, da Stimulationsindex < 3; NC = nicht berechnet, da Daten aus Einzelstudie stammen; Sol = fest; Veh = Testvehikel.

(*) Gilt als nicht sensibilisierend beim Menschen, da keine Ergebnisse klinischer Epikutantests (Patch-Tests) vorliegen, da es nicht als Allergen im Patch-Test-System aufgeführt ist und keine Fallberichte für die Sensibilisierung beim Menschen verfügbar sind.

(**) GP-Daten nicht verfügbar.

([1]) Die Prüfsubstanzen sollten täglich zubereitet werden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

([2]) Aufgrund der potenziellen Beeinträchtigung der Leistung des LLNA durch die Verwendung abweichender Vehikel sollte stets das empfohlene Vehikel für jede Referenzsubstanz verwendet werden (24) (32).

([3]) Mittelwert wenn mehr als ein EC3-Wert vorlag. Bei negativen Substanzen (*d. h.* mit einem Stimulationsindex < 3) wird die höchste getestete Konzentration angegeben.

([4]) Zahl der LLNA-Studien, von denen Daten vorliegen.

([5]) Im Handel als Kathon CG (CAS-Nr. 55965-84-9) erhältlich; es handelt sich um ein 3:1-Gemisch aus CMI und MI. Die relativen Konzentrationen jedes Bestandteils liegen zwischen 1,1 % und 1,25 % (CMI) bzw. 0,3 % und 0,45 % (MI). Die nicht wirksamen Bestandteile sind Magnesiumsalze (21,5 % bis 24 %) und Kupfernitrat (0,15 % bis 0,17 %); 74 % bis 77 % sind Wasser. Kathon CG ist bei Sigma-Aldrich und Rohm and Haas (nun Dow Chemical Corporation) erhältlich.

▼M3

III. **Vorgegebene Zuverlässigkeits- und Genauigkeitsstandards**

7. Die Genauigkeit einer vorgeschlagenen vergleichbaren oder modifizierten LLNA-Methode sollte bei ihrer Bewertung anhand der 18 zu verwendenden Mindest-Referenzsubstanzen die Genauigkeit der LLNA-Leistungsstandards erreichen oder übertreffen. Die neue oder modifizierte Methode sollte zu der richtigen Einstufung auf der Grundlage einer „Ja/Nein"-Entscheidung führen. Es könnte allerdings sein, dass die neue oder modifizierte Methode nicht zur richtigen Einstufung aller zu verwendenden Mindest-Referenzsubstanzen führt. Wenn zum Beispiel einer der schwach sensibilisierenden Stoffe falsch klassifiziert wird, sollten eine wissenschaftliche Begründung für die falsche Einstufung sowie die Vorlage zusätzlicher Daten (z. B. Testergebnisse, die korrekte Einstufungen für andere Stoffe mit physikalischen, chemischen und sensibilisierenden Eigenschaften zeigen, die denen der falsch eingestuften Referenzsubstanz gleichen) in Erwägung gezogen werden, um eine gleichwertige Leistung nachzuweisen. Unter diesen Umständen würde der Validierungsstatus der neuen oder modifizierten LLNA-Prüfmethode für jeden Einzelfall bewertet werden.

*Intra-Labor-Reproduzierbarkeit*

8. Zur Bestimmung der Intra-Labor-Reproduzierbarkeit sollte eine neue oder modifizierte LLNA-Methode unter Verwendung einer sensibilisierenden Substanz beurteilt werden, die im LLNA bereits gut bekannt ist. Daher basieren die LLNA-Leistungsstandards auf der Variabilität der Ergebnisse aus wiederholten Tests an Hexylcinnaminaldehyd (HCA). Um die Intra-Labor-Zuverlässigkeit zu bewerten, werden die Werte für die geschätzte Konzentrationsschwelle (ECt) für HCA zu vier verschiedenen Zeitpunkten ermittelt, zwischen denen jeweils mindestens eine Woche liegen sollte. Eine akzeptable Intra-Labor-Reproduzierbarkeit zeigt sich in der Fähigkeit eines Labors, in jedem HCA-Test ECt-Werte zwischen 5 % und 20 % zu erzielen, was einer Bandbreite von 0,5-2,0 mal dem mittleren spezifizierten EC3-Wert für HCA (10 %) im LLNA entspricht (siehe Tabelle 1).

*Inter-Labor-Reproduzierbarkeit*

9. Zur Bestimmung der Inter-Labor-Reproduzierbarkeit sollte eine neue oder modifizierte LLNA-Methode unter Verwendung von zwei sensibilisierenden Substanzen beurteilt werden, die im LLNA bereits gut bekannt sind. Die LLNA-Leistungsstandards basieren auf der Variabilität der Ergebnisse aus Tests an HCA und 2,4-Dinitrochlorobenzol (DNCB) in unterschiedlichen Laboratorien. Die ECt-Werte sollten unabhängig aus einer einzelnen Studie abgeleitet werden, die in mindestens drei gesonderten Laboratorien durchgeführt wurde. Zum Nachweis einer akzeptablen Inner-Labor-Reproduzierbarkeit sollte jedes Labor ECt-Werte zwischen 5 % und 20 % für HCA und 0,025 % bis 0,1 % für DNCB erzielen, was einer Bandbreite von jeweils 0,5-2,0 mal den mittleren spezifizierten EC3-Konzentrationen für HCA (10 %) und DBCB (0,05 %) im LLNA entspricht (siehe Tabelle 1).

▼M3

*Anlage 2*

**Begriffsbestimmungen**

*Genauigkeit:* Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (14).

*Vergleichssubstanz:* Eine sensibilisierende oder nicht sensibilisierende Substanz, die als Standard zu Vergleichszwecken für eine Prüfsubstanz verwendet wird. Eine Vergleichssubstanz sollte die folgenden Eigenschaften haben: i) gleichbleibende und verlässliche Quelle(n); ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; iv) unterstützende Daten zu bekannten Effekten und v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

*Geschätzte Konzentrationsschwelle (ECt):* Geschätzte Konzentration einer Prüfsubstanz, die benötigt wird, um einen Stimulationsindex zu erzeugen, der eine positive Reaktion anzeigt.

*Effektive Konzentration drei (EC3):* Geschätzte Konzentration einer Prüfsubstanz, die benötigt wird, um einen Stimulationsindex von drei hervorzurufen.

*Falsch negativ:* Eine Prüfsubstanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als negativ oder nicht wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit positiv bzw. wirksam ist.

*Falsch positiv:* Eine Prüfsubstanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als positiv oder wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit negativ bzw. nicht wirksam ist.

*Gefahr:* Potenzial eines schädlichen Effekts für Gesundheit oder Umwelt. Die schädliche Wirkung manifestiert sich nur, wenn es zu einem ausreichenden Expositionsniveau kommt.

*Inter-Labor-Reproduzierbarkeit:* Das Ausmaß, in dem unterschiedliche qualifizierte Laboratorien, die dasselbe Protokoll verwenden und dieselben Prüfsubstanzen testen, qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen können. Die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wird während der Prävalidierungs- und Validierungsverfahren ermittelt und zeigt das Maß an, in dem ein Test erfolgreich zwischen Laboratorien übertragen werden kann. Im englischen Sprachgebrauch spricht man in diesem Zusammenhang auch von „Between-laboratory reproducibility“ (14).

*Intra-Labor-Reproduzierbarkeit:* Das Ausmaß, in dem qualifizierte Personen innerhalb desselben Labors, die dasselbe spezifische Protokoll zu unterschiedlichen Zeiten verwenden, erfolgreich dieselben Ergebnisse replizieren können. In diesem Zusammenhang spricht man auch von laborinterner Reproduzierbarkeit (14).

*Me-too-Test:* Umgangssprachliche Bezeichnung einer Prüfmethode, die strukturell und funktionell mit einer validierten und akzeptierten Referenzprüfmethode vergleichbar ist. Eine solche Prüfmethode käme für die Catch-up-Validierung in Frage. Gleichbedeutend mit vergleichbarer Prüfmethode verwendet (14).

*Ausreißer:* Ein Ausreißer ist ein Messwert, der sich beträchtlich von anderen Werten in einem zufällig ausgewählten Muster in einer Population unterscheidet.

*Leistungsstandards (PS):* Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, funktionell und mechanistisch ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzsubstanzen, ausgewählt aus den Substanzen, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen ähnliche Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzsubstanzen demonstrieren sollte (14).

*Geschützte Prüfmethode:* Eine Prüfmethode, deren Herstellung und Vertrieb durch Patente, Urheberrechte, Handelsmarken usw. beschränkt sind.

▼**M3**

*Qualitätssicherung:* Ein Managementprozess, mittels dessen die Einhaltung von Laborprüfnormen, Anforderungen und Aufzeichnungsverfahren sowie die Genauigkeit des Datentransfers durch Individuen bewertet wird, die von den testenden Personen unabhängig sind.

*Referenzsubstanzen:* Chemikalien, die zur Verwendung im Validierungsprozess ausgewählt werden und für die die Reaktionen innerhalb des *in vitro*- oder *in vivo*-Referenztestsystems oder der untersuchten Spezies bereits bekannt sind. Diese Chemikalien sollten repräsentativ für die Chemikalienklassen sein, für die die Prüfmethode voraussichtlich verwendet werden soll; ferner sollten sie die ganze Bandbreite an Reaktionen abdecken, die von den Zielchemikalien erwartet werden kann — von stark über schwach bis negativ. Für die unterschiedlichen Stadien des Validierungsprozesses, für verschiedene Prüfmethoden und Testverwendungen können unterschiedliche Reihen von Referenzchemikalien benötigt werden (14).

*Relevanz:* Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen dem Test und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem der Test die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz beinhaltet eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode (14).

*Zuverlässigkeit:* Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit der Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (14).

*Hautsensibilisierung:* Ein immunologischer Prozess, der auftritt, wenn ein empfindliches Individuum oberflächlich einem induzierenden chemischen Allergen ausgesetzt ist, das eine kutane Immunreaktion auslöst, die zur Entwicklung einer Kontaktsensibilisierung führen kann.

*Stimulationsindex (SI):* Ein Wert, der zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials einer Prüfsubstanz berechnet wird. Der SI ist das Verhältnis der Proliferation in behandelten Gruppen zu dem der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe.

*Prüfsubstanz (auch Prüfchemikalie):* Jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

*Validierte Prüfmethode:* Eine Prüfmethode, für die Validierungsstudien durchgeführt wurden, um die Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Verwendungszweck zu bestimmen. Es ist zu beachten, dass die Leistungsfähigkeit einer validierten Prüfmethode im Hinblick auf Genauigkeit und Zuverlässigkeit unter Umständen nicht den Anforderungen eines vorgeschlagenen Verwendungszwecks genügt (14).

▼B

B.43. **PRÜFUNG AUF NEUROTOXIZITÄT BEI NAGETIEREN**

1. **METHODE**

Diese Methode entspricht der OECD TG 424 (1997).

Diese Prüfmethode wurde zur Gewinnung von Informationen entwickelt, die benötigt werden, um die potenzielle Neurotoxizität von Chemikalien bei ausgewachsenen Tieren zu bestätigen oder näher zu charakterisieren. Sie kann entweder mit bestehenden Testmethoden für Prüfungen auf Toxizität bei wiederholter Verabreichung kombiniert oder als Einzelstudie durchgeführt werden. Es wird empfohlen, das OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1) als Hilfe hinzuzuziehen, wenn auf der Basis dieser Prüfmethode Studien entwickelt werden. Dies ist besonders dann wichtig, wenn Änderungen der für die routinemäßige Anwendung dieser Methode empfohlenen Beobachtungen und Testverfahren in Betracht gezogen werden. Das Guidance Document wurde erarbeitet, um die Auswahl abweichender Testverfahren für spezifische Anwendungsbedingungen zu vereinfachen.

Die Beurteilung einer Entwicklungs-Neurotoxizität ist nicht Ziel dieser Methode.

1.1. EINLEITUNG

Bei der Beurteilung und Bewertung der toxischen Eigenschaften von Chemikalien muss das Potenzial für neurotoxische Wirkungen berücksichtigt werden. Die Prüfmethode für systemische Toxizität bei wiederholter Verabreichung umfasst bereits Untersuchungen, mit denen auf potenzielle Neurotoxizität getestet wird. Diese Prüfmethode kann zur Entwicklung einer Studie eingesetzt werden, die zu weiteren Informationen über neurotoxische Wirkungen führt, die bei den Studien zur systemischen Toxizität bei wiederholter Verabreichung beobachtet wurden, oder diese Wirkungen bestätigt. Überlegungen zur potenziellen Neurotoxizität bestimmter Chemikalienklassen können jedoch zu der Vermutung führen, dass mit Hilfe dieser Methode eine zweckmäßigere Auswertung möglich ist, auch wenn vorherige Studien zur systemischen Toxizität bei wiederholter Verabreichung nicht auf eine potenzielle Neurotoxizität dieser Chemikalien hingewiesen haben. Anhaltspunkte für Überlegungen dieser Art können beispielsweise sein:

— Beobachtung neurologischer Anzeichen oder neuropathologische Befunde bei anderen Toxizitätsstudien als Studien zur systemischen Toxizität bei wiederholter Verabreichung oder

— strukturelle Verwandtschaft mit bekannten neurotoxischen Substanzen oder sonstige Informationen, durch die sie mit diesen in Verbindung gebracht werden.

Darüber hinaus sind weitere Fälle vorstellbar, in denen die Anwendung dieser Prüfmethode sinnvoll ist (siehe (1)).

Bei der Entwicklung dieser Methode wurde darauf geachtet, dass sie in spezielle Anforderungen angepasst werden kann, um die spezifische histopathologische und verhaltensbezogene Neurotoxizität einer Chemikalie zu bestätigen und eine Charakterisierung und Quantifizierung der neurologischen Wirkungen zu ermöglichen.

▼B

In der Vergangenheit wurde Neurotoxizität mit Neuropathie in Form von neuropathologischen Befunden oder neurologischen Funktionsstörungen wie Krämpfen, Lähmungen oder Tremor gleichgesetzt. Neuropathie ist eine wichtige Ausprägung einer neurotoxischen Wirkung; heute ist jedoch unstrittig, dass noch viele weitere Anzeichen toxischer Wirkungen auf das Nervensystem in Betracht kommen (z. B. Verlust der motorischen Koordination, sensorische Defizite, Funktionsstörungen hinsichtlich Lernfähigkeit und Gedächtnis), die in der Neuropathie oder in anderweitigen Studien eventuell nicht berücksichtigt werden.

Diese Methode zur Prüfung auf Neurotoxizität wurde für die Erkennung deutlicher verhaltensbezogener und neuropathologischer Wirkungen bei ausgewachsenen Nagetieren entwickelt. Verhaltensbezogene Wirkungen können einen schädlichen Einfluss auf den Organismus widerspiegeln, selbst wenn keine morphologischen Veränderungen auftreten; nicht aber alle Verhaltensänderungen sind für das Nervensystem spezifisch. Daher sollen alle beobachteten Änderungen im Zusammenhang mit korrelierenden histopathologischen, hämatologischen oder biochemischen Daten sowie mit Daten zu anderen Arten systemischer Toxizität ausgewertet werden. Die Untersuchungen, die bei dieser Methode zur Charakterisierung und Quantifizierung der neurotoxischen Wirkungen erforderlich sind, beinhalten spezifische histopathologische und verhaltensbezogene Verfahren, die durch elektrophysiologische und/oder biochemische Untersuchungen (1) (2) (3) (4) weiter unterstützt werden können.

Innerhalb des Nervensystems können neurotoxische Stoffe über eine Vielzahl von Mechanismen und auf eine Anzahl verschiedener Zielgewebe wirken. Da keine einzelne Versuchsreihe in der Lage ist, das neurotoxische Potenzial sämtlicher Substanzen umfassend zu testen, kann der Einsatz weiterer In-vivo- oder In-vitro-Tests erforderlich sein, die für den beobachteten oder erwarteten Typ einer Neurotoxizität spezifisch sind.

Diese Prüfmethode kann auch in Verbindung mit den Hinweisen im OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1) für die Entwicklung von Studien verwendet werden, welche die Dosis-Wirkungs-Quantifizierung näher charakterisieren oder ihre Empfindlichkeit erhöhen sollen, um eine Dosis ohne beobachtete schädliche Wirkungen (NOAEL) besser abschätzen oder bekannte oder vermutete Gefahren einer Chemikalie bestätigen zu können. Beispielsweise können Studien entwickelt werden, die zur Ermittlung und Beurteilung der neurotoxischen Mechanismen oder zur Ergänzung der aus der Anwendung grundlegender verhaltensbezogener und neuropathologischer Beobachtungsverfahren bereits gewonnenen Daten dienen. Derartige Studien sollen keine Daten replizieren, die bei der Anwendung der in dieser Methode empfohlenen Standardverfahren gewonnen würden, wenn entsprechende Daten bereits vorliegen und nicht als erforderlich für die Interpretation der Ergebnisse der Studie angesehen werden.

Diese Prüfung auf Neurotoxizität führt, sowohl für sich allein als auch in Kombination mit anderen Studien, zu Informationen,

— mit denen beurteilt werden kann, ob das Nervensystem durch die getestete Chemikalie dauerhaft oder reversibel geschädigt wird,

— die dazu beitragen können, die Veränderungen des Nervensystems zu charakterisieren, die mit der Exposition gegenüber der Chemikalie in Verbindung stehen, und die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen, und

▼B

— die helfen können, den Zusammenhang zwischen Dosis/Zeit und Dosis/Wirkung zu bestimmen, um eine Dosis ohne beobachtete schädliche Wirkungen (NOAEL) abzuschätzen (die dann für die Festlegung von Sicherheitskriterien für die betreffende Chemikalie genutzt werden kann).

Bei dieser Prüfmethode wird die Testsubstanz oral verabreicht. Andere Verabreichungswege (z. B. dermal oder inhalativ) können besser geeignet sein und eine Modifizierung der empfohlenen Verfahren erforderlich machen. Überlegungen zur Wahl des Verabreichungswegs sind vom menschlichen Expositionsprofil und von den verfügbaren toxikologischen oder kinetischen Informationen abhängig.

1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

**Schädliche Wirkung:** jede behandlungsbedingte Abweichung von den Basiswerten, welche die Fähigkeit eines Organismus herabsetzt, zu überleben, sich zu vermehren oder sich an die Umgebung anzupassen.

**Dosis**: verabreichte Menge der Testsubstanz; die Dosis wird als Gewicht (g, mg), als Gewicht der Testsubstanz, pro Gewichtseinheit des Versuchstiers (z. B. mg/kg) oder als konstante Konzentration in der Nahrung (ppm) angegeben.

**Dosierung**: ein genereller Begriff, der sich aus Dosis, Häufigkeit und Dauer der Verabreichung zusammensetzt.

**Neurotoxizität: s**chädliche Veränderung der Struktur oder Funktion des Nervensystems, die infolge der Exposition gegenüber einem chemischen, biologischen oder physikalischen Agens entsteht.

**Neurotoxisches Agens**: jedes chemische, biologische oder physikalische Agens, das neurologisch wirken kann.

**NOAEL**: ist die Abkürzung für „No-Observed-Adverse-Effect Level“ (Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung); entspricht der höchsten Dosis, bei der keine behandlungsbedingten schädigenden Wirkungen festgestellt werden.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Testchemikalie wird bei oralem Applikationsweg in einer Reihe von Dosierungen mehreren Gruppen von Labor-Nagetieren verabreicht. In der Regel ist eine wiederholte Gabe erforderlich, wobei der Dosierungszeitplan 28 Tage, 90 Tage (subchronisch) oder 1 Jahr und mehr (chronisch) abdecken kann. Das für diese Prüfmethode beschriebene Verfahren kann auch für eine Studie zur akuten Neurotoxizität angewandt werden. Durch die Tests an den Versuchstieren soll die Erkennung oder Charakterisierung von verhaltensbezogenen und/oder neurologischen Anomalien ermöglicht werden. In jedem Beobachtungszeitraum wird eine Reihe von Verhaltensmerkmalen beurteilt, die durch ein neurotoxisches Agens beeinträchtigt werden könnten. Am Ende des Versuchs wird aus jeder Gruppe eine Teilmenge von Tieren beiderlei Geschlechts in situ mittels Perfusion fixiert, und es werden Gewebeschnitte von Gehirn, Rückenmark und peripheren Nerven angefertigt und untersucht.

Wenn die Untersuchung als Einzelstudie durchgeführt wird, um eine Prüfung auf Neurotoxizität durchzuführen oder um neurotoxische Wirkungen zu charakterisieren, können die Tiere in jeder Gruppe, die nicht für eine Perfusionsfixation und anschließende Histopathologie verwendet werden (siehe Tabelle 1), für spezifische verhaltensbezogene, neuropathologische, neurochemische oder elektrophysiologische Verfahren eingesetzt werden, die als Ergänzung zu den Daten dienen können, die bei den für diese Methode erforderlichen Standarduntersuchungen gewonnen wurden (1). Diese ergänzenden Verfahren können dann besonders nützlich sein, wenn empirische Beobachtungen oder erwartete Wirkungen auf einen spezifischen Typ oder ein spezifisches Zielgewebe für die Neurotoxizität einer Chemikalie hindeuten. Alternativ können die verbleibenden Tiere für Auswertungen verwendet werden, wie sie bei Prüfmethoden an Nagetieren zur Prüfung der Toxizität bei wiederholter Verabreichung erforderlich sind.

▼B

Wenn die Verfahren dieser Prüfmethode mit denen anderer Prüfungen kombiniert werden, muss die Anzahl der Versuchstiere ausreichend groß sein, um die Anforderungen für die Untersuchungen beider Studien zu erfüllen,

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Auswahl der Tierspezies**

Die bevorzugte Nagetierspezies ist die Ratte, es können aber bei entsprechender Begründung auch andere Spezies verwendet werden. Es sind junge, gesunde, ausgewachsene Tiere üblicher Laborstämme zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder bereits geworfen haben noch trächtig sein. Die Verabreichung soll normalerweise so bald wie möglich nach der Entwöhnung beginnen, vorzugsweise spätestens im Alter von 6 Wochen, in jedem Fall aber vor dem Alter von 9 Wochen. Wenn diese Studie allerdings mit anderen Studien kombiniert wird, müssen diese Altersanforderungen eventuell angepasst werden. Zu Beginn der Studie sollen die Gewichtsunterschiede zwischen den Tieren ± 20 % des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts nicht überschreiten. Wenn eine kurzzeitige Studie mit wiederholter Verabreichung als Vorstudie für eine Langzeitstudie durchgeführt wird, sollen bei beiden Studien Tiere des gleichen Stamms und derselben Herkunft verwendet werden.

1.4.2. **Haltung und Fütterung**

Die Temperatur im Versuchstierraum soll 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit soll mindestens 30 % betragen und außer während der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen; anzustreben ist ein Wert von 50-60 %. Die Beleuchtung soll künstlich sein, und die Heil- und Dunkelphasen sollen sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. Kurzzeitige laute Geräusche sollen auf ein Minimum reduziert werden. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, wobei eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung zu gewährleisten ist. Die Auswahl des Futters wird eventuell dadurch beeinflusst, dass eine geeignete Beimischung der Testsubstanz sichergestellt werden muss, wenn die Testsubstanz auf diese Art verabreicht werden soll. Die Tiere können entweder einzeln oder in kleinen gleichgeschlechtlichen Gruppen in Käfigen untergebracht werden.

1.4.3. **Vorbereitung der Versuchstiere**

Für die Behandlungs- und Kontrollgruppen werden gesunde Jungtiere nach Zufallskriterien ausgewählt. Die Käfige sollen so angeordnet werden, dass etwaige Einflüsse der Käfigplatzierung minimiert werden. Die Tiere werden eindeutig gekennzeichnet und für eine Dauer von mindestens 5 Tagen vor Versuchsbeginn in ihren Käfigen gehalten, damit sie sich an die Laborbedingungen gewöhnen können.

1.4.4. **Verabreichungsweg und Vorbereitung der Testsubstanz**

Diese Prüfmethode behandelt ausdrücklich die orale Verabreichung der Testsubstanz. Die orale Verabreichung kann per Sondenfütterung („gavage“), im Futter, im Trinkwasser oder in Form von Kapseln erfolgen. Andere Verabreichungswege (z. B. dermal oder inhalativ) können ebenfalls verwendet werden, machen aber eventuell eine Modifizierung der empfohlenen Verfahren erforderlich. Die Wahl des Verabreichungswegs ist vom zu erwartenden menschlichen Expositionsprofil und von den verfügbaren toxikologischen oder kinetischen Informationen abhängig. Die Entscheidung für einen geeigneten Verabreichungsweg sowie entsprechende Änderungen der Verfahrensweisen bei dieser Prüfmethode sind zu begründen.

▼B

Im Bedarfsfall kann die Testsubstanz gelöst oder in einem geeigneten Vehikel suspendiert werden. Es wird empfohlen, zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension in Betracht zu ziehen, dann eine Lösung/Suspension in Öl (z. B. Maisöl) und erst an dritter Stelle eine Lösung/Suspension in einem anderen Vehikel. Die toxischen Eigenschaften des Vehikels müssen bekannt sein. Darüber hinaus sollen die folgenden Eigenschaften des Vehikels berücksichtigt werden: Wirkungen des Vehikels auf Absorption, Verteilung, Verstoffwechslung oder Retention der Testsubstanz, durch die sich ihre toxischen Eigenschaften ändern können, sowie Wirkungen auf den Futter- oder Trinkwasserverzehr oder den Ernähungszustand der Tiere.

1.5. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

1.5.1. **Anzahl und Geschlecht der Tiere**

Wenn die Untersuchung als Einzelstudie durchgeführt wird, sind mindestens 20 Tiere (10 weibliche und 10 männliche Tiere) in jeder Dosierungs- und Kontrollgruppe zur Auswertung der detaillierten klinischen und funktionsbezogenen Beobachtungen einzusetzen. Mindestens 5 männliche und 5 weibliche Tiere, die aus diesen 10 männlichen und 10 weiblichen Tieren ausgewählt wurden, sollen am Ende der Studie in situ mittels Perfusion fixiert und für eine ausführliche Neurohistopathologie verwendet werden. In Fällen, wo nur eine begrenzte Anzahl von Tieren in einer bestimmten Dosierungsgruppe Anzeichen für neurotoxische Wirkungen zeigt, sollte erwogen werden, diese Tiere gleichfalls in die Gruppe der für die Perfusionsfixation ausgewählten Tiere aufzunehmen. Wenn die Studie in Verbindung mit einer Prüfung auf Toxizität bei wiederholter Verabreichung durchgeführt wird, sollte die Anzahl der Versuchstiere groß genug sein, um die Zielvorgaben beider Studien erfüllen zu können. Die Mindestzahl der Tiere pro Gruppe ist in Tabelle 1 für verschiedene Kombinationen von Studien angegeben, Wenn zwischenzeitliche Tötungen oder Erholungsgruppen zur Beobachtung von Reversibilität, Persistenz oder verzögertem Auftreten von toxischen Wirkungen nach der Behandlung vorgesehen sind oder wenn ergänzende Untersuchungen erwogen werden, sollte die Anzahl der Versuchstiere erhöht werden, um zu gewährleisten, dass genügend Tiere zur Beobachtung und für die Histopathologie zur Verfügung stehen.

1.5.2. **Behandlungs- und Kontrollgruppe**

Es sollen mindestens drei Dosierungsgruppen und eine Kontrollgruppe eingesetzt werden; wenn aber angesichts der Beurteilung anderer Daten bei einer wiederholten Dosis von 1 000 mg pro kg Körpergewicht und Tag keine Wirkungen zu erwarten sind, kann ein Limit-Test durchgeführt werden. Wenn keine geeigneten Daten zur Verfügung stehen, kann als Hilfe zur Ermittlung der zu verwendenden Dosierungen eine Dosisfindungsstudie durchgeführt werden. Abgesehen von der Behandlung mit der Testsubstanz sollen die Tiere in der Kontrollgruppe unter identischen Bedingungen behandelt werden wie die Versuchstiere in der Testgruppe. Wenn bei der Verabreichung der Testsubstanz ein Vehikel verwendet wird, sollte die Kontrollgruppe die größte verwendete Volumenmenge des Vehikels erhalten.

1.5.3. **Überprüfung der Zuverlässigkeit**

Das Labor, das die Untersuchung durchführt, soll Daten vorlegen, die seine Befähigung zur Durchführung der Studie sowie die Empfindlichkeit der eingesetzten Verfahren belegen. Diese Daten sollen zeigen, dass Änderungen bei den verschiedenen für die Beobachtung empfohlenen Endpunkten erkannt und quantifiziert weiden können, z. B. autonome Anzeichen, sensorisches Reaktionsvermögen, Greifkraft der Extremitäten und motorische Aktivität. Informationen zu Chemikalien, die neurotoxische Reaktionen verschiedener Art auslösen und als positive Kontrollsubstanzen eingesetzt werden können, sind den Quellen (2) bis (9) zu entnehmen. Historische Kontrolldaten können verwendet werden, wenn die wesentlichen Aspekte der Versuchsabläufe gleich bleiben. Eine regelmäßige Aktualisierung der historischen Kontrolldaten wird empfohlen. Wenn ein wesentliches Element der Versuchsdurchführung oder der Verfahrensweisen durch das ausführende Labor verändert wurde, sollen neue Daten erarbeitet werden, welche die unveränderte Empfindlichkeit der Verfahren belegen.

▼B

1.5.4. **Wahl der Dosierungen**

Bei der Wahl der Dosierungen sollen zuvor ermittelte toxikologische und kinetische Daten berücksichtigt werden, die für die zu testende Verbindung oder verwandte Materialien zur Verfügung stehen, Die höchste Dosis solle mit dem Ziel gewählt werden, neurotoxische Wirkungen oder deutliche systemische toxische Wirkungen auszulösen. Anschließend soll eine absteigende Folge von Dosierungsstufen ausgewählt werden, um dosisabhängige Wirkungen und die niedrigste Dosis ohne zu beobachtende schädliche Wirkungen (NOAEL) zu bestimmen. Grundsätzlich sollen die Dosierungen so gewählt werden, dass primäre toxische Wirkungen auf das Nervensystem von Wirkungen in Zusammenhang mit systemischer Toxizität unterschieden werden können. Häufig sind zwei bis drei Intervalle das Optimum, und die Ergänzung durch eine vierte Testgruppe ist häufig der Anwendung sehr langer Intervalle (d. h. größer als Faktor 10) zwischen den Verabreichungen vorzuziehen. Sofern eine realistische Expositionsabschätzung für Menschen vorhanden ist, soll diese ebenfalls berücksichtigt weiden.

1.5.5. **Limit-Test**

Wenn bei einer Untersuchung mit einer Dosierung von mindestens 1 000 mg pro kg Körpergewicht und Tag bei Anwendung der beschriebenen Verfahren keine neurotoxischen Wirkungen festzustellen und aufgrund der Daten für strukturverwandte Verbindungen keine toxischen Wirkungen zu erwarten sind, ist eine vollständige Untersuchung mit drei Dosierungen eventuell nicht erforderlich. Je nach der für Menschen zu erwartenden Exposition kann die Verwendung einer höheren oralen Dosierung beim Limit-Test notwendig sein. Bei anderen Verabreichungsformen, z. B. Inhalation oder dermale Applikation, wird der maximal erzielbare Expositionsgrad in vielen Fällen durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Testsubstanz bestimmt. Bei der Durchführung einer Studie zur akuten oralen Toxizität soll die Dosis für einen Limit-Test mindestens 2 000 mg/kg betragen,

1.5.6. **Verabreichung der Dosen**

Die Testsubstanz wird den Tieren mindestens 28 Tage lang, sieben Tage pro Woche, täglich verabreicht. Wenn eine Verabreichung an nur fünf Tagen pro Woche oder eine kürzere Expositionsdauer gewählt wird, muss dies begründet werden. Wenn die Testsubstanz per Sondenfütterung verabreicht wird, soll dies in Form einer Einzeldosis über einen Magenschlauch oder eine geeignete Intubationskanüle erfolgen. Welches Flüssigkeitsvolumen jeweils höchstens auf einmal verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen soll 1 ml pro 100 g Körpergewicht nicht überschreiten. Bei wässrigen Lösungen kann jedoch auch die Verwendung von bis zu 2 ml pro 100 g Körpergewicht in Betracht gezogen werden. Außer bei reizenden oder ätzenden Stoffen, die bei höheren Konzentration normalerweise heftigere Wirkungen hervorrufen, sollen Veränderungen des Testvolumens durch Anpassung der Konzentration so minimiert werden, dass bei allen Dosierungen ein gleich bleibendes Volumen gewährleistet ist.

Bei Substanzen, die im Futter oder Trinkwasser verabreicht werden, ist es wichtig, sicherzustellen, dass die eingesetzte Menge der Testsubstanz die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigt. Wenn die Testsubstanz im Futter verabreicht wird, kann entweder eine konstante Konzentration im Futter (ppm) oder eine konstante Dosis, bezogen auf das Körpergewicht des Tieres, verwendet werden; die jeweils gewählte Verfahrensweise muss angegeben werden. Bei Verabreichung der Prüfsubstanz durch Sondenfütterung soll die Dosis jeden Tag zu ähnlichen Zeiten gegeben und nach Bedarf angepasst werden, um, bezogen auf das Körpergewicht der Tiere, eine konstante Dosierung einzuhalten, Wenn eine Prüfung mit wiederholter Verabreichung als Vorbereitung zu einer Langzeituntersuchung durchgeführt wird, soll bei beiden Studien ein ähnliches Futter verwendet werden. Bei Studien zur akuten Toxizität kann die Dosis, sofern die Verabreichung als Einzeldosis nicht möglich ist, über einen Zeitraum von maximal 24 Stunden in kleineren Teilmengen verabreicht werden,

▼B

1.6. BEOBACHTUNGEN

1.6.1. **Häufigkeit der Beobachtungen und Untersuchungen**

Bei Prüfungen mit wiederholter Verabreichung soll der Beobachtungszeitraum den gesamten Verabreichungszeitraum abdecken. Bei Studien zur akuten Toxizität soll ein Zeitraum von 14 Tagen nach der Behandlung beobachtet werden. Bei Tieren in Satelittengruppen, die wahrend eines auf die Behandlung folgenden Zeitraums ohne Exposition gehalten werden, sollen die Beobachtungen diesen Zeitraum ebenfalls abdecken.

Die Beobachtungen sollen ausreichend häufig erfolgen, damit verhaltensbezogene und/oder neurologische Anomalien mit möglichst großer Wahrscheinlichkeit erkannt werden. Die Beobachtungen sollen vorzugsweise jeden Tag zur gleichen Uhrzeit erfolgen, wobei die Zeit der nach der Verabreichung erwarteten maximalen Wirkungen zu berücksichtigen ist. Die Häufigkeit der klinischen Beobachtungen und Funktionstests ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Wenn kinetische oder andere Daten, die aus einer früheren Studie gewonnen wurden, es notwendig erscheinen lassen, abweichende Beobachtungs- oder Testzeitpunkte oder andere Zeiträume nach der Beobachtung zu verwenden, sollte ein alternativer Zeitplan verwendet werden, um möglichst viele Informationen gewinnen zu können. Änderungen des Zeitplans sollen begründet werden.

1.6.1.1. *Beobachtungen zum allgemeinen Gesundheitszustand und zur Mortalität/Morbidität*

Alle Versuchstiere sollen mindestens einmal täglich gründlich auf ihren Gesundheitszustand sowie mindestens zweimal täglich auf Morbidität und Mortalität untersucht werden.

1.6.1.2. *Detaillierte klinische Beobachtungen*

Detaillierte klinische Beobachtungen sollen an allen für diesen Zweck ausgewählten Tieren durchgeführt werden (siehe Tabelle 1), und zwar einmal vor der ersten Exposition (um Vergleiche zwischen den Versuchstieren zu ermöglichen) sowie anschließend je nach Dauer der Untersuchung in unterschiedlichen Intervallen (siehe Tabelle 2). Am Ende des Erholungszeitraums sollen detaillierte klinische Beobachtungen an den Satellitengruppen vorgenommen werden. Die detaillierten klinischen Beobachtungen sollen außerhalb des Unterbringungskäfigs in einer üblichen Untersuchungsumgebung erfolgen. Diese Beobachtungen sollen anhand von Bewertungssystemen sorgfältig registriert werden, die Kriterien oder Bewertungsskalen für jede bei den Beobachtungen vorgenommene Messung enthalten. Die verwendeten Kriterien oder Skalen sollen vom Versuchslabor explizit festgelegt werden. Es soll versucht werden, dafür zu sorgen, dass Abweichungen der Versuchsbedingungen minimal sind (und nicht systematisch mit der Behandlung in Verbindung stehen) und dass die Beobachtungen von geschulten Beobachtern durchgeführt werden, denen die Behandlung des gegenwärtig beobachteten Tieres nicht bekannt ist.

Es wird empfohlen, die Beobachtungen in einer strukturierten Form durchzuführen, wobei auf jedes Versuchstier zu jedem Beobachtungszeitpunkt genau definierte Kriterien (einschließlich der Definition des „Normalbereichs“) auf systematische Weise angewandt werden. Der „Normalbereich“ soll auf geeignete Weise dokumentiert werden. Alle beobachteten Anzeichen sollen registriert werden. Wann immer möglich, sollte auch die Größenordnung der beobachteten Anzeichen registriert werden. Die klinischen Beobachtungen sollen mindestens, aber nicht ausschließlich Veränderungen an Haut, Fell, Augen und Schleimhäuten sowie das Auftreten von Sekreten, Ausscheidungen und autonomen Aktivitäten umfassen (z. B. Tränenfluss, Haaraufrichtung, Pupillengröβe, ungewöhnliche Atemmuster und/oder Mundatmung, ungewöhnliche Anzeichen von Urin- oder Kotabsonderung sowie Urin mit Farbabweichungen).

▼B

Ungewöhnliche Reaktionen hinsichtlich Körperhaltung, Aktivitätsgrad (z. B. verminderte oder verstärkte Erkundung der üblichen Untersuchungsumgebung) sowie Bewegungskoordination sollen ebenfalls vermerkt werden. Veränderungen des Gangs (z. B. watschelnder Gang, Ataxie), der Haltung (z. B. Buckelhaltung) und des Reaktionsverhaltens beim Aufnehmen oder Umsetzen des Versuchstiers oder anderen Umgebungsstimuli sowie Auftreten von klonischen oder tonischen Bewegungen, Krämpfen oder Tremors, Stereotypien (z. B. übermäßige Fellpflege, ungewöhnliche Kopfbewegungen, repetitives Laufen im Kreis) oder auffälliges Verhalten (z. B. Beißen oder übermäßiges Lecken, Selbstverstümmelung, Rückwärtslaufen, Lautäußerungen) oder Aggressionen sollen registriert werden.

1.6.1.3. *Funktionstests*

Ähnlich wie die detaillierten klinischen Beobachtungen sollen auch die Funktionstests bei allen für diesen Zweck ausgewählten Versuchstieren einmal vor der ersten Exposition und mehrmals danach durchgeführt werden (siehe Tabelle 1). Die Häufigkeit der Funktionstests ist ebenfalls von der Dauer der Studie abhängig (siehe Tabelle 2). Zusätzlich zu den in Tabelle 2 genannten Beobachtungszeiträumen sollen auch funktionsbezogene Beobachtungen an weiteren Erholungsgruppen so nahe wie möglich am Zeitpunkt der endgültigen Tötung erfolgen. Funktionstests sollen die sensorische Reaktionsfähigkeit auf Stimuli verschiedener Art (z. B. akustische, visuelle und propriozeptive Stimuli (5) (6) (7)) berücksichtigen und die Beurteilung der Greifkraft der Extremitäten (8) sowie die Beurteilung der motorischen Aktivität (9) beinhalten. Die motorische Aktivität soll mit Hilfe eines automatischen Geräts gemessen werden, mit dem sowohl eine Abnahme als auch eine Zunahme der Aktivität festgestellt werden kann. Wenn ein anderes definiertes System eingesetzt wird, sollte es quantitativ ausgerichtet sein; Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit des Systems sollen nachgewiesen werden. Jedes Gerät soll getestet. werden, um die Langzeit-Zuverlässigkeit und die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Geräte sicherzustellen. Weitere Informationen zu den anwendbaren Verfahren sind den jeweiligen Literaturhinweisen zu entnehmen. Wenn keine Daten (z. B. Strukturaktivität, epidemiologische Daten, weitere toxikologische Studien) vorhanden sind, die auf potenzielle neurotoxische Wirkungen hindeuten, soll die Einbeziehung speziellerer Tests der sensorischen und motorischen Funktionen sowie der Lern- und Gedächtnisfähigkeit in Betracht gezogen werden, um diese möglichen Wirkungen gründlicher zu untersuchen. Weitere Informationen über speziellere Tests und ihre Anwendung sind (1) zu entnehmen.

Im Ausnahmefall können Tiere, die Anzeichen für Toxizität in einem Maß aufweisen, das die Funktionstests deutlich beeinträchtigen würde, von dem betreffenden Test ausgeschlossen werden. Wenn einzelne Tiere von einem Funktionstest ausgeschlossen wurden, sollte hierfür eine Begründung angegeben werden.

1.6.2. **Körpergewicht und Futter-/Trinkwasserverbrauch**

Bei Prüfungen mit einer Dauer von bis zu 90 Tagen sollen alle Tiere mindestens einmal wöchentlich gewogen werden, und es sollen mindestens in wöchentlichem Abstand Messungen des Futterverbrauchs (sowie des Wasserverbrauchs, wenn die Testsubstanz auf diesem Wege verabreicht wird) durchgeführt werden. Bei Langzeitstudien sollen alle Tiere während der ersten 13 Wochen mindestens einmal wöchentlich sowie anschließend mindestens einmal alle 4 Wochen gewogen werden. Messungen des Futterverbrauchs (sowie des Wasserverbrauchs, wenn die Testsubstanz auf diesem Wege verabreicht wird) sollen während der ersten 13 Wochen mindestens einmal sowie anschließend in etwa dreimonatigem Abstand durchgeführt werden, sofern der Gesundheitszustand oder Veränderungen des Körpergewichts nicht ein anderes Vorgehen erforderlich machen.

▼B

1.6.3. **Ophthalmologie**

Bei Prüfungen mit einer Dauer von über 28 Tagen soll vor der Verabreichung der Testsubstanz und am Ende der Studie eine ophthalmologische Untersuchung mit einem Ophthalmoskop oder einem vergleichbaren Instrument durchgeführt werden; die Untersuchung soll vorzugsweise bei allen Versuchstieren, zumindest aber bei den Tieren in der Gruppe mit hoher Dosierung und in der Kontrollgruppe vorgenommen werden. Wenn Veränderungen an den Augen festgestellt werden oder wenn klinische Anzeichen dies erforderlich erscheinen lassen, sollen alle Tiere untersucht werden. Bei Langzeitstudien soll außerdem nach 13 Wochen eine ophthalmologische Untersuchung durchgeführt werden. Ophthalmologische Untersuchungen sind nicht erforderlich, wenn diese Daten bereits aus anderen Studien mit ähnlicher Dauer und ähnlichen Dosierungen zur Verfügung stehen.

1.6.4. **Hämatologie und klinische Biochemie**

Wenn die Prüfung auf Neurotoxizität in Verbindung mit einer Studie zur systemischen Toxizität bei wiederholter Verabreichung durchgeführt wird, sollen hämatologische Untersuchungen und klinische biochemische Untersuchungen durchgeführt werden, wie in der entsprechenden Methode für die Prüfung auf systemische Toxizität beschrieben. Die Werte sollen so erfasst werden, dass potenzielle verhaltensbezogene Wirkungen minimiert werden.

1.6.5. **Histopathologie**

Die neuropathologische Untersuchung soll darauf abzielen, die während der In-vivo-Phase der Studie gemachten Beobachtungen zu ergänzen und zu erweitern. Gewebeproben von mindestens 5 Tieren pro Geschlecht und Gruppe (siehe Tabelle 1 und nächsten Abschnitt) sollen mit Hilfe allgemein anerkannter Perfusions- und Fixierungsverfahren in situ perfundiert und fixiert werden (siehe (3), Kapitel 5, und (4), Kapitel 50). Alle erkennbaren makroskopischen Veränderungen sollen registriert werden. Wenn die Studie als Einzeltest auf Neurotoxizität oder zur Charakterisierung von neurotoxischen Wirkungen durchgeführt wird, können die restlichen Tiere entweder für spezifische verhaltensbezogene (10) (11), neuropathologische (10) (11) (12) (13), neurochemische (10) (11) (14) (15) oder elektrophysiologische (10) (11) (16) (17) Untersuchungen verwendet werden, die eine Ergänzung zu den hier beschriebenen Verfahren und Untersuchungen bilden, oder für histopathologische Untersuchungen eingesetzt werden, um die Anzahl der Versuchstiere zu vergrößern. Diese ergänzenden Untersuchungen sind dann besonders sinnvoll, wenn empirische Beobachtungen oder erwartete Wirkungen auf einen bestimmten Typ oder ein bestimmtes Zielgewebe für die Neurotoxizität einer Chemikalie hindeuten (2) (3). Alternativ können die verbleibenden Tiere auch für pathologische Routineauswertungen verwendet werden, wie bei der Methode für Studien mit wiederholter Verabreichung beschrieben.

Bei allen in Paraffin eingebetteten Gewebeproben soll ein übliches Färbeverfahren, z. B. Hämatoxylin und Eosin (H&E), angewandt und eine mikroskopische Untersuchung durchgeführt werden. Wenn Anzeichen einer peripheren Neuropathie beobachtet oder vermutet werden, sollen an Kunststoff eingebettete Proben des peripheren Nervengewebes untersucht werden. Klinische Anzeichen können auch auf weitere zu untersuchende Bereiche hinweisen oder die Anwendung von speziellen Färbeverfahren nahelegen. Hinweise zu weiteren zu untersuchenden Bereichen finden sich in (3) (4). Geeignete Spezial-Färbeverfahren zur Sichtbarmachung bestimmter pathologischer Veränderungen können ebenfalls nützlich sein (18).

▼B

Repräsentative Gewebeschnitte aus dem zentralen und peripheren Nervensystem sollen histologisch untersucht werden (siehe (3), Kapitel 5, und (4), Kapitel 50). Dabei sollen normalerweise die folgenden Bereiche untersucht werden: Vorderhirn, Mitte des Großhirns einschließlich eines Anschnitts durch den Hippokampus, Mittelhirn, Kleinhirn, Brücke, verlängertes Mark, Auge mit Sehnerv und Netzhaut, Rückenmark an den zervikalen und lumbalen Verdickungen, dorsale Wurzelganglien, dorsale und ventrale Nervenwurzelfasern, proximaler Ischiasnerv, proximaler Schienbeinnerv (am Knie) und Wadenmuskel-Äste des Schienbeinnervs. Die Gewebeschnitte durch Rückenmark und peripheres Nervengewebe sollen sowohl Quer- als auch Längsschnitte umfassen. Auf die Gefäßversorgung des Nervensystems soll geachtet werden. Es soll auch eine Probe eines Skelettmuskels, insbesondere eines Wadenmuskels, untersucht werden. Bereiche mit Zell- und Faserstruktur und -muster im ZNS und PNS, bei denen eine besondere Anfälligkeit für neurotoxische Stoffe bekannt ist, sollen besonders beachtet werden.

Anmerkungen zu neuropathologischen Veränderungen, die typischerweise durch Exposition gegenüber neurotoxischen Stoffen entstehen, sind den Quellen (3) (4) zu entnehmen. Es wird eine schrittweise Untersuchung der Gewebeproben empfohlen, wobei zunächst Gewebeschnitte aus der Gruppe mit hoher Dosis mit denen der Kontrollgruppe verglichen werden. Wenn bei den Proben aus diesen Gruppen keine neuropathologischen Veränderungen festgestellt werden, ist eine anschließende Analyse nicht erforderlich. Wenn bei der Gruppe mit hoher Dosis neuropathologische Veränderungen beobachtet werden, soll anschließend eine Probe von jedem der potenziell betroffenen Gewebebereiche aus der Gruppe mit mittlerer und niedriger Dosis kodiert und nacheinander untersucht werden.

Wenn sich bei der qualitativen Untersuchung ein Hinweis auf neuropathologische Veränderungen ergibt, sollte in allen Bereichen des Nervensystems, die diese Veränderungen zeigen, eine zweite Untersuchung durchgeführt werden, Gewebeschnitte aus allen Dosierungsgruppen und aus jeder der potenziell betroffenen Regionen sollen kodiert und ohne Kenntnis des Kodes nach Zufallskriterien untersucht werden. Die Häufigkeit und der Schweregrad jedes Befunds sollen registriert werden. Nachdem in allen Dosierungsgruppen sämtliche Regionen bewertet wurden, kann die Kodierung aufgehoben und eine statistische Analyse durchgeführt werden, um die Dosis-Wirkungs-Beziehungen auszuwerten. Beispiele für die unterschiedlichen Schweregrade der einzelnen Befunde sollen beschrieben werden.

Die neuropathologischen Ergebnisse sollen in Zusammenhang mit verhaltensbezogenen Beobachtungen und Messungen sowie mit anderen Daten ausgewertet werden, die aus vorausgegangenen und gleichzeitig durchgeführten Studien zur systemischen Toxizität der Testsubstanz stammen.

## 2. DATEN

### 2.1. BEHANDLUNG DER ERGEBNISSE

Es sollen Einzeldaten zur Verfügung gestellt werden. Darüber hinaus sollen sämtliche Daten in Form einer Tabelle zusammengefasst werden, die für jede Test- oder Kontrollgruppe die folgenden Informationen enthält: die Anzahl der Tiere zu Beginn des Tests, die Anzahl der Tiere, deren Tod während des Tests festgestellt wurde oder die aus Gründen des Tierschutzes getötet wurden, sowie der jeweilige Todes- oder Tötungszeitpunkt, die Anzahl der Tiere mit Anzeichen einer toxischen Wirkung, eine Beschreibung der beobachteten Toxizitätszeichen einschließlich des Zeitpunkts des Einsetzens, der Dauer und des Schweregrads etwaiger toxischer Wirkungen, die Anzahl der Tiere, die pathologische Befunde aufweisen, einschließlich der Art und des Schweregrads.

▼B

2.2. AUSWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Studie sollen hinsichtlich Häufigkeit, Schweregrad und Wechselbeziehung der verhaltensbezogenen und neuropathologischen Wirkungen (auch der neurochemischen oder elektrophysiologischen Wirkungen, sofern ergänzende Untersuchungen ebenfalls durchgeführt wurden) sowie im Hinblick auf sonstige beobachtete schädliche Wirkungen ausgewertet werden. Wenn möglich, sollen die numerischen Ergebnisse mittels einer geeigneten und allgemein anerkannten statistischen Methode ausgewertet werden. Die statistische Methode soll in der Entwurfsphase der Studie ausgewählt werden.

3. **BERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

Testsubstanz:

— physikalische Beschaffenheit (einschließlich Isomerie, Reinheit und physikalisch-chemischen Eigenschaften);

— Identifizierungsdaten.

Vehikel (wenn verwendet):

— Begründung für die Wahl des Vehikels.

Versuchstiere:

— verwendete Spezies/Stamm;

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

— Herkunft/Züchter der Tiere, Haltungsbedingungen, Eingewöhnung, Futter usw.;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn.

Testbedingungen:

— Angaben über die Zubereitung der Testsubstanz/-Futterzubereitung, erzielte Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung;

— Angabe zu den verabreichten Dosen, einschließlich Angaben über Vehikel, Volumen und physikalische Form des verabreichten Materials;

— Angaben über die Verabreichung der Testsubstanz;

— Begründung für die gewählten Dosierungen;

— Begründung für den gewählten Applikationsweg und die Dauer der Exposition;

— Umrechnung von der Konzentration der Testsubstanz im Futter/-Trinkwasser (ppm) auf die tatsächliche Dosis (mg pro kg Körpergewicht und Tag), wenn maßgeblich;

— Angaben über die Futter- und Trinkwasserqualität.

Beobachtungen- und Testverfahren:

— Angaben über die Zuordnung der Tiere in den einzelnen Gruppen zu den Untergruppen für die Perfusionsfixation;

— Angaben über die Bewertungssysteme, einschließlich der Kriterien und Bewertungsskalen für jede Messung im Rahmen der detaillierten klinischen Beobachtungen;

▼B

— Angaben zu den Funktionstests für die sensorische Reaktionsfähigkeit auf Stimuli verschiedener Art (z. B. akustisch, visuell und propriozeptiv), für die Beurteilung der Greifkraft der Extremitäten, für die Beurteilung der motorischen Aktivität (einschließlich Angaben über automatische Geräte zur Aktivitätserkennung) sowie Angaben zu anderen eingesetzten Verfahren;

— Angaben zu ophthalmologischen Untersuchungen und gegebenenfalls hämatologischen Untersuchungen und klinischen biochemischen Tests mit den entsprechenden Nominalwerten;

— Angaben zu den einzelnen verhaltensbezogenen, neuropathologischen, neurochemischen oder elektrophysiologischen Untersuchungen.

Ergebnisse:

— Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts einschließlich Körpergewicht zum Zeitpunkt der Tötung;

— Futterverbrauch und Trinkwasserverbrauch, wenn maßgeblich;

— Daten zur toxischen Wirkung nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Anzeichen für Toxizität oder Mortalität;

— Art, Schweregrad und Dauer (Zeitpunkt des Einsetzens und weiterer Verlauf) der detaillierten klinischen Beobachtungen (reversibel oder irreversibel);

— detaillierte Beschreibung sämtlicher Ergebnisse der Funktionstests;

— Sektionsbefunde;

— ausführliche Beschreibung sämtlicher verhaltensbezogenen, neuropathologischen und neurochemischen oder neurophysiologischen Ergebnisse, sofern verfügbar;

— Angaben zur Resorption und Metabolismus, sofern verfügbar;

— statistische Auswertung der Ergebnisse, wenn möglich.

Diskussion der Ergebnisse:

— Dosis-Wirkungs-Informationen;

— Zusammenhang zwischen anderen toxischen Wirkungen und einer Schlussfolgerung bezüglich des neurotoxischen Potenzials der Testchemikalie;

— Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkungen (NOAEL).

Schlussfolgerungen:

— Eine konkrete Aussage über die Gesamt-Neurotoxizität der Testchemikalie ist wünschenswert.

4. **LITERATUR**

(1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, in Vorbereitung.

(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, in Vorbereitung.

(3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure *to* Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980) Experimental and Clinical Neurotoxicology, Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds, Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

(5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691704.

(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

(9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., GUI, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlabotatory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments, Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll, Toxicol., *U),* 689-695.

(13) Moser, V.C, Anthony, D.C., Sette, W.R and MacPhail, R.C, (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2- Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.

(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurorypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.

(17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neuroloxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, 726- 742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

*Tabelle 1*

**Benötigte Mindestanzahl der Tiere pro Gruppe, abhängig davon, ob die Prüfung auf Neurotoxizität als Einzelstudie oder in Verbindung mit anderen Studien durchgeführt wird**

| | DURCHFÜHRUNG DER PRÜFUNG AUF NEUROTOXIZITÄT ALS: | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Einzelstudie | Kombinierte Prüfung in Verbindung mit 28-Tage-Studie | Kombinierte Prüfung in Verbindung mit 90-Tage-Studie | Kombinierte Prüfung in Verbindung mit Studie zur chronischen Toxizität |
| Gesamtzahl der Tiere pro Gruppe | 10 männliche und 10 weibliche Tiere | 10 männliche und 10 weibliche Tiere | 15 männliche und 15 weibliche Tiere | 25 männliche und 25 weibliche Tiere |
| Anzahl der für Funktionstests einschließlich detaillierter klinischer Beobachtungen ausgewählten Tiere | 10 männliche und 10 weibliche Tiere | 10 männliche und 10 weibliche Tiere | 10 männliche und 10 weibliche Tiere | 10 männliche und 10 weibliche Tiere |
| Anzahl der für In-situ-Perfusionsfixation und Neurohistopathologie ausgewählten Tiere | 5 männliche und 5 weibliche Tiere | 5 männliche und 5 weibliche Tiere | 5 männliche und 5 weibliche Tiere | 5 männliche und 5 weibliche Tiere |
| Anzahl der für die Beobachtungen (Toxizität bei wiederholter Verabreichung/subchronische Toxizität/chronische Toxizität, Hämatologie, klinische Biochemie, Histopathologie usw.) ausgewählten Tiere, wie in den entsprechenden Prüfrichtlinien *(Guidelines)* angegeben | | 5 männliche und 5 weibliche Tiere | 10 männliche (†) und 10 weibliche Tiere (†) | 20 männliche (†) und 20 weibliche Tiere - (†) |
| Ergänzende Beobachtungen nach Bedarf | 5 männliche und 5 weibliche Tiere | | | |

(†) Einschließlich 5 Tiere, die für Funktionstests und detaillierte klinische Beobachtungen im Rahmen der Neurotoxizitätsstudie ausgewählt werden.

▼B

*Tabelle 2*

**Häufigkeit der klinischen Beobachtungen und Funktionstests**

| Art der Beobachtung | | Dauer der Studie | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Akut | 28 Tage | 90 Tage | Chronisch |
| Bei allen Tieren | Allgemeiner Gesundheitszustand | Täglich | Täglich | Täglich | Täglich |
| | Mortalität/Morbidität | Zweimal täglich | Zweimal täglich | Zweimal täglich | Zweimal täglich |
| Bei den für Funktionsbeobachtungen ausgewählten Tieren | Detaillierte klinische Beobachtungen | — vor der ersten Exposition<br>— binnen 8 Stunden nach Verabreichung zum Zeitpunkt der erwarteten maximalen Wirkung<br>— am 7 und 14. Tag nach Verabreichung | — vor der ersten Exposition<br>— anschließend einmal wöchentlich | — vor der ersten Exposition<br>— einmal während der ersten oder zweiten Expositionswoche<br>— anschließend monatlich | — vor der ersten Exposition<br>— einmal am Ende des ersten Expositionsmonats<br>— anschließend alle drei Monate |
| | Funktionstests | — vor der ersten Exposition<br>— binnen 8 Stunden nach Verabreichung zum Zeitpunkt der erwarteten maximalen Wirkung<br>— am 7. und 14. Tag nach Verabreichung | — vor der ersten Exposition<br>— während der vierten Behandlungswoche möglichst nahe am Ende des Expositionszeitraums | — vor der ersten Exposition<br>— einmal während der ersten oder zweiten Expositionswoche<br>— anschließend monatlich | — vor der ersten Exposition<br>— einmal am Ende des ersten Expositionsmonats<br>— anschließend alle drei Monate |

▼B

B.44. **HAUTRESORPTION: IN-VIVO-METHODE**

1. **METHODE**

Diese Testmethode entspricht OECD TG 427 (2004).

1.1. EINLEITUNG

Die meisten Chemikalien wirken über die Haut auf den Körper ein, während bei den meisten an Labortieren durchgeführten toxikologischen Studien die Chemikalie oral verabreicht wird. Die in dieser Richtlinie beschriebene Untersuchung der perkutanen In-vivo-Resorption stellt die Verbindung her, die bei der Sicherheitsbewertung im Anschluss an dermale Exposition für die Extrapolation der Ergebnisse oraler Studien notwendig ist.

Eine Substanz muss eine große Zahl von Hautschichten durchdringen, bevor sie in den Kreislauf gelangen kann. Bei den meisten Substanzen wird die Penetrationsgeschwindigkeit durch die aus toten Zellen bestehende Hornhaut *(Stratum Corneum)* bestimmt. Die Permeabilität der Haut wird sowohl von der Lipophilie der Chemikalie als auch von der Dicke der äußeren Epidermisschicht sowie durch Faktoren wie dem Molgewicht und der Stoffkonzentration bestimmt. Im Allgemeinen ist die Haut von Ratten und Hasen permeabler als die menschliche Haut, während die Permeabilität der Haut von Meerschweinchen und Affen der Permeabilität der menschlichen Haut ähnelt.

Die Methoden zur Messung der perkutanen Resorption lassen sich in zwei Kategorien einteilen: in vivo und in vitro. Die In-vivo-Methode liefert bei unterschiedlichen Labortierarten gute Informationen zur Hautresorption. In jüngerer Zeit wurden ergänzend In-vitro-Methoden entwickelt. Bei diesen wird der Transport durch die menschliche oder tierische Haut in ihrer vollständigen oder teilweisen Dicke in einem Flüssigkeitsbehälter untersucht. Die In-vitro-Methode wird in einer separaten Testverfahrensbeschreibung (1) beschrieben. Es wird empfohlen, das OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2) als Hilfe bei der Wahl der für den jeweiligen Fall geeignetsten Methode zu Rate zu ziehen; dieses Dokument enthält nähere Angaben zur Eignung der In-vivo- und In-vitro-Methoden.

Die hier beschriebene In-vivo-Methode ermöglicht die Bestimmung der Penetration der Testsubstanz durch die Haut in den Kreislauf. Dieses Verfahren findet seit Jahren weithin Anwendung (3) (4) (5) (6) (7). Zwar sind In-vitro-Studien zur perkutanen Resorption in zahlreichen Fällen geeignet, doch können die benötigten Daten in bestimmten Fällen nur durch In-vivo-Studien gewonnen werden.

Die Vorteile der In-vivo-Methode bestehen darin, dass dabei ein physiologisch und metabolisch intaktes System und eine zahlreichen Toxizitätsstudien gemeinsame Tierart verwendet wird und dass diese Methode für die Verwendung mit anderen Arten modifiziert werden kann. Nachteile sind die Verwendung lebender Tiere und die Notwendigkeit, radioaktiv markiertes Material einzusetzen, damit zuverlässige Ergebnisse gewährleistet sind, ferner Schwierigkeiten bei der Bestimmung der Frühresorptionsphase und die unterschiedliche Permeabilität der Haut der bevorzugt verwendeten Art (Ratten) und der menschlichen Haut. Tierische Haut ist im Allgemeinen durchlässiger, d. h., die perkutane Resorption der menschlichen Haut könnte demzufolge überschätzt werden (6) (8) (9). Ätzende Materialien sollten an lebenden Tieren nicht getestet werden.

▼B

1.2. DEFINITIONEN

**Unresorbierte Dosis:** Dies entspricht der nach der Exposition von der Hautoberfläche abgewaschenen Dosis sowie der ggf. in der nicht okkludierten Abdeckung enthaltenen Dosis, einschließlich etwaiger Dosen, bei denen nachgewiesen wird, dass sie sich während der Exposition auf der Haut verflüchtigen.

**Resorbierte Dosis** (in vivo): Diese umfasst die im Urin, in Käfigreinigungsrückständen, Fäzes, ausgeatmeter Luft (soweit diese gemessen wird), im Blut, Gewebe (sofern erfasst) und dem übrigen Körper verbliebene Dosis nach Entfernung der Haut an der Stelle, an der die Substanz aufgetragen wurde.

**Resorbierbare Dosis:** Diese stellt die nach dem Waschen auf oder in der Haut vorhandene Dosis dar.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Testsubstanz wird — möglichst in radioaktiv markierter Form — in einer oder mehreren geeigneten Dosierungen als repräsentative praktische Präparation auf der geschorenen Haut der Tiere aufgebracht. Die Testpräparation bleibt während einer bestimmten Zeitdauer unter einer geeigneten (nicht okklusiven, semi-okklusiven oder okklusiven) Abdeckung mit der Haut in Kontakt. Am Ende des Expositionszeit wird die Abdeckung entfernt und die Haut mit einem geeigneten Reinigungsmittel gereinigt; Abdeckung und Reinigungsmittel werden zur Analyse aufbewahrt, und es wird eine frische Abdeckung angebracht. Die Tiere werden vor, während und nach der Expositionszeit in Stoffwechsel-Einzelkäfigen untergebracht, und die während dieses Zeitraums anfallenden Exkremente und die ausgeatmete Luft werden zu Analysezwecken gesammelt. Die Sammlung der ausgeatmeten Luft kann entfallen, wenn ausreichende Angaben darüber vorliegen, dass nur wenig oder gar keine flüchtigen radioaktiven Stoffwechselprodukte gebildet werden. Im Rahmen der Studien werden normalerweise mehrere Tiergruppen der Testpräparation ausgesetzt. Eine Gruppe wird am Ende der Expositionszeit getötet. Andere Gruppen werden zu festgelegten späteren Zeitpunkten getötet (2). Am Ende der Probenahmephase werden die verbleibenden Tiere getötet, Blut zu Analysezwecken entnommen, die Auftragsstelle zur Analyse entnommen und der Körper auf etwaige nicht ausgeschiedene Stoffe untersucht. Die Stichproben werden durch entsprechende Mittel untersucht und der Grad der perkutanen Resorption näherungsweise ermittelt (6) (8) (9).

1.4. BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.4.1. **Auswahl von Versuchstierarten**

Üblicherweise werden Ratten verwendet, allerdings können auch haarlose Stämme und Arten, deren Hautresorptionsrate denen der menschlichen Haut näherkommt, verwendet werden (3) (6) (7) (8) (9). Es sind junge, ausgewachsene und gesunde Tiere gleichen Geschlechts (standardmäßig männliche Tiere) üblicherweise verwendeter Laborstämme zu verwenden. Zu Beginn der Studie dürfen die Gewichtsunterschiede der verwendeten Tiere eine Grenze von ± 20 % des mittleren Gewichts nicht überschreiten. So sind beispielsweise männliche Ratten mit einem Gewicht von 200-250 g geeignet, insbesondere Tiere in der oberen Hälfte dieses Gewichtsbereichs.

▼B

1.4.2. **Zahl und Geschlecht der Versuchstiere**

Zur Vorbereitung des Tests und für jeden Beendigungszeitpunkt ist je eine Gruppe von mindestens 4 Tieren gleichen Geschlechts zu verwenden. Jede Gruppe von Tieren wird nach unterschiedlichen Zeitintervallen getötet, beispielsweise nach Ende der Expositionszeit (typischerweise 6 oder 24 Stunden) bzw. zu späteren Zeitpunkten (z. B. nach 48 und 72 Stunden). Liegen Daten vor, anhand deren erhebliche Unterschiede der dermalen Toxizität bei männlichen und weiblichen Tieren nachgewiesen werden, ist das empfindlichere Geschlecht zu wählen. Liegen keine diesbezüglichen Daten vor, ist die Wahl des Geschlechts freigestellt.

1.4.3. **Unterbringungs- und Fütterungsbedingungen**

Die Temperatur im Tierversuchsraum muss 22 °C (± 3 °C) betragen. Die relative Luftfeuchte muss mindestens 30 % betragen und sollte 70 % — außer beim Reinigen des Raums — nicht überschreiten. Angestrebt werden sollte eine Luftfeuchte von 50-60 %. Für die Beleuchtung ist Kunstlicht zu verwenden und so zu schalten, dass sich 12 Stunden Licht mit 12 Stunden Dunkelheit abwechseln. Zur Ernährung sind herkömmliche Labornahrungsmittel zu verwenden, die unrationiert mit einer unbegrenzten Menge Trinkwasser zur Verfügung stehen sollten. Während der Studie sowie vorzugsweise auch während der Eingewöhnungsphase werden die Tiere einzeln in Stoffwechselkäfigen untergebracht. Da die Ergebnisse durch verschüttetes Nahrungsmittel und Wasser beeinträchtigt würden, ist die Wahrscheinlichkeit derartiger Störungen zu minimieren.

1.4.4. **Präparation der Tiere**

Die Tiere werden markiert, damit sie einzeln identifiziert werden können. Vor Beginn der Studie werden sie mindestens 5 Tage lang in ihren Käfigen gehalten, so dass eine Gewöhnung an die Laborbedingungen erfolgen kann.

Nach der Akklimatisierungsphase und rund 24 Stunden vor der Verabreichung der Dosis wird an jedem Tier ein Hautbereich im Schulter- und Rückenbereich geschoren. Da geschädigte Haut andere Permeationseigenschaften als intakte Haut aufweist, ist Abrieb der Hautoberfläche zu vermeiden. Nach der Schur und rund 24 Stunden vor Auftragen der Testsubstanz auf die Haut (siehe Abschnitt 1.4.7) ist die Hautoberfläche mit Aceton abzuwischen, um das Sebum zu entfernen. Zusätzliches Waschen mit Seife und Wasser ist nicht zu empfehlen, da Seifenrückstände die Resorption der Testsubstanz fördern könnten. Der Bereich muss so groß sein, dass eine zuverlässige Berechnung der resorbierten Menge der Testchemikalie je $cm^2$ Haut gewährleistet ist, vorzugsweise also mindestens 10 $cm^2$. Ein solcher Bereich kann an Ratten mit einem Körpergewicht von 200-250 g hergestellt werden. Nach der Vorbereitung werden die Tiere wieder in die Stoffwechselkäfige platziert.

1.4.5. **Testsubstanz**

Als Testsubstanz wird der Stoff verwendet, dessen Penetrationseigenschaften untersucht werden sollen. Idealerweise ist die Testsubstanz radioaktiv zu markieren.

1.4.6. **Testpräparation**

Die Präparation der Testsubstanz (z. B. reines, verdünntes oder formuliertes Material, das die auf der Haut aufgetragene Testchemikalie enthält) muss der Substanz entsprechen (oder ein realistisches Surrogat hiervon bilden), der Menschen oder andere betroffene Gruppen ausgesetzt sein können. Etwaige Abweichungen von der in der Praxis verwendeten Präparation sind zu begründen. Bei Bedarf wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Medium gelöst oder suspendiert. Bei anderen Trägermedien als Wasser müssen die Resorptionseigenschaften und mögliche Wechselwirkungen mit der Testsubstanz bekannt sein

▼B

1.4.7. **Aufbringen auf die Haut**

Auf der Hautoberfläche wird eine Applikationsstelle mit einer bestimmten Fläche festgelegt. Eine bekannte Menge der Testpräparation wird gleichmäßig auf dieser Stelle aufgetragen. Diese Menge muss im Regelfall die potenzielle Exposition wiedergeben, der der Mensch ausgesetzt ist, typischerweise bei Feststoffen 1-5 mg/cm$^2$ oder bei Flüssigkeiten bis zu 10 µl/cm$^2$. Abweichende Mengen müssen aufgrund der zu erwartenden Verwendungsbedingungen, der Untersuchungsziele oder der physikalischen Eigenschaften der Testpräparation gerechtfertigt sein. Nach dem Auftrag ist die behandelte Stelle gegen Überstreichen zu schützen. Eine typische Vorrichtung hierfür ist in Abbildung 1 dargestellt; normalerweise wird die Hautstelle, an der der Auftrag erfolgte, durch eine nicht okklusive Abdeckung geschützt (z. B. eine permeable Nylongazeabdeckung). Bei infiniter Applikation ist die Applikationsstelle jedoch zu okkludieren. Falls durch die Verdunstung semiflüchtiger Testsubstanzen die Rückgewinnungsrate der Testsubstanz in einem inakzeptablen Maß verringert wird (siehe auch Abschnitt 1.4.10, erster Absatz), muss die verdunstete Substanz in einem Aktivkohlefilter über der Applikationsvorrichtung aufgefangen werden (siehe Abbildung 1). Derartige Vorrichtungen dürfen die Haut nicht schädigen und die Testpräparation weder absorbieren noch mit ihr reagieren. Die Tiere werden anschließend wieder in ihre Stoffwechsel-Einzelkäfige gesetzt, damit die Exkremente aufgefangen werden können.

1.4.8. **Dauer der Exposition und Probenahme**

Die Expositionsdauer entspricht der Zeitdauer zwischen Auftrag und Entfernung der Testpräparation durch Waschen der Haut. Dabei ist eine aussagefähige Expositionszeit (normalerweise 6 oder 24 Stunden) entsprechend der beim Menschen zu erwartenden Expositionsdauer einzuhalten. Nach der Expositionsdauer verbleiben die Tiere bis zum planmäßigen Ende der Studie in den Stoffwechselkäfigen. Während der gesamten Dauer der Studie sind die Tiere in regelmäßigen Intervallen auf Anzeichen toxischer Wirkungen/-abnormaler Reaktionen zu beobachten. Am Ende der Expositionszeit ist die behandelte Hautfläche auf sichtbare Anzeichen einer Reizung zu untersuchen.

Die Stoffwechselkäfige müssen so eingerichtet sein, dass Urin und Fäzes während der gesamten Untersuchungsdauer separat gesammelt werden können. Die Sammlung von $^{14}$C-Kohlendioxid und flüchtigen $^{14}$C-Kohlenstoffverbindungen muss möglich sein; diese Verbindungen sind, wenn sie in entsprechender Menge anfallen (> 5 %), zu analysieren. Urin, Exkremente und in der Auffangvorrichtung zurückgehaltene Flüssigkeiten (z. B. $^{14}$C-Kohlendioxid und flüchtige $^{14}$C-Verbindungen) sind zu den einzelnen Probenahmezeitpunkten aus jeder Gruppe einzeln zu sammeln. Liegen ausreichende Angaben darüber vor, dass kaum oder keine flüchtigen radioaktiven Stoffwechselprodukte gebildet werden, können auch offene Käfige verwendet werden.

Die Exkremente werden während der Dauer der Exposition, bis zu 24 Stunden nach dem erstmaligen Hautkontakt und anschließend täglich bis zum Ende des Versuchs gesammelt. Normalerweise sind drei Intervalle für die Sammlung von Exkrementen ausreichend, je nach beabsichtigtem Zweck der Testpräparation oder vorliegenden kinetischen Daten können jedoch auch geeignetere oder zusätzliche Zeitpunkte für eine Untersuchung in Betracht kommen.

Am Ende des Expositionszeitraums wird die Schutzvorrichtung von den Tieren entfernt und separat zur weiteren Analyse verwahrt. An allen Tieren ist die behandelte Haut mindestens dreimal mit geeigneten Tupfern zu waschen. Dabei ist darauf zu achten, dass keine anderen Körperteile kontaminiert werden. Das Reinigungsmittel muss typisch für die bei normaler Körperhygiene verwendeten Produkte sein, z. B. eine wässrige Seifenlösung. Abschließend ist die Haut zu trocknen. Sämtliche Tupfer und Waschrückstände sind zur Analyse aufzubewahren. Bei Tieren jener Gruppen, die bis zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden, ist zum Schutz der behandelten Hautstelle eine neue Abdeckung anzubringen, bevor diese wieder in ihre Einzelkäfige verbracht werden.

▼B

1.4.9. **Abschließende Schritte**

Die Tiere der einzelnen Gruppen sind zum festgelegten Zeitpunkt zu töten, und das Blut ist zur Analyse aufzufangen. Die Schutzvorrichtung bzw. -abdeckung ist zur Analyse zu entfernen. Die Haut an der Applikationsstelle und ein ähnlicher Bereich unbehandelter, rasierter Haut sind zur separaten Analyse bei jedem Tier zu entfernen. Die Applikationsstelle kann zerlegt werden, wobei das *Stratum corneum* von der darunter liegenden Epidermis getrennt wird und daraus weitere Informationen zur Verteilung der Testchemikalie gewonnen werden. Durch die Ermittlung der Ablagerung über einen bestimmten Zeitraum nach der Expositionszeit lassen sich Angaben zum Verbleib bzw. Verhalten der einzelnen Testchemikalien im *Stratum corneum* gewinnen. Um die Fraktionierung der Haut zu erleichtern (nachdem die Haut letztmalig gewaschen und das Tier getötet wurde), werden die einzelnen Schutzabdeckungen entfernt. Die Applikationsstelle auf der Haut sowie ein angrenzender ringförmiger Hautbereich werden aus dem Rattenkörper herausgeschnitten und auf einer Unterlage befestigt. Ein Klebestreifen wird mit leichtem Druck auf der Hautoberfläche angedrückt und das Klebeband zusammen mit einem Teil des *Stratum corneum* abgezogen. Anschließend werden weitere Klebestreifen aufgebracht, bis das Klebeband nicht mehr an der Hautoberfläche haftet; dann ist das gesamte *Stratum corneum* entfernt. Sämtliche Klebestreifen eines jeden Tieres können in einem einzigen Behälter gemeinsam verwahrt werden; diesem Behälter wird ein Gewebeauflösungsmittel zur Auflösung des *Stratum corneum* zugesetzt. Bestimmte für die Untersuchung bestimmte Gewebe können zur separaten Messung entnommen werden, bevor der Tierkörper auf die resorbierte Körperdosis untersucht wird. Die Körper der einzelnen Tiere sind zu Analysezwecken aufzubewahren. Normalerweise reicht die Analyse des Gesamtgehalts aus. Zur Untersuchung vorgesehene Organe können zur separaten Analyse entnommen werden (wenn dies durch andere Studien angezeigt ist). Der zum Zeitpunkt der Tötung in der Blase enthaltene Urin ist zu dem zuvor gesammelten Urin zu geben. Nachdem die Exkremente zum Zeitpunkt der Tötung aus den Stoffwechselkäfigen gesammelt wurden, sind die Käfige und ihre Auffangvorrichtungen mit einem geeigneten Lösemittel zu waschen. Andere möglicherweise verunreinigte Geräte sind ebenfalls zu analysieren.

1.4.10. **Analyse**

In allen Studien ist eine ausreichende Rückgewinnung (d. h. ein Mittelwert von 100 ± 10 % der Radioaktivität) anzustreben. Rückgewinnungsraten außerhalb dieses Sollbereichs sind zu begründen. Die Menge der in jeder Probe verabreichten Dosis ist durch in geeigneter Weise validierte Verfahren zu analysieren.

Als Teil der statistischen Untersuchung ist bei den Wiederholungen jeder Anwendung ein Maß für die Streuung zu berücksichtigen.

2. **DATEN**

An sämtlichen Tieren sind bei jeder Probenahme der Testchemikalie und/oder der Stoffwechselprodukte die unten stehenden Messungen durchzuführen. Zusätzlich zu Einzeldaten sind die entsprechend den Probenahmezeiten zu Gruppen zusammengefassten Daten als Mittelwerte in den Bericht aufzunehmen:

— Menge, die den Schutzvorrichtungen zugeordnet wird,

— Menge, die aus der Haut gelöst werden kann,

— Menge in/auf der Haut, die nicht von der Haut abgewaschen werden kann,

▼B

— Menge in der Blutprobe,

— Menge in den Exkrementen und der ausgeatmeten Luft (falls maßgeblich),

— im Körper und in zu separaten Analysen entnommenen Organen verbleibende Menge.

Anhand der in den Exkrementen, der ausgeatmeten Luft, im Blut und im Körper enthaltenen Menge der Testsubstanz und/oder der Metaboliten kann die zu den jeweiligen Zeitpunkten resorbierte Gesamtmenge bestimmt werden. Außerdem ist eine Berechnung der Menge der Testchemikalie möglich, die je $cm^2$ der während der Expositionszeit der Testsubstanz ausgesetzten Haut resorbiert wurde.

3. **BERICHTERSTATTUNG**

3.1. ABSCHLUSSBERICHT

Der Testbericht muss die im Protokoll festgelegten Anforderungen einschließlich einer Begründung für das verwendete Testsystem sowie folgende Angaben enthalten:

Prüfsubstanz

— Kenndaten, z. B. CAS-Nummer, sofern vorhanden, Quelle, Reinheit (radiochemische Reinheit), bekannte Verunreinigungen, Partienummer;

— physikalische Beschaffenheit, physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. pH-Wert, Flüchtigkeit, Löslichkeit, Stabilität, Molgewicht und log Pow).

Testpräparation:

— Formulierung und Begründung für die Verwendung;

— Details der Testpräparation, aufgetragene Menge, erreichte Konzentration, Vehikel, Stabilität und Homogenität.

Versuchstier:

— Art/Stamm;

— Zahl, Alter und Geschlecht der Tiere;

— Herkunft der Tiere, Unterbringungsbedingungen, Ernährung usw.;

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Versuchsbeginn.

Prüfbedingungen:

— Details zur Verabreichung der Testpräparation (Applikationsort, Testmethoden, Okklusion/Nicht-Okklusion, Volumen, Extraktion, Nachweis);

— Angaben zu Futter- und Wasserqualität.

Ergebnisse:

— etwaige Anzeichen von Toxizität;

— in Tabellenform dargestellte Resorptionsdaten (angegeben als Geschwindigkeit, Menge oder Prozentwert);

▼B

— Gesamtrückgewinnungsrate aus dem Versuch;

— Auswertung der Ergebnisse, Vergleich mit bereits vorliegenden Daten zur perkutanen Resorption der Testverbindung.

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATURHINWEISE**

1. Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian R.P. (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829-835.

5. Kemppainen B.W., Reifenrath W.G. (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.

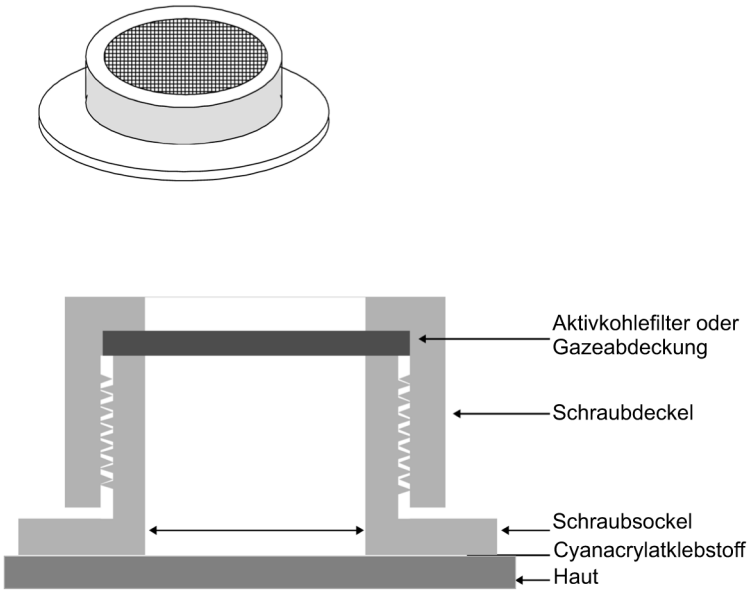
8. Bronaugh R.L., Wester R.C., Bucks D., Maibach H.I. and Sarason R. (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369-373.

9. Feldman R.J. and Maibach H.I. (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399-404.

▼B

*Abbildung 1*

**Beispiel für die Gestaltung einer typischen Vorrichtung zur Begrenzung und zum Schutz der dermalen Applikationsstelle bei In-vivo-Studien zur perkutanen Resorption**



▼B

B.45. **HAUTRESORPTION: *IN-VITRO-METHODE***

1. **METHODE**

Diese Testmethode entspricht OECD TG 428 (2004).

1.1. EINLEITUNG

Diese Methode soll Aufschluss über die Resorption einer auf ein ausgeschnittenes Hautstück aufgebrachten Testsubstanz geben. Sie kann entweder mit der Hautresorptionsmethode: In-vivo-Methode (1) kombiniert oder separat durchgeführt werden. Für die Gestaltung von Studien auf der Grundlage dieser Methode wird empfohlen, das OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2) zu Rate zu ziehen. Diese Richtlinie soll Hilfestellung bei der Wahl geeigneter In-vitro-Verfahren für bestimmte Anwendungsfälle leisten, damit die Zuverlässigkeit der durch dieses Verfahren gewonnenen Ergebnisse gewährleistet ist.

Die Methoden zur Messung der Hautresorption und des dermalen Eintrags lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: in vivo und in vitro. In-vivo-Methoden zur Untersuchung der Hautresorption sind seit langem etabliert und liefern pharmakokinetische Angaben zu verschiedenen Tierarten. Eine In-vivo-Methode wird in einer weiteren Testmethode (1) beschrieben. In-vitro-Methoden werden seit Jahren ebenfalls zur Messung der Hautresorption eingesetzt. Offizielle Validierungsstudien der In-vitro-Methoden, die unter die vorliegende Testmethode fallen, wurden zwar nicht durchgeführt, doch wurde von den OECD-Experten im Jahr 1999 festgestellt, dass der Umfang der evaluierten Daten als Bestätigung der In-vitro-Methode ausreicht (3). Weitere Details zur Untermauerung dieser Bestätigung — darunter umfangreiche direkte Vergleiche von In-vitro- und In-vivo-Methoden — sind in der unter (2) angegebenen Richtlinie (Guidance Document) enthalten. Dieses Thema wurde bereits in zahlreichen Monografien dargestellt, die auch ausführliche Hintergrundinformationen zum Einsatz von In-vitro-Methoden enthalten (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Mit In-vitro-Methoden wird die Diffusion von Chemikalien in und durch die Haut in einen Flüssigkeitstank gemessen, wobei an nicht lebensfähiger Haut die reine Diffusion oder an frischer, stoffwechselaktiver Haut gleichzeitig Diffusion und Hautstoffwechsel gemessen werden können. Derartige Methoden finden insbesondere Verwendung als Raster für den Vergleich des Eintrags von Chemikalien aus unterschiedlichen Formulierungen in und durch die Haut und bieten sich darüber hinaus als nützliche Modelle für die Beurteilung der perkutanen Resorption beim Menschen an.

Die In-vitro-Methode eignet sich möglicherweise nicht für sämtliche Situationen und Chemikalienklassen. Möglicherweise kann die In-vitro-Testmethode zur einleitenden qualitativen Evaluierung der Penetration durch die Haut verwendet werden. In bestimmten Fällen muss dies durch In-vivo-Daten untermauert werden. Zur weiteren Vertiefung jener Fälle, in denen die In-vitro-Methode geeignet wäre, ist die unter (2) angegebene Richtlinie (Guidance Document) heranzuziehen. Weitere detaillierte Informationen zur Untermauerung der Entscheidungsfindung sind in (3) nachzulesen.

Die hier beschriebene Methode gibt Aufschluss über die grundlegenden Prinzipien der Messung der dermalen Resorption und des Eintrags einer Testsubstanz auf ausgeschnittenen Hautstücken. Hierfür können Hautproben zahlreicher Säugetierarten — auch menschliche Haut — verwendet werden. Die Permeabilitätseigenschaften der Haut bleiben nach dem Ausschneiden des Hautstücks aus dem Körper erhalten, da die abgestorbene Hornhaut *(Stratum corneum)* die Hauptdiffusionssperre bildet; ein aktiver Transport von Chemikalien durch die Haut wurde nicht festgestellt. Es wurde nachgewiesen, dass die Haut in der Lage ist, bei der perkutanen Resorption bestimmte Chemikalien in Stoffwechselprodukte umzusetzen (6); allerdings tritt bei diesem Prozess hinsichtlich der tatsächlich resorbierten Dosis keine Begrenzung der Geschwindigkeit ein, jedoch kann die Art des in den Blutkreislauf gelangenden Materials davon beeinflusst werden.

▼B

1.2. DEFINITIONEN

**Unresorbierte Dosis:** Dies entspricht der nach der Exposition von der Hautoberfläche abgewaschenen Dosis sowie der ggf. in der nicht okkludierten Abdeckung enthaltenen Dosis, einschließlich etwaiger Dosen, bei denen nachgewiesen wird, dass sie sich während der Exposition auf der Haut verflüchtigen.

**Resorbierte Dosis (in vitro):** Masse der Testsubstanz, die innerhalb einer bestimmten Zeit in den Rezeptor-Flüssigkeits- oder -Systemkreislauf gelangt.

**Resorbierbare Dosis (in vitro):** die nach dem Abwaschen auf oder in der Haut vorhandene Dosis.

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Testsubstanz, die radioaktiv markiert werden kann, wird auf die Oberfläche eines Hautprobestücks aufgetragen, das die beiden Kammern einer Diffusionszelle voneinander trennt. Die Chemikalie verbleibt unter festgelegten Bedingungen eine bestimmte Zeit lang auf der Haut, bevor sie durch ein geeignetes Reinigungsverfahren entfernt wird. Von der Rezeptorflüssigkeit werden zu bestimmten Zeitpunkten während des Versuchs Proben genommen und auf die Testchemikalie und/oder Metaboliten analysiert.

Bei Verwendung stoffwechselaktiver Systeme können die Metaboliten der Testchemikalie durch geeignete Verfahren analysiert werden. Am Ende des Experiments werden die Verteilung der Testchemikalie und ggf. deren Metaboliten quantifiziert.

Unter entsprechenden Bedingungen, die in der vorliegenden Methode und in Richtlinie (2) beschrieben sind, wird durch Analyse der Rezeptorflüssigkeit und der behandelten Haut die während eines bestimmten Zeitraums erfolgte Resorption einer Testsubstanz gemessen. Die auf der Haut verbleibende Testsubstanz ist als resorbiert zu betrachten, es sei denn, es kann nachgewiesen werden, dass die Resorption anhand der Werte der Rezeptorflüssigkeit alleine ermittelt werden kann. Anhand der Analyse der übrigen Bestandteile (von der Haut abgewaschenes und zwischen den Hautschichten verbleibendes Material) kann eine weitere Evaluierung der Daten vorgenommen werden, unter anderem auch die Gesamtverteilung der Testsubstanz und die prozentuale Rückgewinnung.

Als Nachweis für die Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit des Testsystems müssen die Ergebnisse der relevanten Referenzchemikalien vorliegen und mit dem veröffentlichten Schrifttum zu der verwendeten Methode übereinstimmen. Diese Anforderung könnte erfüllt werden, indem die Tests mit einer geeigneten Referenzsubstanz (deren Lipophilie vorzugsweise den Werten der Testsubstanz näherungsweise entsprechen sollte) zeitgleich mit der Testsubstanz durchgeführt werden oder indem ausreichende historische Daten für verschiedene Referenzsubstanzen unterschiedlicher Lipophilie vorgelegt werden (z. B. Koffein, Benzoesäure und Testosteron).

1.4. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.4.1. **Diffusionszelle**

Die Diffusionszelle besteht aus einer Spenderkammer und einer Rezeptorkammer, zwischen denen die Haut angeordnet wird (ein Beispiel für einen typischen Aufbau einer solchen Kammer ist in Abbildung 1 dargestellt). Die Zelle muss so aufgebaut werden, dass die Haut dicht umschlossen wird, die Probenahme auf einfache Weise möglich ist und eine gute Durchmischung der Rezeptorlösung erreicht wird, die mit der Hautunterseite in Berührung kommt, und außerdem eine gute Temperaturregelung der Zelle und ihres Inhalts möglich ist. Es sind sowohl statische Diffusionszellen als auch Durchfluss-Diffusionszellen zulässig. Normalerweise sind die Spenderkammern bei der Exposition gegenüber einer finiten Dosis einer Testpräparation nicht okkludiert. Bei infiniten Applikationen und bestimmten bei finiten Dosen vorkommenden Szenarien können die Spenderkammern jedoch auch okkludiert werden.

▼B

1.4.2. **Rezeptorflüssigkeit**

Vorzugsweise ist eine physiologisch geeignete Rezeptorflüssigkeit zu verwenden, allerdings sind auch andere Flüssigkeitsarten zulässig, sofern deren Verwendung begründet werden kann. Die genaue Zusammensetzung der Rezeptorflüssigkeit ist anzugeben. Eine ausreichende Löslichkeit der Testchemikalie in der Rezeptorflüssigkeit ist nachzuweisen, damit sie nicht als Resorptionssperre wirkt. Außerdem darf die Rezeptorflüssigkeit die Intaktheit des Hautstücks nicht beeinträchtigen. In einem Durchflusssystem darf die Durchflussgeschwindigkeit die Diffusion der Testsubstanz in die Rezeptorflüssigkeit nicht behindern. In einem statischen Zellensystem muss die Flüssigkeit ständig umgerührt werden, und es sind regelmäßig Proben zu entnehmen. Wird der Stoffwechsel untersucht, muss die Rezeptorflüssigkeit so beschaffen sein, dass die Viabilität der Haut während des gesamten Verlaufs des Experiments unterstützt wird.

1.4.3. **Herstellung der Hautstücke**

Es kann menschliche oder tierische Haut verwendet werden. Natürlich unterliegt die Verwendung menschlicher Haut einzelstaatlichen und internationalen ethischen Kriterien und Auflagen. Vorzugsweise sollte lebensfähige Haut verwendet werden, allerdings ist auch die Verwendung von abgestorbener Haut zulässig, sofern die Intaktheit der Haut nachgewiesen werden kann. Es sind entweder Epidermismembranen (die durch Enzyme, durch Wärme oder auf chemischem Wege separiert wurden) oder geteilte Hautlagen (typischerweise mit einer Dicke von 200-400 μm), die mit einem Dermatom hergestellt wurden, zulässig. Es kann auch die volle Hautdicke verwendet werden, allerdings ist eine übermäßige Hautdicke (ca. > 1 mm) zu vermeiden, sofern dies nicht zur Feststellung der Testchemikalie in den einzelnen Hautlagen erforderlich ist. Die Wahl der Arten, die anatomische Entnahmestelle und das Präparationsverfahren sind zu begründen. Es müssen akzeptable Daten aus mindestens vier Wiederholungs-Gleichtests je Testpräparation vorliegen.

1.4.4. **Intakte Beschaffenheit des hergestellten Hautstücks**

Eine sachgemäße Herstellung des Hautstücks ist von größter Bedeutung. Durch unsachgemäße Handhabung kann die Hornhaut *(Stratum corneum)* beschädigt werden; daher ist das hergestellte Hautstück auf intakte Beschaffenheit zu kontrollieren. Bei der Untersuchung des Hautstoffwechsels ist die frisch ausgeschnittene Haut möglichst zeitnah und unter Bedingungen, die nachgewiesenermaßen eine Stoffwechselaktivität unterstützen, zu verwenden. Als Richtwert gilt dabei, dass frisch ausgeschnittene Haut innerhalb von 24 Stunden zu verwenden ist; die zulässige Lagerungsdauer kann jedoch je nach dem an der Metabolisierung beteiligten Enzymsystem und den Lagertemperaturen variieren (13). Wurden die hergestellten Hautstücke vor der Verwendung gelagert, ist nachzuweisen, dass die Barrierefunktion erhalten bleibt.

1.4.5. **Testsubstanz**

Als Testsubstanz gilt der Stoff, dessen Penetrationseigenschaften untersucht werden sollen. Idealerweise sollte die Testsubstanz radioaktiv markiert werden.

1.4.6. **Testpräparation**

Die Präparation der Testsubstanz (z. B. reines, verdünntes oder formuliertes Material, das die auf der Haut aufgetragene Testchemikalie enthält) muss der Substanz entsprechen (oder ein realistisches Surrogat hiervon bilden), der Menschen oder andere mögliche Zielarten ausgesetzt sein können. Etwaige Abweichungen von der in der Praxis verwendeten Präparation sind zu begründen.

▼B

1.4.7. **Konzentrationen und Formulierungen von Testsubstanzen**

Normalerweise wird mehr als eine Konzentration der Testsubstanz verwendet; dies deckt die Obergrenze der potenziell beim Menschen auftretenden Expositionswerte ab. Analog ist die Durchführung von Tests mit verschiedenen typischen Formulierungen in Betracht zu ziehen.

1.4.8. **Aufbringen auf die Haut**

Unter den normalen Bedingungen der Chemikalienexposition beim Menschen kommen üblicherweise finite Dosen vor. Bei Applikationen, bei denen die Exposition beim Menschen nachgestellt wird, sind bei Feststoffen normalerweise 1-5 $mg/cm^2$ Haut und bei Flüssigkeiten bis zu 10 $\mu l/cm^2$ anzusetzen. Die verwendete Menge ist durch die zu erwartenden Einsatzbedingungen, die Ziele der Studie und die physikalischen Kenngrößen der Testpräparation zu begründen. So kann das Aufbringen auf die Haut beispielsweise in infiniter Form erfolgen, wenn größere Volumina je Flächeneinheit aufgebracht werden.

1.4.9. **Temperatur**

Die passive Diffusion der Chemikalien (und damit ihre Hautresorption) wird durch die Temperatur beeinflusst. Die Diffusionskammer und die Haut müssen auf konstanter Temperatur in Nähe der normalen Hauttemperatur von 32 ±1 °C gehalten werden. Bei unterschiedlichem Zellaufbau sind auch unterschiedliche Wasserbad- oder Heizblocktemperaturen erforderlich, damit sich der Rezeptor bzw. die Haut innerhalb der physiologischen Normbedingungen befindet. Die Luftfeuchte sollte möglichst zwischen 30 und 70 % liegen.

1.4.10. **Dauer der Exposition und Probenahme**

Die Exposition der Haut gegenüber der Testpräparation kann sich über die gesamte Versuchsdauer oder über kürzere Zeiträume erstrecken (z. B. zur Nachahmung einer bestimmten Expositionsart beim Menschen). Überschüssige Rückstände der Testpräparation sind mit einem geeigneten Reinigungsmittel von der Haut abzuwaschen und die Spülrückstände zur Analyse aufzufangen. Das Verfahren zur Entfernung der Testpräparation ist von den erwarteten Einsatzbedingungen abhängig und ist zu begründen. Normalerweise ist eine 24-stündige Probenahmephase erforderlich, um das Resorptionsprofil angemessen charakterisieren zu können. Da bereits nach 24 Stunden eine Verschlechterung der Hautbeschaffenheit eintreten kann, sollte die Probenahmedauer normalerweise einen Zeitraum von 24 Stunden nicht überschreiten. Bei Testsubstanzen, die rasch in die Haut eindringen, ist dies möglicherweise nicht erforderlich, bei Testsubstanzen mit einer sehr langsamen Penetrationsgeschwindigkeit ist evtl. ein längerer Untersuchungszeitraum erforderlich. Die Probenahmefrequenz der Rezeptorflüssigkeit muss so ausgelegt sein, dass das Resorptionsprofil der Testsubstanz grafisch dargestellt werden kann.

1.4.11. **Abschließende Schritte**

Alle Komponenten des Testsystems sind zu analysieren, und die Rückgewinnungsrate ist zu ermitteln. Hierin einbezogen werden die Spenderkammer, die Spülung der Hautoberfläche, das hergestellte Hautstück und die Rezeptorflüssigkeit/-kammer. In bestimmten Fällen kann die Haut in den der Testsubstanz ausgesetzten Hautbereich und den Hautbereich unter dem Zellenflansch sowie zu separaten Analysen in die Hornhaut, die Epidermis und die Dermis aufgeteilt werden.

1.4.12. **Analyse**

In sämtlichen Studien sollte eine angemessene Rückgewinnungsrate angestrebt werden (anzustreben ist ein Mittelwert von 100 ± 10 % der radioaktiven Substanz; etwaige Abweichungen sind zu begründen). Die Menge der Testsubstanz in der Rezeptorflüssigkeit, in dem hergestellten Hautstück, den Waschrückständen von der Hautoberfläche und dem Spülwasser aus dem Versuchsaufbau sind durch ein geeignetes Verfahren zu analysieren.

▼B

2. **DATEN**

Die Analyse der Rezeptorflüssigkeit, die Verteilung der Testsubstanz im Testsystem und der zeitliche Verlauf des Resorptionsprofils sind darzustellen. Im Fall einer Exposition mit finiten Dosen sind die von der Haut abgewaschene Menge, die der Haut zugeordnete Menge (und die Menge in den verschiedenen Lagen der Haut, sofern diese analysiert werden) und die in der Rezeptorflüssigkeit enthaltene Menge (Geschwindigkeit und Menge bzw. Prozentsatz der applizierten Dosis) zu berechnen. Die Hautresorption kann in bestimmten Fällen auch nur anhand der Rezeptorflüssigkeitsdaten alleine ausgedrückt werden. Verbleibt die Testsubstanz am Ende der Studie jedoch in der Haut, muss sie evtl. in die resorbierte Gesamtmenge einbezogen werden (siehe Abschnitt 66 in Quelle (3)). Im Fall einer Exposition mit infiniten Dosen kann mithilfe der Daten die Permeabilitätskonstante (Kp) ermittelt werden. Unter den letzteren Bedingungen ist der resorbierte Prozentsatz nicht relevant.

3. **BERICHTERSTATTUNG**

3.1. ABSCHLUSSBERICHT

Der Testbericht muss die im Protokoll angegebenen Anforderungen erfüllen und eine Begründung für das verwendete Testsystem sowie folgende Einzelangaben enthalten:

Testsubstanz:

— physikalische Beschaffenheit, physikalisch-chemische Eigenschaften (zumindest Molgewicht und log Pow), Reinheit (radiochemische Reinheit);

— Kenndaten (z. B. Chargennummer);

— Löslichkeit in der Rezeptorflüssigkeit.

Testpräparation:

— Formulierung und Begründung für die Verwendung;

— Homogenität.

Prüfbedingungen:

— Herkunft und Lage der Haut, Herstellungsmethode, Lagerungsbedingungen vor der Verwendung, etwaige Vorbehandlung (Reinigung, Antibiotikabehandlungen usw.), Messung der Unversehrtheit der Haut, Stoffwechselstatus, Begründung der Verwendung;

— Zellenaufbau, Zusammensetzung der Rezeptorflüssigkeit, Durchflussrate der Rezeptorflüssigkeit bzw. Probenahmezeiten und -verfahren;

— Details für die Aufbringung der Testpräparation und Quantifizierung der aufgebrachten Dosis;

— Expositionsdauer;

— Details zur Entfernung der Testpräparation von der Haut, z. B. Spülen der Haut;

— Details zur Hautanalyse und zu den zum Nachweis der Verteilung in der Haut verwendeten Fraktionierungstechniken;

▼B

— Verfahren zum Waschen der Zelle und der Geräte;

— Testmethoden, Extraktionsverfahren, Detektionsgrenzen und Validierung der Analysenmethoden.

Ergebnisse:

— Gesamtrückgewinnungsrate aus dem Experiment (aufgebrachte Dosis = Waschrückstände von der Haut + Haut + Rezeptorflüssigkeit + Waschrückstände aus der Zelle);

— tabellarische Darstellung der rückgewonnenen Mengen für die einzelnen Zellen in jeder Zellenkammer;

— Resorptionsprofil;

— tabellarische Darstellung der Resorptionsdaten (als Rate, Betrag oder Prozentwert angegeben).

Erörterung der Ergebnisse.

Schlussfolgerungen.

4. **LITERATURHINWEISE**

1. Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen B.W and Reifenrath W.G. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh R.L. and Collier, S.W. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* R.L. Bronaugh and H.I. Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, 237-241.

6. Bronaugh R.L. and Maibach H.I.. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck W., Beck H., Benech-Kieffer F., Courtellemont P., Dupuis J., Lovell W., Paye M., Spengler J., Steiling W. (1999). Test Guidelines for In *Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D., Guy R., Hadgraft J., Heylings J.R. *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

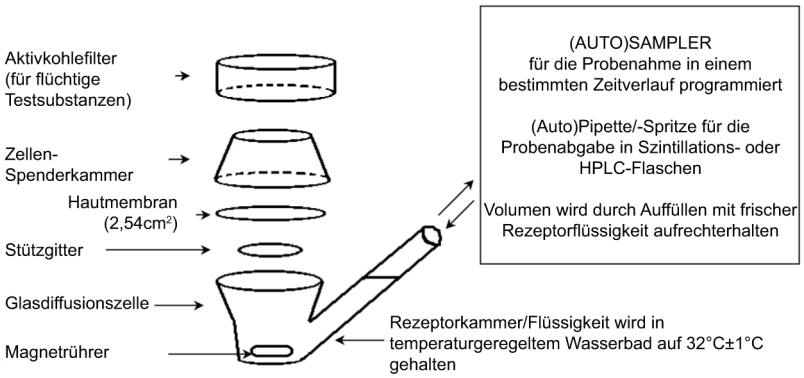
11. Schaefer H. and Redelmeier T.E. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts M.S. and Walters K.A. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, J.R., Clowes, H.M. and Williams, F.M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

*Abbildung 1*

**Beispiel für den typischen Aufbau einer statischen Diffusionszelle für perkutane In-vitro-Resorptionsstudien**



▼M3

## B.46. *IN-VITRO*-HAUTREIZUNG: TEST AN REKONSTRUIERTEN MODELLEN HUMANER EPIDERMIS

EINLEITUNG

1. Unter einer Hautreizung versteht man das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung nach Applikation einer Prüfsubstanz für die Dauer von bis zu 4 Stunden [Definition nach dem Globalen Harmonisierten System (GHS) zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN) und nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (1) (3)]. Mit der vorliegenden Prüfmethode steht ein *in vitro*-Verfahren zur Verfügung, das zur Ermittlung schädlicher Wirkungen von hautreizenden Chemikalien (Stoffen und Gemischen) gemäß UN GHS und EU CLP-Verordnung Kategorie 2 (1) (2) (3) herangezogen werden kann. In der EU und in anderen Regionen, die die optionale Kategorie (leichte Reizstoffe) nach UN GHS nicht übernommen haben, kann diese Prüfmethode auch zur Identifizierung nicht klassifizierter Chemikalien, d. h. „Keine Kategorie“ nach UN GHS und EU CLP, verwendet werden (1) (3). Die vorliegende Prüfmethode kann außerdem als eigenständiger Ersatztest für *in vivo*-Tests auf Hautreizungen innerhalb einer sequenziellen Teststrategie eingesetzt werden, um das Hautreizungspotenzial von Chemikalien zu bestimmen (4 und Kapitel B.4 in diesem Anhang).

2. Hautreizungen werden bislang in der Regel anhand von Versuchstieren bewertet [OECD-Prüfrichtlinie 404; Kapitel B.4 in diesem Anhang] (4). Um dem Tierschutzaspekt Rechnung zu tragen, wurde Methode B.4 2004 überarbeitet und sieht nun vor, dass Hautätzungen/-reizungen auch im Wege einer sequenziellen Teststrategie bestimmt werden können, bei der validierte *in vitro*- oder *ex vivo*-Prüfmethoden angewandt werden, die den Tieren Schmerzen und Leiden ersparen. Drei validierte *in vitro*-Prüfmethoden wurden als OECD-Prüfrichtlinien 430, 431 und 435 (5) (6) (7) verabschiedet, und zwei von ihnen — Kapitel B.40 und B.40bis dieses Anhangs — können für den Hautätzungen betreffenden Teil der sequenziellen Teststrategie der Testmethode in Kapitel B.4 oder der OECD-Prüfrichtlinie 404 (4) eingesetzt werden.

3. Die vorliegende Prüfmethode bezieht sich auf Hautreizungen mit dem Endpunkt der menschlichen Gesundheit. Sie beruht auf Modellen rekonstruierter humaner Epidermis (RhE), die in ihrer allgemeinen Ausgestaltung (Verwendung von menschlichen, nicht transformierten Keratinozyten als zellulärem Ausgangsmaterial zum Aufbau einer repräsentativen Gewebe- und Zellarchitektur) die biochemischen und physiologischen Eigenschaften der menschlichen Oberhaut, d. h. der Epidermis, weitgehend widerspiegeln. Diese Prüfmethode umfasst auch eine Reihe von Leistungsstandards (Anlage 2) für die Bewertung ähnlicher und modifizierter Verfahren auf der Grundlage von RhE-Modellen, die vom Europäischen Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (EC-ECVAM) (8) in Übereinstimmung mit den Grundsätzen des OECD-Leitliniendokuments Nr. 34 (9) entwickelt wurden.

4. Drei validierte Verfahren entsprechen derzeit der vorliegenden Prüfmethode. Für ein *in vitro* Verfahren (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), das ein rekonstruiertes Modell menschlicher Epidermis verwendet und im Handel als EpiSkin™ erhältlich ist (auch als validierte Referenzmethode; VRM bezeichnet), wurden Prävalidierungs-, Optimierungs- und Validierungsstudien abgeschlossen. Zwei weitere im Handel erhältliche *in vitro*-Verfahren auf der Grundlage von RhE-Modellen zeigten nach Validierungsstudien auf der Basis der Leistungsstandards (21) ähnliche Ergebnisse wie das VRM. Hierbei handelt es sich um die auf rekonstruierten Modellen menschlicher Epidermis beruhenden Methoden EpiDerm™ SIT (EPI-200) und SkinEthic™ (22).

▼M3

5. Bevor ein ähnliches oder modifiziertes *in vitro* Verfahren mit anderen RhE-Modellen — außer der VRM und außer EpiDerm™ SIT (EPI-200) oder SkinEthic™ — für regulatorische Zwecke verwendet werden kann, sollten nach den in der vorliegenden Prüfmethode vorgegebenen Leistungsstandards (Anlage 2) Verlässlichkeit, Relevanz (Genauigkeit) und die Grenzen des Verfahrens für den vorgeschlagenen Verwendungszweck bestimmt werden, um sicherzustellen, dass es mit der VRM vergleichbar ist. Zudem empfiehlt es sich, das OECD-Hintergrunddokument („Explanatory Background Document") (23) über *in vitro*-Hautreizungstests zu konsultieren, bevor ähnliche oder modifizierte *in vitro*-Methoden mit RhE-Modellen entwickelt, validiert und den Regulierungsbehörden zur Anerkennung vorgelegt werden.

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

6. Die verwendeten Begriffsbestimmungen sind in Anlage 1 aufgeführt.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

7. Eine Begrenzung der Prüfmethode, wie durch die Validierungsstudie (16) nachgewiesen, besteht insofern, als keine Einstufung von Stoffen in die optionale Kategorie 3 (leichte Reizstoffe) des UN GHS-Systems möglich ist (1). Sollte sie in diesen Fällen als teilweiser Ersatztest verwendet werden, könnten weitere *in vivo*-Tests erforderlich sein, um das Hautreizungspotenzial vollständig zu charakterisieren (4 und Kapitel B.4 in diesem Anhang). Die Verwendung menschlicher Haut unterliegt anerkanntermaßen ethischen Überlegungen und Bedingungen auf nationaler und internationaler Ebene.

8. Diese Prüfmethode bezieht sich auf die *in vitro*-Komponente von Hautreizungen innerhalb der sequenziellen Teststrategie nach B.4 (OECD-Prüfrichtlinie 404) zur Ermittlung von Hautätzung/Hautreizung (4). Obwohl diese Prüfmethode keine angemessene Information über Hautätzungen liefert, wird darauf hingewiesen, dass B.40bis (OECD-Prüfrichtlinie 431) über Hautätzung auf demselben Testsystem anhand eines RhE-Modells beruht, aber ein anderes Protokoll verwendet (Kapitel B.40bis). Die vorliegende Methode beruht auf Modellen unter Verwendung menschlicher Keratinozyten, die *in vitro* das Zielorgan der zu schützenden Spezies repräsentieren. Darüber hinaus bildet sie den Anfangsschritt der Entzündungskaskade bzw. des Wirkmechanismus ab (Zell- und Gewebeschädigung mit resultierendem lokalisiertem Trauma), der während der Reizung *in vivo* auftritt. Für die dieser Prüfmethode zugrunde liegende Validierung wurden Chemikalien unterschiedlicher Klassen getestet. Die empirische Datenbasis der Validierungsstudie umfasste insgesamt 58 chemische Stoffe (16) (18) (23), einschließlich Feststoffen, Flüssigkeiten, halbfesten Stoffe und Wachsen. Flüssigkeiten können wässrig oder nicht wässrig sein; Feststoffe in Wasser löslich oder unlöslich. Sofern möglich, sollten Feststoffe vor der Applikation zu Feinpulver gemahlen werden; eine weitere Behandlung der Probe ist nicht nötig. Gase und Aerosole wurden bislang in keiner Validierungsstudie bewertet (24). Obwohl deren Prüfung mit den RhE-Verfahren prinzipiell vorstellbar ist, erlaubt die vorliegende Prüfmethode das Testen von Gasen und Aerosolen nicht. Zu beachten ist auch, dass stark gefärbte Chemikalien mit den Zellviabilitätsmessungen interferieren können und daher die Verwendung geeigneter Kontrollen zur Korrektur erfordern (siehe Absätze 24-26).

9. Vorausgesetzt der Test liefert ein eindeutiges Ergebnis, genügt ein einziger Testdurchlauf mit drei parallel geprüften Replikat-Geweben. Bei Grenzergebnissen, wie z. B. nicht übereinstimmenden Replikatmessungen und/oder einer mittleren prozentualen Viabilität von 50 ± 5 %, sollte ein zweiter Durchlauf in Betracht gezogen werden bzw. ein dritter bei abweichenden Ergebnissen der ersten beiden Durchläufe.

▼**M3**

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

10. Die Prüfsubstanz wird oberflächlich auf ein RhE-Modell aufgetragen, bestehend aus nicht veränderten humanen epidermalen Keratinozyten, die zu einem mehrschichtigen, ausdifferenzierten Modell humaner *Epidermis* kultiviert wurden, das aus geordneten Basal-, Stachel- und Körnerzellschichten und einer mehrlagigen Hornschicht (*stratum corneum*) besteht, die interzelluläre lamellare Fettschichten enthält, deren dominierende Lipidklassen dem *in vivo* gefundenen Lipidmuster entsprechen.

11. Durch Chemikalien hervorgerufene Reizungen der Haut manifestieren sich als Erytheme und Ödeme. Diese Symptome sind das Ergebnis einer Kaskade von Ereignissen, an deren Beginn das Eindringen in das *stratum corneum* mit nachfolgender Schädigung der darunter liegenden Keratinozytenschicht steht. Die absterbenden Keratinozyten setzen Mediatorsubstanzen frei, die die Entzündungskaskade in den Zellen der *Dermis*, insbesondere in den Stromalzellen und Endothelzellen, einleiten. Die Dilatation und erhöhte Durchlässigkeit der Endothelzellen erzeugen letztendlich das festgestellte Erythem bzw. Ödem (24). Die Verfahren auf der Grundlage des RhE Modells erlauben die Messung der Ereignisse zu Beginn der Kaskade.

12. Die Zellviabilität an Modellen rekonstruierter menschlicher Epidermis wird durch Enzymkonversion des Vitalfarbstoffs MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau; CAS-Nummer 298-93-1], zu einem blauen Formazan-Salz gemessen, das nach seiner Extraktion aus Geweben quantifiziert wird (25). Reizstoffe werden anhand ihrer Fähigkeit erkannt, die Zellviabilität unter vorgegebene Schwellenwerte zu senken (d. h. ≤ 50 % bei Reizstoffen der UN GHS-/EU CLP Kategorie 2). Bezogen auf die regulatorischen Rahmenbedingungen, in denen die Ergebnisse dieser Prüfmethode verwendet werden, können Chemikalien, die eine Zellviabilität oberhalb des vorgegebenen Grenzwerts erzeugen, als nicht-reizend eingestuft werden (d. h. > 50 %, Keine Kategorie).

NACHWEIS DER LEISTUNGFÄHIGKEIT

13. Bevor eines der drei validierten Verfahren, die den Anforderungen der vorliegenden Prüfmethode genügen, routinemäßig angewandt werden kann, sollten Laboratorien anhand von zehn der in Tabelle 1 aufgeführten Referenzsubstanzen die technische Leistungsfähigkeit der Methode nachweisen. Für im Rahmen dieser Prüfmethode entwickelte ähnliche Verfahren oder für Modifikationen einer der drei validierten Methoden sollten die in Anlage 2 dieser Prüfmethode beschriebenen Leistungsstandards erfüllt werden, bevor die Methode für Regulierungszwecke eingesetzt wird.

14. Als Teil des Nachweises der Leistungsfähigkeit sollte der Benutzer die von dem Hersteller des Hautmodells spezifizierten Barriereeigenschaften der Gewebe nach Erhalt überprüfen. Dies ist besonders wichtig, wenn die Gewebe über große Entfernungen/Zeiträume transportiert werden. Sobald eine Methode erfolgreich etabliert und ihre Leistungsfähigkeit demonstriert wurde, ist diese Überprüfung nicht mehr routinemäßig erforderlich. Allerdings empfiehlt es sich auch bei routinemäßig angewandten Methoden, die Barriereeigenschaften in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren.

*Tabelle 1*

**Referenzsubstanzen** ([1])

| Substanz | CAS-Nr. | *In vivo*- Punktzahl ([2]) | Aggregatzustand | UN GHS/EU CLP Kategorie |
|---|---|---|---|---|
| Naphthalen-Essigsäure | 86-87-3 | 0 | fest | Keine Kat. |
| Isopropanol | 67-63-0 | 0,3 | flüssig | Keine Kat. |

▼M3

| Substanz | CAS-Nr. | *In vivo*- Punktzahl ([2]) | Aggregatzustand | UN GHS/EU CLP Kategorie |
|---|---|---|---|---|
| Methylstearat | 112-61-8 | 1 | fest | Keine Kat. |
| Heptyl-Butyrat | 5870-93-9 | 1,7 | flüssig | Keine Kat. *(wahlfrei Kat. 3)* ([3]) ([4]) |
| Hexyl-Salicylat | 6259-76-3 | 2 | flüssig | Keine Kat. *(wahlfrei Kat.3)* ([3]), ([4]) |
| Cyclamenaldehyd | 103-95-7 | 2,3 | flüssig | Kat. 2 |
| 1-Bromohexan | 111-25-1 | 2,7 | flüssig | Kat. 2 |
| Kaliumhydroxid (5 % aq.) | 1310-58-3 | 3 | flüssig | Kat. 2 |
| 1-Methyl-3-phenyl-1-piperazin; | 5271-27-2 | 3,3 | fest | Kat. 2 |
| Heptanal | 111-71-7 | 3,4 | flüssig | Kat. 2 |

([1]) Diese Referenzsubstanzen sind eine Untergruppe der in der Validierungsstudie verwendeten Referenzsubstanzen.
([2]) *In vivo*- Punktzahl in Übereinstimmung mit B.4 und OECD-Prüfrichtlinie 404 (4).
([3]) Im Rahmen dieser Prüfmethode wird die wahlfreie UN GHS Kategorie 3 (leichte Reizstoffe) (1) als Keine Einstufung betrachtet.
([4]) Die wahlfreie UN GHS Kategorie 3 ist auf das EU CLP nicht anwendbar.

VERFAHREN

15. Es folgt eine Beschreibung der Elemente und Verfahrensschritte eines Hautreizungstests am RhE-Modell. Ein RhE-Modell sollte rekonstruiert sein und kann selbst hergestellt oder im Handel erworben werden. Standardarbeitsweisen (SOP's) für EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) und SkinEthic™ RHE sind verfügbar (26) (27) (28). Die Tests sollten wie folgt durchgeführt werden:

**Elemente der RhE-Prüfmethode**

*Allgemeine Bedingungen*

16. Die Epithelschicht sollte aus normalen menschlichen Keratinozyten gebildet werden. Unter der funktionsfähigen Hornschicht (*stratum corneum*) sollten mehrere Lagen lebensfähiger Epithelzellen (Basalzellschicht, *stratum spinosum, stratum granulosum*) vorhanden sein. Die Hornschicht sollte mehrlagig sein und das zur Erzeugung einer funktionsfähigen Barriere essenzielle Lipidprofil aufweisen. Die Barriere muss robust genug sein, um das schnelle Eindringen zytotoxischer Markersubstanzen wie Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Triton X-100 zu verhindern. Die Barrierefunktion kann entweder durch Bestimmung der Konzentration, in der eine Markersubstanz die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionsdauer um 50 % verringert ($IC_{50}$), oder durch die Bestimmung der Expositionszeit bewertet werden, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Markersubstanz in einer vorgegebenen festen Konzentration um 50 % zu reduzieren ($ET_{50}$). Die Konstruktionseigenschaften des Behältnisses zum RhE-Modell muss ausschließen, dass Material rund um die Hornschicht in lebensfähiges Gewebe eindringt, was zu einer mangelhaften Modellierung der Hautexposition führen würde. Das RhE-Modell sollte nicht mit Bakterien, Viren, Mykoplasma oder Pilzen kontaminiert sein.

▼M3

*Funktionale Bedingungen*

Viabilität

17. Die Größenordnung der Viabilität wird vorzugsweise anhand des MTT-Tests bestimmt (25). Die Anwender des RhE-Modells sollten sicherstellen, dass jede Charge des verwendeten Modells die vorgegebenen Kriterien für die Negativkontrolle (NK) erfüllt. Die optische Dichte (OD) des Extraktionslösungsmittels allein sollte ausreichend gering sein, d. h. OD < 0,1. Von dem Entwickler/Hersteller des Hautmodells wird ein Akzeptanzbereich (obere und untere Grenze) für OD-Werte der Negativkontrolle (unter den gleichen Bedingungen der Prüfmethode für Hautreizungen) bereitgestellt. Die Akzeptanzbereiche für die 3 validierten Verfahren sind in Tabelle 2 aufgeführt. Es sollte dokumentiert werden, dass die mit der Negativkontrolle behandelten Gewebe über die gesamte Dauer der Exposition stabil bleiben (bzw. vergleichbare Viabilitätsmessungen ergeben).

*Tabelle 2*

**Akzeptanzbereiche für OD-Werte der Negativkontrolle**

| | Untere Akzeptanzgrenze | Obere Akzeptanzgrenze |
|---|---|---|
| EpiSkin™ (SM) | ≥ 0,6 | ≤ 1,5 |
| EpiDerm™ SIT (EPI-200) | ≥ 1,0 | ≤ 2,5 |
| SkinEthic™ RHE | ≥ 1,2 | ≤ 2,5 |

Barrierefunktion

18. Das *stratum corneum* und die Zusammensetzung seiner Fette sollten das schnelle Eindringen zytotoxischer Markersubstanzen wie z. B. SDS oder Triton X-100 verhindern. Dies wird durch die Ermittlung von $IC_{50}$ oder $ET_{50}$ bestimmt (Tabelle 3).

Morphologie

19. Bei der histologischen Untersuchung des RhE-Modells sollte nachgewiesen werden, dass das Modell eine der menschlichen *Epidermis* ähnliche Struktur (einschließlich mehrlagigem *stratum corneum*) aufweist.

Reproduzierbarkeit

20. Die Ergebnisse der Positivkontrolle (PK) und der Negativkontrollen (NK) der Prüfmethode sollen die Reproduzierbarkeit über längere Zeit belegen.

Qualitätskontrolle (QK)

21. Der Entwickler/Hersteller des RhE-Modells sollte sicherstellen und nachweisen, dass jede Charge des verwendeten Hautmodells bestimmten Freigabekriterien genügt, von denen die Kriterien der *Viabilität* (Absatz 17), der *Barrierefunktion* (Absatz 18) und der *Morphologie* (Absatz 19) die wichtigsten sind. Diese Daten sollten den Benutzern der Methode zur Verfügung gestellt werden, damit diese sie in ihre Prüfberichte aufnehmen können. Der Entwickler/Hersteller des Hautmodells (oder — bei Verwendung eines hauseigenen Modells — der Prüfer) sollte eine Akzeptanzspanne (oberer und unterer Grenzwert) für $IC_{50}$ oder $ET_{50}$ festlegen. Nur mit geeigneten Geweben erzielte Ergebnisse können für eine zuverlässige Vorhersage für die Einstufung von Reizwirkungen akzeptiert werden. Beispiele für Akzeptanzspannen für die drei validierten Verfahren sind in Tabelle 3 aufgeführt.

▼M3

*Tabelle 3*

**Beispiele für Chargenfreigabekriterien im Rahmen der Qualitätskontrolle**

| | Untere Akzeptanzgrenze | Obere Akzeptanzgrenze |
|---|---|---|
| EpiSkin™ (SM)<br>(18-stündige Behandlung mit SDS) (26) | $IC_{50}$ = 1,0 mg/ml | $IC_{50}$ = 3,0 mg/ml |
| EpiDerm™ SIT (EPI-200)<br>(1 % Triton X-100) (27) | $ET_{50}$ = 4,8 h | $ET_{50}$ = 8,7 h |
| SkinEthic™ RHE<br>(1 % Triton X-100) (28) | $ET_{50}$ = 4,0 h | $ET_{50}$ = 9,0 h |

*Applikation der Prüf- und Kontrollsubstanzen*

22. Für jede Prüfsubstanz und für die Kontrollen bei jedem Durchgang sollten mindestens drei Replikate verwendet werden. Bei flüssigen und festen Substanzen sollte eine ausreichende Menge Prüfsubstanz gleichmäßig auf die gesamte Oberfläche der *Epidermis* aufgetragen werden; überschüssige Dosen sind zu vermeiden, d. h. es sollten mindestens 25 µL/cm$^2$ oder 25 mg/cm$^2$ verwendet werden. Bei festen Stoffen sollte die *Epidermis*-Oberfläche vor der Applikation mit deionisiertem oder destilliertem Wasser angefeuchtet werden, um guten Hautkontakt zu gewährleisten. Feststoffe sollten nach Möglichkeit als Feinpulver getestet werden. Am Ende der Expositionszeit sollte die Prüfsubstanz mit wässriger Pufferlösung oder 0,9 % NaCl von der Hautoberfläche abgewaschen werden. Je nachdem, welches Modell rekonstruierter menschlicher Epidermis verwendet wird, kann die Expositionszeit 15 bis 60 Minuten betragen und die Inkubationstemperatur zwischen 20 und 37 °C liegen. Diese Expositionszeiten und -temperaturen werden für jedes RhE-Verfahren der jeweiligen Hautmodelle optimiert und bilden die Unterschiede der Verfahren dieser Prüfmethode ab. Für Einzelheiten siehe Standardarbeitsanweisungen (Standard Operating Procedures; SOP) der Methoden (26) (27) (28).

23. Bei jeder Studie sollten gleichzeitig Negativkontrollen (NK) und Positivkontrollen (PK) verwendet werden, um nachweisen zu können, dass die Viabilität (mit der NK), die Barrierefunktion und die daraus resultierende Empfindlichkeit der Gewebe (mit der PK) innerhalb einer vorgegebenen historischen Akzeptanzspanne liegen. Als PK-Substanz wird 5 % wässrige SDS empfohlen. Als NK-Substanzen empfehlen sich Wasser oder Phosphatpuffer (PBS).

*Zellviabilitätsmessungen*

24. Wichtigstes Element des Testverfahrens ist es, dass Viabilitätsmessungen nicht unmittelbar nach dem Kontakt mit den Prüfsubstanzen, sondern nach einer ausreichend langen Inkubationszeit der abgespülten Gewebe (nach der Behandlung) in einem frischen Medium erfolgen. Während dieser Zeit kann sich das Gewebe von milden zytotoxischen Wirkungen erholen bzw. deutliche zytotoxische Effekte können sich herausbilden. Während der Phase der Testoptimierung (11) (12) (13) (14) (15) hat sich eine Inkubationszeit von 42 Stunden nach der Behandlung als optimal erwiesen.

25. Der MTT-Test ist eine validierte quantitative Methode, die zur Messung der Zellviabilität nach dieser Prüfmethode angewandt werden sollte. Sie ist zur Anwendung in einem dreidimensionalen Gewebemodell geeignet. Die Gewebeprobe wird für 3 Stunden in eine MTT-Lösung geeigneter Konzentration (*z. B.* 0,3-1 mg/mL) gelegt. Der blaue Formazan-Niederschlag wird sodann mit Hilfe eines Lösungsmittels (*z. B.* Isopropanol, Säure-Isopropanol) aus dem Gewebe extrahiert, und die Formazankonzentration wird durch Bestimmung des OD-Werts bei 570 nm innerhalb einer Filter-Bandbreite von maximal ± 30 nm gemessen.

▼M3

26. Optische Eigenschaften der Prüfsubstanz oder ihre chemische Wirkung auf MTT können mit dem Test interferieren und (weil die Prüfsubstanz die Farbbildung sowohl verhindern oder auch hervorrufen kann) zu einer falschen Viabilitätsschätzung führen. Dies kann der Fall sein, wenn eine bestimmte Prüfsubstanz nicht komplett von dem Gewebe abgewaschen wurde oder wenn sie in die *Epidermis* eindringt. Wirkt sich die Prüfsubstanz unmittelbar auf MTT aus (MTT-Reduktionsmittel), ist sie natürlich gefärbt oder verfärbt sie sich während der Gewebebehandlung, so sollten zum Nachweis und zur Korrektur einer etwaigen Interferenz der Prüfsubstanz mit der Viabilitätsmesstechnik zusätzliche Kontrollen verwendet werden. Für eine genaue Beschreibung der richtigen Durchführung der Korrektur der direkten MTT-Reduktion und der Interferenzen durch Färbemittel siehe die Standardarbeitsanweisungen für die drei validierten Methoden (26) (27) (28).

*Akzeptanzkriterien*

27. Bei jeder Prüfung mit validen Chargen des betreffenden RhE-Modells (siehe Absatz 21) sollten mit der Negativkontrolle behandelte Gewebe OD-Werte aufweisen, die die Gewebequalität nach abgeschlossenen Beförderungs- und Annahmevorgängen und sämtlichen Schritten des Protokolls belegen. Die OD-Werte der Kontrollen sollten nicht unter historisch etablierten unteren Grenzwerten liegen. Gleichzeitig sollten mit der Positivkontrolle, d. h. 5 % wässrige SDS, behandelte Gewebe die Fähigkeit der Gewebe reflektieren, unter den Bedingungen der Prüfmethode auf hautreizende Chemikalien zu reagieren (26) (27) (28). Es sollten entsprechende und geeignete Maße der Variabilität zwischen Gewebereplikaten festgelegt werden (werden z. B. Standardabweichungen (SD) verwendet, sollten sie innerhalb des aufgrund historischer Daten berechneten einseitigen Toleranzintervalls von 95 % liegen; für die VRM gilt, dass die SD < 18 % betragen sollen).

*Auswertung der Ergebnisse und Prädiktionsmodell*

28. Die für jede Prüfsubstanz erhaltenen OD-Werte können zur Berechnung einer prozentualen Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle, die auf 100 % festgesetzt ist, herangezogen werden. Der Grenzwert der prozentualen Zellviabilität, der zwischen Reizstoff und bisher nicht klassifizierten Prüfsubstanzen unterscheidet, und das (die) statistische(n) Verfahren zur Auswertung der Ergebnisse und zur Identifizierung von Reizstoffen sollten genau definiert und dokumentiert werden und nachweislich geeignet sein. Die Grenzwerte für die Vorhersage der Reizung sind nachstehend angegeben:

— Die Prüfsubstanz gilt als hautreizend im Sinne von UN GHS/EU CLP Kategorie 2, wenn die Gewebeviabilität nach der Exposition und der Inkubation nach der Behandlung weniger als oder gleich (≤) 50 % beträgt.

— Je nach dem regulatorischen Rahmen, in dem die Ergebnisse dieser Prüfmethode verwendet werden, gilt die Prüfsubstanz als nicht hautreizend im Sinne der Einstufung *Keine Kategorie* nach UN GHS/EU CLP, wenn die Gewebeviabilität nach der Exposition und der Inkubation nach der Behandlung mehr als (>) 50 % beträgt.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

*Daten*

29. Für jeden Durchgang sollten Daten aus einzelnen Replikatgeweben (*z. B.* OD-Werte und Daten über die berechnete prozentuale Zellviabilität für jede Prüfsubstanz, einschließlich Einstufung), gegebenenfalls auch Daten aus Wiederholungsversuchen, tabellarisch zusammengefasst werden. Darüber hinaus sollten für jeden Durchgang die Mittelwerte ± Standardabweichung übermittelt werden. Außerdem sollten für jede geprüfte Substanz festgestellte Interaktionen mit dem MTT-Reagens und Testfarbstoffen berichtet werden.

▼**M3**

*Prüfbericht*

30. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüf- und Kontrollsubstanzen:

— Chemische Bezeichnung(en) wie CAS-Bezeichnung und CAS-Nummer, EG-Name und EG-Nummer, soweit bekannt;

— Reinheit und Zusammensetzung der Substanz (in Gewichtsprozent);

— physikalisch-chemische Eigenschaften (*z. B.* Aggregatzustand, Stabilität, Flüchtigkeit, pH-Wert, Wasserlöslichkeit, soweit bekannt), die für die Durchführung der Studie relevant sind;

— Behandlung der Prüf-/Kontrollsubstanzen vor dem Test, sofern relevant (*z. B.* Erwärmen, Mahlen);

— Lagerbedingungen;

Gründe für die Verwendung des betreffenden Hautmodells und Protokolle

Prüfbedingungen:

— Verwendetes Zellsystem;

— umfassende Begleitdokumentation für das betreffende Hautmodell, einschließlich seiner Leistung. Diese sollte unter anderem die folgenden Aspekte beinhalten:

  i) Viabilität

  ii) Barrierefunktion

  iii) Morphologie

  iv) Reproduzierbarkeit und Prädiktivität

  v) Qualitätskontrollen (QK) des Modells

— Einzelheiten der angewandten Methode;

— verwendete Testdosen, Dauer der Exposition und der Inkubationszeit nach der Behandlung;

— Beschreibung etwaiger Änderungen im Prüfverfahren;

— Verweis auf historische Modelldaten. Diese sollte unter anderem die folgenden Aspekte beinhalten:

  i) Akzeptanz der QK-Daten mit Verweis auf historische Chargendaten

  ii) Akzeptanz der Positiv- und Negativkontrollwerte mit Verweis auf die Mittelwerte und Spannbreiten der Positiv- und Negativkontrollen

— Beschreibung der angewandten Auswertungskriterien, einschließlich Begründung der Wahl des (der) Schwellenwerte(s) für das Vorhersagemodell;

— Verweis auf historische Kontrolldaten.

▼M3

Ergebnisse:

— Tabellarische Darstellung der Daten aus Einzelproben für jeden Durchgang und jede Replikatmessung;

— Angabe verwendeter Kontrollen für direkte MTT-Reduktionsmittel und/oder Testfarbstoffe;

— Beschreibung sonstiger beobachteter Wirkungen.

Diskussion der Ergebnisse

Schlussfolgerung

LITERATUR

(1) Globales Harmonisiertes System (GHS) zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN) 2009, dritte überarbeitete Fassung, UN New York und Genf. Abrufbar unter: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) EC-ECVAM (2009), Statement on the „Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards“, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(3) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG, und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1.

(4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE). Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765–770.

▼M3

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests — An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., mailto: Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto: Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.

(17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy — Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.

(20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

(24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231-243.

▼**M3**

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min — 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Richtlinie 2001/59/EG der Kommission vom 6. August 2001 zur 28. Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt, ABl. L 225 vom 21.8.2001, S. 1.

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1-4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal*in vivo* data, ALTEX, 14, 359-365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109-116.

▼M3

*Anlage 1*

**Begriffsbestimmungen**

*Genauigkeit:* Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (9).

*Zellviabilität:* Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellpopulation, z. B. Fähigkeit zellulärer mitochondrialer Dehydrogenasen, den Vitalfarbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl-Blau) zu reduzieren, der je nach gemessenem Endpunkt und angewandtem Testkonzept der Gesamtzahl und/oder der Vitalität lebender Zellen entspricht.

*Übereinstimmung:* Die Übereinstimmung ist ein Maß der Leistung einer Prüfmethode für Prüfverfahren mit kategorialen Ergebnissen und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird gleichbedeutend mit Genauigkeit verwendet und wird als Anteil aller geprüften Chemikalien definiert, die korrekt als positiv oder negativ eingestuft werden. (9).

*$ET_{50}$:* Die Expositionszeit, die erforderlich ist, um die Zellviabilität bei Anwendung der Markersubstanz in vorgegebener fester Konzentration um 50 % zu reduzieren, siehe auch $IC_{50}$.

*EU CLP (Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen):* führt das UN GHS-System über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Chemikalien (Stoffe und Gemische) in der Europäischen Union ein (3).

*GHS (Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien der Vereinten Nationen (UN)):* Ein System zur Klassifizierung von Substanzen und Gemischen nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenbögen, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (1).

*$IC_{50}$:* Die Konzentration, bei der eine Markersubstanz die Viabilität der Gewebe nach einer vorgegebenen Expositionszeit um 50 % ($IC_{50}$) reduziert, siehe auch $ET_{50}$.

*Überschüssige Dosis:* Die Menge der auf die Haut aufgetragenen Prüfsubstanz, die über die zur vollständigen und gleichmäßigen Bedeckung der Hautoberfläche erforderliche Menge hinausgeht.

*Me-too-Test:* Umgangssprachliche Bezeichnung einer Prüfmethode, die strukturell und funktionell mit einer validierten und akzeptierten Referenzprüfmethode vergleichbar ist. Eine solche Prüfmethode käme für die Catch-up-Validierung in Frage. Gleichbedeutend mit vergleichbarer Prüfmethode verwendet (9).

*Leistungsstandards (PS):* Auf einer validierten Prüfmethode beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Prüfmethode bewertet werden kann. Sie umfassen (i) wesentliche Elemente der Prüfmethode; (ii) ein Mindestverzeichnis von Referenzsubstanzen, ausgewählt aus den Substanzen, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden; und (iii) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die die vorgeschlagene Prüfmethode bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzsubstanzen demonstrieren sollte (9).

*Referenzsubstanzen:* Chemikalien, die zur Verwendung im Validierungsprozess ausgewählt werden und für die die Reaktionen innerhalb des *in vitro*- oder *in vivo*-Referenztestsystems oder der untersuchten Spezies bereits bekannt sind. Diese Chemikalien sollten repräsentativ für die Chemikalienklassen sein, für die die Prüfmethode voraussichtlich verwendet werden soll; ferner sollten sie die ganze Bandbreite an Reaktionen abdecken, die von den Zielchemikalien erwartet werden kann — von stark über schwach bis negativ. Für die unterschiedlichen Stadien des Validierungsprozesses, für verschiedene Prüfmethoden und Testverwendungen können unterschiedliche Reihen von Referenzchemikalien benötigt werden (9).

▼**M3**

*Relevanz:* Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen dem Test und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem der Test die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) einer Prüfmethode ein (9).

*Zuverlässigkeit:* Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit der Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (9).

*Ersatztest:* Ein Test der einen routinemäßig angewandten Test zur Identifikation von Gefahren und/oder zur Risikobewertung ersetzen soll, und der im Vergleich zu dem akzeptierten Test nachweislich in allen möglichen Prüfsituationen und mit allen Stoffen einen gleichwertigen oder besseren Schutz der Gesundheit von Mensch oder Tier oder der Umwelt gewährleistet, je nachdem, was zutrifft (9).

*Sensitivität:* Der Anteil aller positiven/wirkenden Prüfsubstanzen, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

*Hautreizung:* Das Auslösen einer reversiblen Hautschädigung nach Applikation einer Prüfsubstanz für die Dauer von bis zu 4 Stunden. Eine Hautreizung ist eine lokal auftretende, nicht immunogene Reaktion, die kurz nach der Stimulation eintritt (29). Ihr Hauptmerkmal ist ihr umkehrbarer Prozess, der mit Entzündungsreaktionen und den bei Entzündungen gängigsten klinischen Reizsymptomen (Erythema, Ödeme, Juckreiz und Schmerzen) einhergeht.

*Spezifizität:* Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Prüfsubstanzen, die durch den Test korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit einer Prüfmethode mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung ihrer Relevanz (9).

*Sequenzielle Teststrategie:* Teststrategie, in der Prüfmethoden in aufeinanderfolgender Weise eingesetzt werden; dabei werden die in jeder folgenden Stufe gewählten Prüfmethoden auf der Grundlage der in früheren Stufen erzielten Ergebnisse ausgewählt (9).

*Prüfchemikalie (auch Prüfsubstanz):* Jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

▼M3

*Anlage 2*

**Leistungsstandards zur Bewertung vorgeschlagener vergleichbarer oder modifizierter Prüfmethoden für die Hautreizung, die auf *in vitro* rekonstruierter humaner E*pidermis* beruhen (RhE)**

EINLEITUNG

1. Ziel der Leistungsstandards (Performance Standards; PS) ist es, die Grundlage zu vermitteln, auf der neue Methoden, seien diese geschützt (d. h. per Urheberrecht, Handelsmarken, eingetragene Marken) oder nicht geschützt, als ausreichend genau und zuverlässig für spezifische Prüfzwecke beurteilt werden können. Diese auf validierten und akzeptierten Methoden basierenden Leistungsstandards können auch verwendet werden, um die Zuverlässigkeit und Genauigkeit anderer analoger Methoden (umgangssprachlich als „Me-too"-Tests bezeichnet) zu bewerten, die auf ähnlichen wissenschaftlichen Prinzipien beruhen und denselben biologischen oder toxischen Effekt messen oder vorhersagen (9).

2. Vor der Anerkennung modifizierter Methoden (d. h. vorgeschlagener potenzieller Verbesserungen einer anerkennten Prüfmethode) sollten die Auswirkung der vorgeschlagenen Änderungen auf die Leistung des Tests, sowie das Maß in dem Änderungen die verfügbare Information für andere Elemente des Validierungsprozesses beeinflusst, bewertet werden. Je nach Anzahl und Art der vorgeschlagenen Änderungen, den generierten Daten und der Begleitdokumentation für diese Änderungen, sollten sie entweder dem für neue Tests beschriebenen Validierungsprozess, oder — gegebenenfalls — einer begrenzten Zuverlässigkeits- und Relevanzprüfung nach etablierten Leistungsstandards unterzogen werden (9).

3. Vergleichbare (Me-too-) oder modifizierte Verfahren in Bezug auf die drei validierten Verfahren [EpiSkin™ (Validierte Referenzmethode; VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) und SkinEthic™ RHE], deren Verwendung in der vorliegenden Prüfmethode empfohlen wird, sollten anhand von Chemikalien, die die volle Bandbreite der Draize-Reizstufen repräsentieren, auf ihre Zuverlässigkeit und Genauigkeit untersucht werden. Vorgeschlagene vergleichbare oder modifizierte Methoden, die mittels der 20 empfohlenen Referenzsubstanzen der Leistungsstandards (Tabelle 1) bewertet werden, sollten Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte haben, die die Werte nach der VRM (Tabelle 2) erreichen oder übertreffen (2) 16). Die Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte, die erreicht werden sollten, sind in den Absätzen 8 bis 12 dieser Anlage aufgeführt. Nicht eingestufte chemische Stoffe (UN GHS/EU CLP Keine Kategorie) und eingestufte chemische Stoffe der Kategorie 2 (UN GHS/EU CLP) (1), die unterschiedliche chemische Klassen bilden, werden ebenfalls einbezogen, so dass Zuverlässigkeit und Genauigkeit (Empfindlichkeit, Spezifizität und Gesamtgenauigkeit) der vorgeschlagenen Methode mit der der validierten Referenzmethode verglichen werden können. Die Zuverlässigkeit der Methode sowie ihre Fähigkeit, Reizstoffe der UN GHS/EU CLP Kategorie 2 korrekt einzustufen, und — je nach dem regulatorischen Rahmen, für den die Daten erzeugt werden — ebenso ihre Fähigkeit, chemische Stoffe mit der Einstufung Keine Kategorie nach UN GHS/EU CLP korrekt einzustufen, sollte vor ihrer Verwendung zum Testen neuer Prüfsubstanzen nachgewiesen werden.

4. Diese Leistungsstandards basieren auf den EC-ECVAM Leistungsstandards (8), aktualisiert nach den UN GHS- und EU CLP-Systemen zur Einstufung und Kennzeichnung (1) (3). Die ursprünglichen Leistungsstandards wurden nach Abschluss der Validierungsstudie (21) festgelegt und beruhen auf dem Einstufungssystem der EU gemäß der Richtlinie 2001/59/EG der Kommission vom 6. August 2001 zur 28. Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt ([1]). Infolge der Annahme des

([1]) ABl. L 225 vom 21.8.2001, S. 1.

▼M3

UN GHS-Systems für die Einstufung und Kennzeichnung durch die EU (EU CLP) (3), die zwischen der Finalisierung der Validierungsstudie und dem Abschluss dieser Prüfmethode erfolgte, wurden die Leistungsstandards aktualisiert (8). Diese Überarbeitung bezieht sich hauptsächlich auf Änderungen (i) der Reihe der Referenzsubstanzen für die Leistungsstandards und (ii) der vorgegebenen Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte (2) (23).

LEISTUNGSSTANDARDS FÜR PRÜFMETHODEN ANHAND VON *IN VITRO* REKONSTRUIERTEN MODELLEN MENSCHLICHER EPIDERMIS ZUR BEWERTUNG DER HAUTREIZUNG

5. Die Leistungsstandards umfassen die folgenden drei Elemente (9):

I) Wesentliche Elemente der Prüfmethode

II) Mindestliste der Referenzsubstanzen

III) Vorgegebene Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte

I) **Wesentliche Elemente der Prüfmethode**

6. Diese bestehen aus wesentlichen strukturellen, funktionellen und verfahrenstechnischen Elementen einer validierten Methode, die in das Protokoll einer vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell vergleichbaren oder modifizierten Methode aufgenommen werden sollten. Diese Elemente beinhalten spezifische Merkmale der Methode, kritische verfahrenstechnische Angaben sowie Maßnahmen zur Qualitätskontrolle. Die Einhaltung der wesentlichen Elemente der Prüfmethode trägt dazu bei, zu gewährleisten, dass eine vorgeschlagene vergleichbare oder modifizierte Methode auf denselben Konzepten beruht wie die entsprechende validierte Referenzmethode (9). Die wesentlichen Elemente der Prüfmethode sind ausführlich in den Absätzen 16 bis 21 der Prüfmethode beschrieben. Die Tests sollten unter Einhaltung der folgenden Bestandteile erfolgen:

— Allgemeine Bedingungen (Absatz 16)

— Funktionelle Bedingungen, darunter:

— Viabilität (Absatz 17);

— Barrierefunktion (Absatz 18);

— Morphologie (Absatz 19);

— Reproduzierbarkeit (Absatz 20) und

— Qualitätskontrolle (Absatz 21)

II) **Mindestliste der Referenzsubstanzen**

7. Referenzsubstanzen werden genutzt, um festzustellen, ob Zuverlässigkeit und Genauigkeit eines vorgeschlagenen vergleichbaren oder modifizierten Verfahrens, das in Struktur und Funktion nachweislich mit der VRM vergleichbar ist oder sich geringfügig von einer der drei validierten Verfahren unterscheidet, mit denen der VRM vergleichbar oder besser sind (2) (8) (16) (23). Die in Tabelle 1 aufgeführten 20 empfohlenen Referenzsubstanzen umfassen Stoffe aus unterschiedlichen chemischen Klassen (d. h. chemischen Kategorien auf der Basis funktioneller Gruppen) und repräsentieren die volle Bandbreite der Draize-Reizstufen (von nicht reizend bis stark reizend). Die in dieser Liste enthaltenen Stoffe umfassen 10 Chemikalien der UN GHS/EU CLP Kategorie 2 und 10 nicht kategorisierte Chemikalien, darunter 3 Stoffe der optionalen UN GHS Kategorie 3. Im Rahmen dieser Prüfmethode wird die optionale UN GHS Kategorie 3 als Keine Kategorie bezeichnet. Die in Tabelle 1 aufgeführten Chemikalien werden im Hinblick auf Funktionalität und Aggregatzustand unter den Stoffen ausgewählt, die in der Optimierungsphase nach der Prävalidierung, sowie in der Validierungsstudie der VRM verwendet wurden (14) (18). Diese Referenzsubstanzen bilden die Mindestzahl an Chemikalien, die zur Bewertung der Genauigkeit

▼M3

und Zuverlässigkeit einer vorgeschlagenen vergleichbaren oder modifizierten Methode herangezogen werden sollten. Sie sollten jedoch nicht zur Entwicklung neuer Methoden verwendet werden. Sollte ein aufgeführter chemischer Stoff nicht verfügbar sein, können andere Substanzen verwendet werden, für die angemessene *in vivo*-Referenzdaten vorliegen. Diese sind vorzugsweise unter den Stoffen auszuwählen, die in der Optimierungsphase nach der Prävalidierung, oder in der Validierungsstudie der VRM verwendet wurden. Um die Genauigkeit der vorgeschlagenen Methode weitergehend zu bewerten, kann die Mindestliste der Referenzsubstanzen auf Wunsch um zusätzliche Chemikalien anderer chemischer Klassen erweitert werden, sofern für diese entsprechende *in vivo*-Referenzdaten vorliegen.

*Tabelle 1*

**Mindestliste der Referenzsubstanzen für die Bestimmung der Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte für vergleichbare oder modifizierte Verfahren zur Untersuchung von Hautreizungen auf der Grundlage von RhE-Modellen** [1]

| Substanz | CAS-Nummer | Aggregatzustand | *In vivo*-Punktzahl | VRM *in vitro* Kat. | UN GHS/EU CLP *in vivo* Kat. |
|---|---|---|---|---|---|
| 1-Bromo-4-chlorobutan | 6940-78-9 | Flüssig | 0 | Kat. 2 | Keine Kat. |
| Diethylphthalat | 84-66-2 | Flüssig | 0 | Keine Kat. | Keine Kat. |
| Naphthalen-Essigsäure | 86-87-3 | Fest | 0 | Keine Kat. | Keine Kat. |
| Allylphenoxyacetat | 7493-74-5 | Flüssig | 0,3 | Keine Kat. | Keine Kat. |
| Isopropanol | 67-63-0 | Flüssig | 0,3 | Keine Kat. | Keine Kat. |
| 4-Methylthiobenzaldehyd | 3446-89-7 | Flüssig | 1 | Kat. 2 | Keine Kat. |
| Methylstearat | 112-61-8 | Fest | 1 | Keine Kat. | Keine Kat. |
| Heptyl-Butyrat | 5870-93-9 | Flüssig | 1,7 | Keine Kat. | Keine Kat. |
| Hexyl-Salicylat | 6259-76-3 | Flüssig | 2 | Keine Kat. | Keine Kat. |
| Cinnamaldehyd | 104-55-2 | Flüssig | 2 | Kat. 2 | Keine Kat. *(wahlfrei Kat.3)* [3] |
| *1-Decanol* [2] | *112-30-1* | *Flüssig* | *2,3* | *Kat. 2* | *Kat. 2* |
| Cyclamenaldehyd | 103-95-7 | Flüssig | 2,3 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| 1-Bromohexan | 111-25-1 | Flüssig | 2,7 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| 2-Chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridin HCl | 86604-75-3 | Fest | 2,7 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| *Di-n-Propyldisulphid* [2] | *629-19-6* | *Flüssig* | *3* | *Keine Kat.* | *Kat. 2* |
| Kaliumhydroxid (5 % aq.) | 1310-58-3 | Flüssig | 3 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| Benzenethiol, 5-(1,1-Dimethylethyl)-2-methyl | 7340-90-1 | Flüssig | 3,3 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| 1-Methyl-3-phenyl-1-piperazin; | 5271-27-2 | Fest | 3,3 | Kat. 2 | Kat. 2 |

▼M3

| Substanz | CAS-Nummer | Aggregatzustand | *In vivo*-Punktzahl | VRM *in vitro* Kat. | UN GHS/EU CLP *in vivo* Kat. |
|---|---|---|---|---|---|
| Heptanal | 111-71-7 | Flüssig | 3,4 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| Tetrachloroethylen | 127-18-4 | Flüssig | 4 | Kat. 2 | Kat. 2 |

([1]) Die Auswahl der Chemikalien basiert auf den folgenden Kriterien: i) die Substanzen sind im Handel erhältlich; ii) sie repräsentieren die volle Bandbreite der Draize-Reizstufen (von nicht reizend bis stark reizend); iii) sie haben eine klar definierte chemische Struktur; iv) sie sind repräsentativ für die im Validierungsprozess verwendete chemische Funktionalität, v) sie weisen kein extrem toxisches Profil auf (*z. B.* krebserregend oder toxisch für das Reproduktionssystem) und sie sind nicht mit unerschwinglichen Entsorgungskosten verbunden.

([2]) Chemische Stoffe, die beim Kaninchen reizend sind, deren nicht reizende Wirkung beim Menschen jedoch zuverlässig nachgewiesen wurde (31) (32) (33).

([3]) Nach dem UN GHS, nicht im EU CLP.

III) **Vorgegebene Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte**

8. Zur Bewertung der Zuverlässigkeit und Relevanz vorgeschlagener vergleichbarer oder modifizierter Verfahren, die zwischen einzelnen Laboratorien ausgetauscht werden sollen, müssen alle 20 Referenzsubstanzen in Tabelle 1 in mindestens drei Laboratorien getestet werden. Wenn die vorgeschlagene Methode allerdings nur in einem einzigen Labor verwendet werden soll, sind Prüfungen in mehreren Laboratorien zu Validierungszwecken nicht erforderlich. Wesentlich ist jedoch, dass solche Validierungsstudien unabhängig von internationalen Validierungsstellen in Übereinstimmung mit internationalen Leitlinien bewertet werden (9). In jedem Labor sollten alle 20 Referenzsubstanzen in drei unabhängigen Durchgängen mit unterschiedlichen Gewebechargen und zu ausreichend weit auseinander liegenden Zeitpunkten getestet werden. Jeder Durchgang sollte mindestens drei gleichzeitig getestete Gewebereplikate für jede in der Prüfung enthaltene Prüfsubstanz, sowie Negativkontrolle und Positivkontrolle, umfassen.

9. Die Berechnung der Zuverlässigkeits- und Genauigkeitswerte des vorgeschlagenen Verfahrens sollte unter Berücksichtigung aller vier unten genannten Kriterien erfolgen, wobei sicherzustellen ist, dass die Zuverlässigkeits- und Relevanzwerte auf vorgegebene und gleichbleibende Weise berechnet werden:

   1. Nur die Daten von vollständigen Durchgangsfolgen kommen für die Berechnung der Intra- und Inter-Labor-Variabilität und für die Vorhersagefähigkeit (Genauigkeit) in Frage.

   2. Die abschließende Einstufung für alle Referenzsubstanzen in jedem teilnehmenden Labor sollte ermittelt werden, indem bei sämtlichen Durchgängen einer vollständigen Durchgangsfolge der mittlere Viabilitätswert zugrunde gelegt wird.

   3. Nur die ermittelten Daten für Substanzen mit vollständigen Durchgangsfolgen in allen teilnehmenden Laboratorien kommen für die Berechnung der Inter-Labor-Variabilität in Frage.

   4. Die Berechnung der Genauigkeitswerte sollte auf der Grundlage der individuellen Laborvorhersagen für die 20 Referenzsubstanzen durch die unterschiedlichen teilnehmenden Laboratorien erfolgen.

   In diesem Zusammenhang besteht eine **Durchgangsfolge** aus drei unabhängigen Durchgängen eines Labors für eine Prüfsubstanz. Eine **vollständige Durchgangsfolge** ist eine Durchgangsfolge eines Labors für eine Prüfsubstanz, in der alle drei Durchgänge gültig sind. Das bedeutet, dass jeder einzelne ungültige Durchgang eine ganze Durchgangsfolge von drei Durchgängen ungültig macht.

*Laborinterne Reproduzierbarkeit*

10. Bei der Bewertung der laborinternen Reproduzierbarkeit sollte die Übereinstimmung der Einstufungen (UN GHS/EU CLP Kategorie 2 und *Keine Kategorie*), aus unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Testdurchgängen innerhalb eines Labors mit den 20 Referenzsubstanzen ermittelt, gleich oder höher (≥) 90 % sein.

▼M3

*Inter-Labor-Reproduzierbarkeit*

11. Eine Bewertung der Inter-Labor-Reproduzierbarkeit ist nicht erforderlich, wenn die vorgeschlagene Methode nur in einem einzigen Labor verwendet werden soll. Für Methoden, die zwischen Laboratorien ausgetauscht werden sollen, sollte die Übereinstimmung zwischen den Einstufungen (UN GHS/EU CLP Kategorie 2 und Keine Kategorie) aus unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Testdurchgängen mit den 20 Referenzsubstanzen, die vorzugsweise in mindestens drei Laboratorien durchgeführt wurden, zwischen diesen Laboratorien gleich oder höher (≥) 80 % sein.

*Vorhersagefähigkeit (Genauigkeit)*

12. Die Genauigkeit (Sensitivität, Spezifizität und Gesamtgenauigkeit) der vorgeschlagenen vergleichbaren oder modifizierten Methode sollte die der validierten Referenzmethode erreichen oder übertreffen, wobei auch zusätzliche Informationen zur Relevanz für die betreffende Spezies zu berücksichtigen sind (Tabelle 2). Die Sensitivität sollte gleich oder höher (≥) 80 % sein (2) (8) (23). Eine weitere spezifische Einschränkung gilt allerdings für die Sensitivität der vorgeschlagenen *in vitro*-Methode insofern, als nur zwei Chemikalien der *in vivo*-Kategorie 2, *1-Decanol* und *D-n-propyldisulphid,* von mehr als einem teilnehmenden Labor als *Keine Kategorie* fehleingestuft werden dürfen. Die Spezifizität sollte gleich oder höher (≥) 70 % sein (2) (8) (23). Es gibt keine weitere Einschränkung für die Spezifizität der vorgeschlagenen *in vitro*-Methode, d. h. jedes teilnehmende Labor kann jede Chemikalie mit der in vivo Einstufung *Keine Kategorie* fehleinstufen, solange die Endspezifizität der Prüfmethode innerhalb der akzeptablen Bandbreite liegt. Die Gesamtgenauigkeit sollte gleich oder höher (≥) 75 % sein (2) (8) (23). Obwohl die Empfindlichkeit der validierten Referenzmethode für die in Tabelle 1 aufgeführten 20 Referenzsubstanzen gleich 90 % ist, wird der vorgegebene minimale Empfindlichkeitswert, der erreicht werden muss, damit ein vergleichbares oder modifiziertes Verfahren als valide angesehen werden kann, auf 80 % festgelegt, da sowohl *1-Decanol* (eine Grenzchemikalie) als auch *Di-n-propyldisulphid* (ein falsch negatives Ergebnis der VRM) als nicht reizend beim Menschen bekannt sind (31) (32) (33), obgleich sie im Kaninchentest als Reizstoffe eingestuft wurden. Da rekonstruierte Modelle menschlicher Epidermis auf Zellen menschlichen Ursprungs basieren, können sie die nicht reizenden Eigenschaften dieser Chemikalien vorhersagen (UN GHS/EU CLP Keine Kategorie).

*Tabelle 2*

**Für die Gültigkeit einer vergleichbaren oder modifizierten Methode benötigte prädiktive Werte im Hinblick auf Empfindlichkeit, Spezifizität und Gesamtgenauigkeit.**

| Empfindlichkeit | Spezifizität | Gesamtgenauigkeit |
|---|---|---|
| ≥ 80 % | ≥ 70 % | ≥ 75 % |

*Akzeptanzkriterien der Studie*

13. Es ist möglich, dass einer oder mehrere Tests im Zusammenhang mit einer oder mehreren Prüfsubstanzen die Akzeptanzkriterien für die Prüf- und Kontrollsubstanzen nicht erfüllt/erfüllen oder aus anderen Gründen nicht akzeptabel ist/sind. Um fehlende Daten zu ergänzen, sind für jede Prüfsubstanz maximal zwei zusätzliche Prüfungen zulässig („Erneute Prüfung“). Genauer gesagt, da im Fall einer erneuten Prüfung auch PK und NK gleichzeitig getestet werden müssen, dürfen maximal zwei zusätzliche Durchgänge für jede Prüfsubstanz durchgeführt werden.

14. Möglicherweise wird selbst nach der erneuten Prüfung die für jede Prüfsubstanz vorgeschriebene Mindestzahl von drei gültigen Durchgängen nicht für jede Referenzsubstanz in jedem beteiligten Labor erreicht, was zu einer unvollständigen Datenmatrix führen würde. In solchen Fällen sollten alle folgenden drei Kriterien erfüllt werden, damit die Datensätze akzeptiert werden können:

    1. Alle 20 Referenzsubstanzen sollten mindestens eine vollständige Durchgangsfolge haben.

▼**M3**

2. In jedem der mindestens drei teilnehmenden Laboratorien müssen mindestens 85 % der Durchgangsfolgen vollständig sein (für 20 Chemikalien; d. h. in einem einzelnen Labor sind 3 ungültige Durchgangsfolgen zulässig).

3. Mindestens 90 % aller möglichen Durchgangsfolgen aus mindestens drei Laboratorien müssen vollständig sein (für 20 Chemikalien, die in 3 Laboratorien geprüft werden; d. h. insgesamt sind 6 ungültige Durchgangsfolgen zulässig).

▼M2

B. 47 **TRÜBUNGS- UND DURCHLÄSSIGKEITSTEST AN DER ISOLIERTEN RINDERHORNHAUT ZWECKS IDENTIFIZIERUNG VON STOFFEN MIT AUGENVERÄTZENDER UND STARK AUGENREIZENDER WIRKUNG**

EINLEITUNG

1. Der Trübungs- und Durchlässigkeitstest an der isolierten Rinderhornhaut (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*, BCOP) ist eine *In-vitro*-Prüfmethode, die unter bestimmten Bedingungen und mit bestimmten Grenzen eingesetzt werden kann, um Stoffe und Gemische als Stoffe und Gemische mit „augenverätzender und stark augenreizender Wirkung“ (1) (2) (3) einzustufen. Für die Zwecke dieser Prüfmethode sind Stoffe mit starker Reizwirkung Stoffe, welche Augenläsionen verursachen, die beim Kaninchen nach der Applikation mindestens 21 Tage lang anhalten. Auch wenn der Test den *In-vivo*-Kaninchenaugentest nicht absolut ersetzen kann, wird der BCOP innerhalb eines spezifischen Anwendungsbereichs dennoch als Teil einer gestuften Prüfstrategie zur vorschriftsmäßigen Einstufung und Kennzeichnung empfohlen (4) (5). Prüfsubstanzen und –gemische (6) können als augenverätzend oder stark augenreizend eingestuft werden, ohne dass weitere Tests am lebenden Kaninchen erforderlich sind. Eine Prüfsubstanz mit negativem Testergebnis müsste allerdings nach einer sequenziellen Prüfstrategie, wie in der OECD-Testrichtlinie 405 (7) (Kapitel B. 5 dieses Anhangs) dargelegt, am Kaninchen getestet werden.

2. Diese Prüfmethode beschreibt die Verfahrensschritte für die Beurteilung des augenverätzenden oder stark augenreizenden Potenzials einer Prüfsubstanz, gemessen als seine Fähigkeit, bei isolierten Rinderhornhäuten Trübungs- und verstärkte Durchlässigkeitseffekte hervorzurufen. Toxische Effekte für die Hornhaut sind messbar durch i) verminderte Lichtübertragung (Trübung) und ii) den verstärkten Durchtritt von Fluorescein-Natrium-Farbstoff (Durchlässigkeit). Die Trübungs- und Durchlässigkeitsbewertungen der Hornhaut nach Applikation einer Prüfsubstanz ergeben in Kombination einen *In-Vitro*-Reizwert (*In Vitro* Irritancy Score, IVIS), der für die Einstufung des Reizpotenzials der Prüfsubstanz maßgeblich ist.

3. Augenreizende Stoffe, die Läsionen hervorrufen, die in weniger als 21 Tagen abklingen, sowie Stoffe ohne Reizwirkung wurden ebenfalls nach der BCOP-Methode untersucht. Die Genauigkeit und Zuverlässigkeit des BCOP bei Stoffen dieser Kategorien wurden jedoch nicht offiziell evaluiert.

4. Für Definitionen siehe Anlage 1.

VORBEMERKUNGEN UND EINSATZGRENZEN

5. Diese Prüfmethode basiert auf dem BCOP-Testprotokoll des Organisationsübergreifenden Koordinationsausschusses zur Validierung alternativer Methoden (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) (8), das im Anschluss an eine internationale Validierungsstudie (4)(5)(9) und unter Mitwirkung des Europäischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, (ECVAM) und des Japanischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM) entwickelt wurde. Das Protokoll beruht auf Informationen des Instituts für *In-vitro*-Forschung (*Institute for In Vitro Sciences*, IIVS) und auf dem INVITTOX-Protokoll 124 (10), das für die von der Europäischen Gemeinschaft finanzierte BCOP-Prävalidierungsstudie aus den Jahren 1997-1998 herangezogen wurde. Beide Protokolle beruhen auf der BCOP-Prüfmethodik, wie sie von Gautheron *et al.* (11) erstmals beschrieben wurde.

▼M2

6. Die anerkannten Einsatzgrenzen dieser Prüfmethode beruhen auf den aus den Validierungsdaten hervorgehenden hohen Falsch-Positiv-Raten für Alkohole und Ketone und der hohen Falsch-Negativ-Rate für Feststoffe (siehe Punkt 44) (5). Durch Ausschluss von Stoffen dieser chemischen und physikalischen Klassen aus der Datenbank lässt sich die Genauigkeit des BCOP in allen Klassifizierungssystemen (EU, EPA und GHS) erheblich verbessern (5). Für die Zwecke dieser Prüfung (d. h. ausschließliche Identifizierung augenverätzender/stark augenreizender Stoffe) sind Falsch-Negativ-Raten nicht maßgeblich, da diese Stoffe anschließend an Kaninchen oder - je nach Vorschriften - im Rahmen anderer angemessen validierter *In-vitro*-Tests nach einer sequenziellen Prüfstrategie mit einem evidenzbasierten Bewertungsansatz (*weight of evidence approach*) getestet werden. Außerdem konnten bestimmte Chemikalien- oder Produktklassen (z. B. Gemische) mit den derzeitigen Validierungsdaten nicht angemessen evaluiert werden. Prüfer könnten diese Prüfmethode jedoch für alle Arten von Prüfmaterial (auch Gemische) einsetzen und ein Positivergebnis als Indikator einer augenverätzenden oder stark augenreizenden Wirkung akzeptieren. Positivergebnisse bei Verwendung von Alkohol oder Ketonen sollten angesichts des Risikos von Falsch-Positiv-Prognosen (*over-prediction*) jedoch mit einer gewissen Zurückhaltung interpretiert werden.

7. Bei allen Verfahren, die Rinderaugen und Rinderhornhäute involvieren, sollten die geltenden Regeln und Verfahrensvorschriften der Prüfanstalt für den Umgang mit Tiermaterial eingehalten werden, das auch Gewebe und Gewebeflüssigkeiten umfasst, jedoch nicht darauf beschränkt ist. Universelle Laborregeln sollten beachtet werden (12).

8. Eine Grenze der Prüfmethode liegt darin, dass, obgleich zwar einige der im Kaninchenaugentest evaluierten Reizwirkungen und bis zu einem gewissen Grad auch deren Schwere berücksichtigt werden, Bindehaut- und Irisverletzungen außer Acht gelassen werden. Auch wurde – obwohl sich die Reversibilität von Hornhautläsionen *per se* mit dem BCOP nicht beurteilen lässt –auf der Grundlage von Kaninchenaugenstudien dennoch vorgeschlagen, eine Bewertung der anfänglichen Tiefe der Hornhautverletzung heranzuziehen, um zwischen irreversiblen und reversiblen Wirkungen zu unterscheiden (13). Schließlich sei auch zu erwähnen, dass eine potenziell mit der Augenexposition einhergehende systemische Toxizität nach der BCOP-Methode nicht bewertet werden kann.

9. Es laufen Arbeiten, um Eignung und Grenzen des BCOP zur Identifizierung von Stoffen mit schwacher Reizwirkung oder von Stoffen ohne Reizwirkung genauer zu charakterisieren (siehe auch Punkt 45). Ferner wird empfohlen, dass Anwender den Validierungsorganisationen Exemplare und/oder Daten zur formellen Evaluierung etwaiger künftiger Anwendungsbereiche des BCOP übermitteln, auch um Stoffe mit schwacher Reizwirkung oder Stoffe ohne Reizwirkung identifizieren zu können.

10. Laboratorien, die diese Prüfmethode zum ersten Mal anwenden, sollten die in Anlage 2 genannten Leistungschemikalien verwenden. Laboratorien können diese Chemikalien verwenden, um ihre technische Kompetenz zur Durchführung des BCOP zu demonstrieren, bevor sie BCOP-Testdaten zum Zwecke der vorgeschriebenen Gefahrenklassifizierung einreichen.

TESTPRINZIP

11. Die BCOP-Prüfmethode ist ein organtypisches Modell, das die kurzfristige Aufrechterhaltung der normalen physiologischen und biochemikalischen Funktionen von Rinderhornhäuten *in vitro* gewährleistet. Bei dieser Methode werden durch die Prüfsubstanz hervorgerufene Schäden bewertet, indem Veränderungen von Trübung und Durchlässigkeit der Hornhaut mithilfe eines Opazimeters bzw. eines VIS-Spektrofotometers quantitativ gemessen werden. Die beiden Messwerte dienen der Berechnung eines *In-vitro*-Reizwertes (IVIS), der seinerseits herangezogen wird, um zwecks Prädiktion des Augenreizpotenzials einer Prüfsubstanz am lebenden Objekt (*in vivo*) eine Zuordnung zu einer Gefahrenkategorie aufgrund des *In-vitro*-Reizungspotenzials des Stoffes vorzunehmen (siehe Entscheidungskriterien).

▼M2

12. Für die BCOP-Prüfmethode werden isolierte Hornhäute der Augen frisch geschlachteter Rinder verwendet. Die Hornhauttrübung wird quantitativ bestimmt als Menge der die Hornhaut durchdringenden Lichtstrahlung. Die Durchlässigkeit der Hornhaut wird quantitativ bestimmt als die Menge an Natrium-Fluorescein, die die gesamte Dicke der Hornhaut durchdringt und im Medium in der Hinterkammer nachgewiesen wird. Die Applikation der Prüfsubstanzen auf die Epitheloberfläche der Hornhaut erfolgt durch Zugabe der Stoffe in die Vorderkammer des Hornhauthalters. Anlage 3 enthält eine Beschreibung sowie ein Schaubild einer Halterung, wie sie für den BCOP verwendet wird. Hornhauthalter sind im Handel erhältlich oder können als Bausatz bezogen werden.

**Bezugsquelle und Alter der Rinderaugen und Auswahl der Tiere**

13. Schlachtrinder werden in der Regel für den menschlichen Verzehr oder für andere gewerbliche Zwecke getötet. Nur gesunde und für die menschliche Nahrungskette geeignet befundene Tiere kommen als Bezugsquelle für Augenhornhäute für den BCOP-Test in Frage. Da Rinder je nach Rasse, Alter und Geschlecht eine große Gewichtsspanne aufweisen, gibt es keine Gewichtsempfehlung für die Tiere zum Zeitpunkt der Schlachtung.

14. Augenhornhäute von Tieren verschiedener Altersklassen sind mitunter unterschiedlich groß. Hornhäute mit einem horizontalen Durchmesser von > 30,5 mm und einer zentralen Hornhautdicke (CCT) von ≥ 1 100 μm stammen in der Regel von über acht Jahre alten Rindern, während Hornhäute mit einem horizontalen Durchmesser von < 28,5 mm und einer zentralen Hornhautdicke von < 900 μm im Allgemeinen von weniger als fünf Jahre alten Tieren stammen (14). Deshalb werden Augen von über 60 Monate alten Tieren in der Regel nicht verwendet. Traditionsgemäß werden keine Augen von weniger als 12 Monate alten Rindern verwendet, da die Augen dieser Tiere noch nicht ausgewachsen sind und Hornhautdicke sowie Hornhautdurchmesser wesentlich kleiner sind als bei ausgewachsenen Rindern. Hornhäute von Jungtieren (d. h. Tiere im Alter von sechs bis 12 Monaten) sind aufgrund ihrer Vorteile jedoch zulässig: Sie sind beispielsweise leichter erhältlich, die Altersspanne ist geringer und das Laborpersonal ist in geringerem Maße BSE-gefährdet (15). Da eine weitere Evaluierung des Einflusses von Hornhautgröße oder Hornhautdicke auf die Wirkung verätzender oder reizender Stoffe nützlich wäre, sollten Anwender das geschätzte Alter und/oder das Gewicht der Tiere, von denen die für eine Studie verwendeten Hornhäute stammen, mitteilen.

**Gewinnung und Beförderung der Augen zum Labor**

15. Die Rinderaugen werden im Schlachthof gewonnen. Um jede mechanische und sonstige Schädigung der Augen auf ein Minimum zu beschränken, sollten die Augen nach der Tötung des Tieres so bald wie möglich ausgeschält werden. Damit die Augen nicht mit potenziellen Reizstoffen in Berührung kommen, sollte das Schlachthofpersonal zum Abspülen des Schädels keine Detergenzien verwenden.

16. Die Augen sollten in einem angemessen großen Behältnis vollständig in HBSS eingelegt und so zum Labor befördert werden, dass sich ihr Zustand möglichst nicht verschlechtert und/oder es möglichst nicht zu einer bakteriellen Kontamination kommt. Da die Augen während des Schlachtprozesses gewonnen werden, könnten sie mit Blut und anderen biologischen Stoffen wie Bakterien und sonstigen Mikroorganismen in Berührung kommen. Deshalb muss unbedingt sichergestellt werden, dass das Kontaminationsrisiko auf ein Mindestmaß begrenzt wird (z. B. indem das für die Beförderung der Augen verwendete Behältnis auf Nasseis gelagert und die zur Lagerung der Augen während der Beförderung verwendete HBSS-Lösung mit Antibiotika (z. B. 100 IU/mL Penizillin und 100 μg/mL Streptomycin) angereichert wird).

▼M2

17. Der Zeitabstand zwischen der Gewinnung der Augen und der Verwendung der Hornhäute im BCOP sollte möglichst gering sein (im Idealfall sollten die Hornhäute am selben Tag gewonnen und verwendet werden) und die Testergebnisse nachweislich nicht kompromittieren. Letztere basieren auf den Auswahlkriterien für die Augen sowie auf den Reaktionen der Positiv- und Negativkontrollen. Alle für die Prüfung verwendeten Augen sollten aus einer an ein und demselben Tag gewonnenen Partie Augen stammen.

**Auswahlkriterien für Augen, die im BCOP-Test eingesetzt werden**

18. Unmittelbar nach ihrer Ankunft im Labor werden die Augen sorgfältig auf Mängel wie unter anderem verstärkte Trübung, Kratzer und Neovaskularisation untersucht. Nur Hornhäute von Augen, die keine derartigen Mängel aufweisen, dürfen verwendet werden.

19. Die Qualität jeder Hornhaut wird auch in späteren Testphasen geprüft. Hornhäute, die nach einer ersten einstündigen Äquilibrierung mehr als sieben Trübungseinheiten aufweisen (ANMERKUNG: der Opazimeter sollte nach den Trübungsnormen kalibriert werden, die auch zur Festlegung der Trübungseinheiten verwendet werden; siehe Anlage 3), sind zu verwerfen.

20. Jede Behandlungsgruppe (Prüfsubstanz sowie konkurrierende Negativ- und Positivkontrollen) umfasst mindestens drei Augen. Für die Negativkontrollen des BCOP sollten drei Hornhäute verwendet werden. Da die Hornhäute operativ vom Augapfel entfernt und in die Hornhautkammern eingespannt werden, kann es infolge dieser Handgriffe bei einzelnen Hornhäuten zu veränderten Trübungs- und Durchlässigkeitswerten kommen (auch bei der Negativkontrolle). Außerdem werden die Trübungs- und Durchlässigkeitswerte von Hornhäuten der Negativkontrolle dazu verwendet, die Trübungs- und Durchlässigkeitswerte des Prüfobjekts und der Positivkontrolle bei den IVIS-Berechnungen zu korrigieren.

VERFAHREN

**Vorbereitung der Augen**

21. Unbeschädigte Hornhäute werden seziert, wobei ein 2 bis 3 mm breiter Sklera-Rand belassen wird, um das anschließende Manipulieren zu erleichtern; dabei ist darauf zu achten, dass die Epithel- und Endothelzellschicht der Hornhaut nicht beschädigt wird. Die isolierten Hornhäute werden in speziell entwickelte Hornhauthalter eingespannt, die aus Vorder- und Hinterkammern bestehen, welche die Schnittstellen zur Epithel- bzw. Endothelseite der Hornhäute bilden. Beide Kammern (Hinterkammer zuerst) werden bis zum Überlaufen mit vorgewärmtem EMEM-Medium gefüllt, wobei sicherzustellen ist, dass sich keine Luftblasen bilden. Das Gerät wird sodann bei 32 ± 1 °C für mindestens eine Stunde äquilibriert, um die Hornhäute mit dem Medium zu äquilibrieren und so weit wie möglich eine normale Stoffwechseltätigkeit zu gewährleisten (die ungefähre Temperatur der Hornhautoberfläche beträgt *in vivo* 32 °C).

22. Nach der Äquilibrierung wird frisches vorgewärmtes EMEM-Medium in beide Kammern gegeben, und für jede Hornhaut werden Referenztrübungswerte abgelesen. Hornhäute, die makroskopische Gewebeschäden (z. B. Kratzer, Pigmentierung, Neovaskularisation) oder über sieben Trübungseinheiten aufweisen, werden verworfen. Sodann wird die Durchschnittstrübung aller äquilibrierten Hornhäute berechnet. Mindestens drei Hornhäute mit Trübungswerten nahe am Mittelwert sämtlicher Hornhäute werden für die Negativ-(oder Lösungsmittel-)Kontrolle ausgewählt. Die restlichen Hornhäute werden in Behandlungs- und Positivkontrollgruppen aufgeteilt.

▼M2

23. Da die Wärmekapazität von Wasser höher ist als die Wärmekapazität von Luft, bietet Wasser stabilere Temperaturbedingungen für die Inkubation. Deshalb wird ein Wasserbad empfohlen, um Hornhauthalter samt Inhalt auf einer Temperatur von 32 ± 1 °C zu halten. Es können jedoch auch Luftinkubatoren verwendet werden, sofern alle erforderlichen Vorkehrungen getroffen wurden, um die Temperatur stabil zu halten (z. B. durch Vorwärmen der Halterungen und Medien).

**Applikation der Prüfsubstanz**

24. Es werden zwei unterschiedliche Behandlungsprotokolle verwendet – eines für Flüssigkeiten und Tenside (Feststoffe oder Flüssigkeiten) und eines für nichttensidische Feststoffe.

25. Flüssigkeiten werden unverdünnt, Tenside in einer Konzentration von 10 % w/v in 0,9 % Natriumchloridlösung, destilliertem Wasser oder einem anderen Lösungsmittel, welches das Testsystem nachweislich nicht beeinträchtigt, getestet. Halbfeste Stoffe, Cremes und Wachse werden in der Regel wie Flüssigkeiten getestet. Sofern alternative Lösungskonzentrationen verwendet werden, ist dies angemessen zu begründen. Die Hornhäute werden den Flüssigkeiten und Tensiden für die Dauer von zehn Minuten ausgesetzt. Bei anderen Expositionszeiten sollten diese wissenschaftlich begründet werden.

26. Nichttensidische Feststoffe werden in der Regel wie Lösungen oder Suspensionen in einer Konzentration von 20 % in 0,9 % Natriumchloridlösung, destilliertem Wasser oder einem anderem Lösungsmittel, welches das Testsystem nachweislich nicht beeinträchtigt, getestet. Unter bestimmten Bedingungen und sofern wissenschaftlich begründet, können Feststoffe auch unverdünnt durch direkte Applikation auf die Hornhautoberfläche getestet werden, wobei die offene Methode (*open chamber method*, siehe Punkt 29) angewandt wird. Die Hornhäute werden den Feststoffen für die Dauer von vier Stunden ausgesetzt; soweit wissenschaftlich fundiert können jedoch auch, wie bei Flüssigkeiten und Tensiden, alternative Expositionszeiten verwendet werden.

27. Je nach den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz (z. B. fest, flüssig, zähflüssig oder nicht zähflüssig) können unterschiedliche Behandlungsmethoden angewandt werden. Der kritische Faktor besteht darin sicherzustellen, dass die Prüfsubstanz die Epitheloberfläche angemessen bedeckt und während der Spülungen sachgemäß entfernt wird. Die geschlossene Methode (*closed chamber method*) wird in der Regel für nicht zähflüssige bis leicht zähflüssige Prüfsubstanzen eingesetzt, während die offene Methode eher für halbzähflüssige und zähflüssige Prüfsubstanzen sowie für unverdünnte Feststoffe verwendet wird.

28. Bei der geschlossenen Methode wird über die Dosieröffnungen auf der Oberseite der Kammer so viel Prüfsubstanz (750 µL) in die Vorderkammer gegeben, dass die Epithelseite der Hornhaut bedeckt ist; die Öffnungen werden anschließend für die gesamte Expositionsdauer mit den Kammerverschlüssen abgedichtet. Es muss unbedingt sichergestellt werden, dass alle Hornhäute der Prüfsubstanz für eine angemessene Dauer ausgesetzt werden.

29. Bei der offenen Methode werden vor der Behandlung Scheibenverschlussring und Glasscheibe von der Vorderkammer entfernt. Die Kontroll- oder die Prüfsubstanz (750 µL bzw. genügend Prüfsubstanz, um die Hornhaut komplett zu bedecken) wird mit einer Mikropipette direkt auf die Epitheloberfläche der Hornhaut appliziert. Erweist sich das Pipettieren einer Prüfsubstanz als schwierig, so kann dieser zur leichteren Dosierung mittels Druckausgleich in eine Direktverdrängungspipette geladen werden. Die Spitze der Direktverdrängungspipette wird in die Dosierspitze der Spritze eingeführt, damit das Material unter Druck in die Spitze der Verdrängungspipette geladen werden kann. Lässt man den Bedienknopf langsam zurückgleiten, fährt der Kolben der Pipette nach oben. Treten in der Pipettenspitze Luftbläschen auf, wird das Prüfobjekt verworfen (ausgestoßen) und der Prozess wird so lange wiederholt, bis die Spitze ohne Luftblasen gefüllt ist. Erforderlichenfalls kann eine normale Spritze (ohne Nadel) verwendet werden, denn sie gestattet das Abmessen einer akkuraten Menge Prüfsubstanz und erleichtert die Applikation auf die Epitheloberfläche der Hornhaut. Nach der Dosierung wird die Glasscheibe wieder auf die Vorderkammer gesetzt, um das System wieder zu schließen.

▼M2

**Inkubation nach der Exposition**

30. Nach Ablauf der Expositionszeit werden Prüfsubstanz, Negativkontrolle oder Positivkontrolle aus der Vorderkammer entfernt, und das Epithel wird mindestens drei Mal (oder bis keine Prüfsubstanz mehr sichtbar ist) mit (phenolrot-haltigem) EMEM-Medium gewaschen. Phenolrot wird zum Abspülen verwendet, da sich aufgrund der Farbveränderung bei Phenolrot die Wirksamkeit des Abspülens säurehaltiger oder alkalischer Materialien bestimmen lässt. Die Hornhäute werden mindestens drei Mal gewaschen, wenn die Farbveränderung (ins Gelbe oder Lila) anhält oder wenn die Prüfsubstanz nach wie vor sichtbar ist. Sobald das Medium frei von Prüfsubstanz ist, werden die Hornhäute ein letztes Mal mit EMEM-Medium (ohne Phenolrot) abgespült. EMEM-Medium (ohne Zusatz von Phenolrot) wird als letzte Spülung verwendet, um sicherzustellen, dass der Phenolrot-Farbstoff vor der Trübungsmessung aus der Vorderkammer entfernt wurde. Die Vorderkammer wird sodann wieder mit nicht phenolrot-haltigem frischem EMEM-Medium aufgefüllt.

31. Bei Flüssigkeiten oder Tensiden werden die Hornhäute nach dem Abspülen für weitere zwei Stunden bei 32 ± 1 °C inkubiert. Unter bestimmten Umständen könnte sich nach der Exposition eine längere Inkubationszeit als zweckdienlich erweisen; dies sollte auf Fallbasis geprüft werden. Mit Feststoffen behandelte Hornhäute werden nach Ablauf der vierstündigen Exposition gründlich abgespült; eine längere Inkubation ist nicht erforderlich.

32. Nach Ablauf der auf die Exposition folgenden Inkubation (Flüssigkeiten und Tenside) bzw. nach Ablauf der vierstündigen Exposition (nichttensidische Feststoffe) werden Trübung und Durchlässigkeit der einzelnen Hornhäute aufgezeichnet. Außerdem wird jede Hornhaut visuell geprüft, und relevante Befunde (z. B. Gewebeabschälung, Reste von Prüfsubstanz, uneinheitliche Trübungsmuster) werden aufgezeichnet. Diese Daten könnten insofern wichtig sein, als sie Abweichungen der Opazimeter-Messwerte bestätigen könnten.

**Kontrollstoffe**

33. Jeder Versuch beinhaltet konkurrierende Negativ- oder Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen und Positivkontrollen.

34. Für Tests von Flüssigstoffen zu 100 % sieht der BCOP eine konkurrierende Negativkontrolle (z. B. 0,9 % Natriumchloridlösung oder destilliertes Wasser) vor, damit unspezifische Veränderungen im Testsystem festgestellt werden können und ein Referenzwert für die Test-Endpunkte ermittelt werden kann: Auf diese Weise wird auch sichergestellt, dass die Testbedingungen nicht zu einer unerwünschten Reizwirkung führen.

35. Für Tests von verdünnten Flüssigkeiten, Tensiden oder Feststoffen sieht der BCOP eine Gruppe konkurrierender Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen vor, damit unspezifische Veränderungen im Testsystem festgestellt werden können und ein Referenzwert für die Test-Endpunkte ermittelt werden kann. Es sind nur Lösungsmittel/Vehikel zulässig, die das Testsystem nachweislich nicht beeinträchtigen.

36. Jeder Versuch beinhaltet als konkurrierende Positivkontrolle einen bekannten Augenreizstoff, um überprüfen zu können, dass eine adäquate Wirkung eintritt. Da bei dieser Prüfmethode der BCOP zur Identifizierung augenverätzender oder stark augenreizender Stoffe angewandt wird, sollte es sich bei der Positivkontrolle idealerweise um eine Referenzsubstanz handeln, der bei dieser Prüfmethode eine starke Wirkung hervorruft. Um sicherzustellen, dass im Zeitverlauf auftretende Wirkungsschwankungen bei der Positivkontrolle bewertet werden können, sollte die Reaktion jedoch nicht zu heftig sein.

37. Beispiele für Positivkontrollen für flüssige Prüfsubstanzen sind Dimethylformamid oder 1 %iges Natriumhydroxid. Für feste Prüfsubstanzen käme 20 %iges (Gewichtsprozent) Imidazol in 0,9 % Natriumchloridlösung als Positivkontrolle in Frage.

▼M2

38. Referenzsubstanzen sind nützlich für die Bewertung des Augenreizpotenzials unbekannter Chemikalien einer spezifischen Chemikalien- oder Produktklasse oder die Bewertung des relativen Reizpotenzials eines Augenreizstoffes innerhalb einer spezifischen Spanne von Reizwirkungen.

**Gemessene Endpunkte**

39. Die Trübung wird durch Messung der durch die Hornhaut durchgehenden Lichtstrahlung bestimmt. Die quantitative Messung der Hornhauttrübung erfolgt mithilfe eines Opazimeters, eines Messgeräts, bei dem die Trübungswerte kontinuierlich gemessen werden.

40. Die Durchlässigkeit wird durch Messung der Menge Fluorescein-Natrium bestimmt, die alle Zellschichten der Hornhaut (d. h. von der Epithelzellschicht auf der äußeren Hornhautoberfläche bis zur Endothelzellschicht auf der inneren Hornhautfläche) passiert. Die Vorderkammer des Hornhauthalters, die die Verbindung zur Epithelseite der Hornhaut bildet, wird mit 1 mL Fluorescein-Natrium-Lösung (4 oder 5 mg/mL bei Flüssigkeiten und Tensiden bzw. nichttensidischen Feststoffen) aufgefüllt, während die Hinterkammer, die die Verbindung zur Endothelseite der Hornhaut bildet, mit frischem EMEM-Medium gefüllt wird. Die Halterung wird sodann in horizontaler Position für 90 ± 5 Minuten bei 32 ± 1 °C inkubiert. Die Menge an Fluorescein-Natrium, die in die Hinterkammer eindringt, wird mithilfe eines UV/VIS-Spektrofotometers gemessen. Bei 490 nm ausgewertete spektrofotometrische Messungen werden als Werte für optische Dichte ($OD_{490}$) oder Absorbanzwerte aufgezeichnet, die kontinuierlich gemessen werden. Zur Bestimmung der Fluorescein-Durchlässigkeit werden $OD_{490}$-Werte herangezogen, die mithilfe eines VIS-Spektrofotometers bei einer Standardpfadlänge von 1 cm ermittelt wurden.

41. Alternativ kann ein Plattenleser für 96-Mulden-Mikrotiterplatten verwendet werden, sofern i) der lineare Messbereich des Plattenlesers für die Bestimmung der Fluorescein-$OD_{490}$-Werte festgelegt werden kann und ii) in der 96-Mulden-Mikrotiterplatte Fluorescein-Proben in der richtigen Menge verwendet werden, um $OD_{490}$-Werte zu ergeben, die der Standardpfadlänge von 1 cm entsprechen (dies könnte vollständig gefüllte Mulden [in der Regel 360µL] erfordern).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Datenauswertung**

42. Sobald die Trübungs- und die durchschnittlichen Durchlässigkeits-($OD_{490}$-)Werte um die Hintergrundtrübungswerte und die $OD_{490}$-Durchlässigkeitswerte der Negativkontrolle korrigiert wurden, werden die durchschnittlichen Trübungs- und $OD_{490}$-Durchlässigkeitswerte für jede Behandlungsgruppe in einer empirisch abgeleiteten Formel kombiniert, um für jede Behandlungsgruppe einen *In-vitro*-Reizwert (IVIS) zu berechnen:

IVIS = durchschnittl. Trübungswert + (15 × durchschnittl. $OD_{490}$-Durchlässigkeitswert)

Nach Sina *et al*. (16) wurde diese Formel aus Labor- und Interlaborstudien abgeleitet. Die für eine Serie von 36 Verbindungen in einer Multilaborstudie generierten Daten wurden einer multivariaten Analyse unterzogen, um die *Best-fit*-Gleichung zwischen *In-vivo*- und *In-vitro*-Daten zu ermitteln. Diese Analyse wurde von Wissenschaftlern zweier separater Unternehmen durchgeführt, die zu quasi identischen Gleichungsergebnissen gelangten.

43. Die Trübungs- und Durchlässigkeitswerte sollten auch unabhängig voneinander bestimmt werden, um feststellen zu können, ob eine Prüfsubstanz für nur einen der beiden Endpunkte (siehe Entscheidungskriterien) eine augenverätzende oder stark augenreizende Wirkung verursachte.

▼M2

**Entscheidungskriterien**

44. Ein Stoff, der einen IVIS-Wert ≥ 55,1 bewirkt, gilt als Stoff mit verätzender oder stark reizender Wirkung. Wie bereits unter Punkt 1 erwähnt, sollten, wenn die Prüfsubstanz nicht als Stoff mit augenverätzender oder stark augenreizender Wirkung identifiziert wird, für Klassifizierungs- und Kennzeichnungszwecke zusätzliche Testungen vorgenommen werden. Gemessen an Daten aus *In-vivo*-Kaninchenaugentests, die nach den EPA (1)-, EU (2)- oder GHS (3)-Klassifizierungssystemen klassifiziert wurden, zeichnet sich der BCOP durch eine allgemeine Genauigkeit von 79 % (113/143) bis 81 % (119/147), eine Falsch-Positiv-Rate von 19 % (20/103) bis 21 % (22/103) und eine Falsch-Negativ-Rate von 16 % (7/43) bis 25 % (10/40) aus. Werden Stoffe bestimmter Chemikalienklassen (d. h. Alkohole, Ketone) oder bestimmter physikalischer Klassen (d. h. Feststoffe) aus der Datenbank ausgeschlossen, so liegen die Genauigkeit des BCOP gemessen an den EU-, EPA- und GHS-Klassifizierungssystemen zwischen 87 % (72/83) und 92 % (78/85), die Falsch-Positiv-Raten zwischen 12 % (7/58) und 16 % (9/56) und die Falsch-Negativ-Raten zwischen 0 % (0/27) und 12 % (3/26).

45. Selbst wenn die augenverätzende oder stark augenreizende Wirkung einer Prüfsubstanz nicht klassifiziert werden kann, können Daten aus dem BCOP in Kombination mit Testdaten aus dem *In-vivo*-Kaninchenaugentest oder aus einem angemessen validierten *In-vitro*-Test zweckdienlich sein, um Eignung und Einsatzgrenzen des BCOP zur Identifizierung von schwach reizenden Stoffen und von Stoffen ohne Reizwirkung genauer zu prüfen (ein Leitfaden für die Anwendung von *In-vitro*-Prüfmethoden zur Untersuchung auf okulare Toxizität wird zur Zeit erarbeitet).

**Studienakzeptanzkriterien**

46. Ein Test gilt als akzeptabel, wenn die Positivkontrolle einen IVIS-Wert innerhalb von zwei Standardabweichungen des geltenden historischen Mittelwertes ergibt, der mindestens alle drei Monate bzw. immer dann aktualisiert werden muss, wenn Laboratorien, die nur selten Testungen vornehmen (d. h. weniger als einmal im Monat), einen akzeptablen Test durchführen. Die Negativ- oder Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen sollten Trübungs- und Durchlässigkeitswerte ergeben, die geringer sind als die Obergrenzen, die für Hintergrundtrübungs- und Durchlässigkeitswerte für Rinderhornhäute vorgegeben sind, welche mit der jeweiligen Negativ- bzw. Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle behandelt wurden.

**Testbericht**

47. Der Testbericht sollte die folgenden Informationen umfassen, soweit sie für die Studie relevant sind:

*Prüfsubstanzen und Kontrollsubstanzen*

chemische Bezeichnung(en) wie der vom *Chemical Abstracts Service* (CAS) benutzte strukturelle Name, gefolgt von anderen Bezeichnungen, soweit bekannt;

die CAS-Registrierungsnummer (CAS-Nr.), soweit bekannt;

Reinheit und Zusammensetzung des Stoffes oder des Gemisches (in Gewichtsprozent(en)), soweit diesbezügliche Informationen vorliegen;

physiko-chemikalische Eigenschaften wie physikalischer Zustand, Flüchtigkeit, pH-Wert, Stabilität, Chemikalienklasse, Wasserlöslichkeit, soweit sie für die Studie relevant sind;

Behandlung der Prüfsubstanzen/Kontrollsubstanzen vor der Testung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

Stabilität, soweit bekannt.

▼M2

*Informationen zum Auftraggeber und Prüfanstalt*

Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;

Angaben zur Identifizierung der Bezugsquelle der Augen (d. h. die Einrichtung, in der sie gewonnen wurden);

Lager- und Transportbedingungen der Augen (z. B. Datum und Uhrzeit der Gewinnung, Zeitspanne vor Testbeginn, Transportmedien und Temperaturbedingungen, eventuell verwendete Antibiotika);

soweit verfügbar, spezifische Angaben zu den Tieren, von denen die Augen gewonnen wurden (z. B. Alter, Geschlecht, Gewicht des Spendertieres).

*Begründung der Prüfmethode und des angewandten Protokolls*

*Integrität der Prüfmethode*

Das zur Gewährleistung der Integrität (d. h. der Genauigkeit und Zuverlässigkeit) der Prüfmethode im Zeitverlauf angewandte Verfahren (z. B. regelmäßige Testung von Leistungsstoffen, Hinzuziehung historischer Daten aus Negativ- und Positivkontrollen).

*Testakzeptanzkriterien*

Akzeptable konkurrierende Positiv- und Negativkontrollen aufgrund historischer Daten;

gegebenenfalls akzeptable Reihen konkurrierender Referenzkontrollen aufgrund historischer Daten.

*Testbedingungen*

Beschreibung des angewandten Testsystems;

Typ des verwendeten Hornhauthalters;

Kalibrierungsdaten zu den für die Messung der Trübung und Durchlässigkeit verwendeten Geräte (z. B. Opazimeter und Spektrofotometer);

Angaben zu den verwendeten Rinderhornhäuten, einschließlich Qualitätsbestätigungen;

Einzelheiten des angewandten Testverfahrens;

verwendete Prüfsubstanzkonzentration(en);

Beschreibung etwaiger Änderungen des Testverfahrens;

Verweis auf historische Modelldaten (z. B. Negativ- und Positivkontrollen, Leistungsstoffe, Referenzsubstanzen);

Beschreibung der angewandten Bewertungskriterien.

*Ergebnisse*

Tabellarische Aufstellung von Daten aus einzelnen Testproben (z. B. Trübungs- und $OD_{490}$-Werte und berechnete IVIS-Werte für die Prüfsubstanz und die Positiv-, Negativ- und Referenzkontrollen [soweit einbezogen], einschließlich Daten aus Wiederholungsversuchen, soweit durchgeführt, sowie Mittelwerte ± Standardabweichung für jeden Versuch);

Beschreibung anderer beobachteter Wirkungen.

*Erörterung der Ergebnisse*

*Schlussfolgerung*

LITERATURANGABEN

(1) U.S. EPA (1996). *Label Review Manual*: Zweite Ausgabe. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼M2

(2) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1.

(3) UN (2007). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. Zweite überarbeitete Ausgabe, New York & Genf: United Nations Publications, 2007. Verfügbar unter:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ESAC (2007). *Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants*. Verfügbar unter:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(5) ICCVAM (2007). *Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)*. NIH-Veröffentlichung Nr. 07-4517. Verfügbar unter:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(6) Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. ABl. L 396 vom 30.12.2006, S. 1.

(7) OECD (2002). Testrichtlinie 405. *OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion*. Verfügbar unter:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(8) ICCVAM (2007). *ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol*. In: *ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)*. NIH-Veröffentlichung Nr. 07-4517. Verfügbar unter:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). *Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method*. NIH-Veröffentlichung Nr. 06-4512. *Research Triangle Park: National Toxicology Program*. Verfügbar unter:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) INVITTOX (1999). Protokoll Nr. 124: *Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay* – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italien: Europäisches Zentrum für die Validierung alternativer Methoden (ECVAM).

▼**M2**

(11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. und Sina, J.F. (1992). *Bovine corneal opacity and permeability test*: *An in vitro assay of ocular irritancy*. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., und das Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). *Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings*. Verfügbar unter:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(13) Maurer, J.K., Parker, R.D. und Jester, J.V. (2002). *Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays*. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. und Macmillan, H. (1995). *Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse*. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. und Bradley, R. (1997). *BSE: A decade on* - Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D. und Miller, K. (1995). *A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates*. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

(17) ICCVAM (2006). Background review document, *Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method*. Verfügbar unter:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(18) ICCVAM (2006). Background review document, *Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method*. Verfügbar unter:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

*Anlage 1*

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

**Genauigkeit:** Der Grad der Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz". Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung" verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode.

**Referenzsubstanz:** Eine zum Vergleich mit einer Prüfsubstanz verwendete Bezugsgröße. Eine Referenzsubstanz sollte die folgenden Eigenschaften aufweisen: i) beständige und zuverlässige Quelle(n); ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zur Klasse der geprüften Stoffe; iii) bekannte physikalische/chemische Eigenschaften; iv) unterstützende Daten zu bekannten Wirkungen; v) bekannte Potenz innerhalb der erwünschten Wirkungsspanne.

**Hornhaut:** Der Iris und Pupille überdeckende transparente vordere Teil des Augapfels, über den Licht ins Augeninnere übertragen wird.

**Hornhauttrübung:** Messwert für die Undurchsichtigkeit der Hornhaut nach Applikation einer Prüfsubstanz. Eine stärkere Hornhauttrübung ist ein Indikator für die Schädigung der Hornhaut. Die Trübung kann subjektiv (Draize-Kaninchenaugentest) oder objektiv (mithilfe eines Messgeräts, z. B. eines Opazimeters) bestimmt werden.

**Hornhautdurchlässigkeit:** Quantitativer Messwert für die Schädigung der Epithelzellschicht der Hornhaut, ermittelt durch Bestimmung der Menge an Fluorescein-Natrium, die alle Zellschichten der Hornhaut durchdringt.

**EPA-Kategorie 1:** Verätzende Wirkung (irreversible Schädigung des Augengewebes) oder Hornhautkomplikation oder -reizung, die über 21 Tage lang anhält (1).

**EU-Kategorie R41:** Schädigung des Augengewebes oder schwere physikalische Beeinträchtigung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfsubstanz auf die Vorderfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig zurückgeht (2).

**Falsch-Negativ-Rate:** Der Anteil aller positiven Substanzen, die durch eine Prüfmethode fälschlicherweise als negativ identifiziert werden. Die Falsch-Negativ-Rate ist ein Leistungsindikator der Prüfmethode.

**Falsch-Positiv-Rate:** Der Anteil aller negativen Substanzen, die durch eine Prüfmethode fälschlicherweise als positiv identifiziert werden. Die Falsch-Positiv-Rate ist ein Leistungsindikator der Prüfmethode.

**GHS (Globales Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien):** Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffe und Gemische) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenblätter, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (3).

▼M2

**GHS-Kategorie 1:** Schädigung des Augengewebes oder schwere physikalische Beeinträchtigung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfsubstanz auf die Vorderfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig zurückgeht (3).

**Gefahr:** Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

***In-vitro*-Reizwert (IVIS):** Eine empirisch abgeleitete Formel zur Verwendung im BCOP, bei der der durchschnittliche Trübungs- und der durchschnittliche Durchlässigkeitswert für jede Behandlungsgruppe in einem einzigen *In-vitro*-Wert zusammengefasst werden. *IVIS* = durchschnittlicher Trübungswert + (15 x durchschnittlicher Durchlässigkeitswert).

**Negativkontrolle:** Ein unbehandeltes Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält. Diese Probe wird mit prüfsubstanzbehandelten Proben oder anderen Kontrollproben mitgeführt, um festzustellen, ob das Lösungsmittel mit dem Testsystem interagiert.

**Stoffe ohne Reizwirkung:** Stoffe, die nicht als Augenreizstoffe der EPA-Kategorien I, II oder III, der EU-Kategorien R41 oder R36 oder der GHS-Kategorien 1, 2A oder 2B eingestuft sind.

**Augenverätzende Stoffe:** a) Stoffe, die das Augengewebe irreversibel schädigen; b) Stoffe, die als Augenreizstoffe der GHS-Kategorie 1, der EPA-Kategorie I oder der EU-Kategorie R41 eingestuft sind (1) (2) (3).

**Augenreizende Stoffe:** a) Stoffe, die nach Applikation auf die Vorderfläche des Auges eine reversible Augenschädigung verursachen; b) Stoffe, die als Augenreizstoffe der EPA-Kategorien II oder III, der EU-Kategorie R36 oder der GHS-Kategorien 2A oder 2B eingestuft sind (1) (2) (3).

**Stark augenreizende Stoffe:** a) Stoffe, die nach Applikation auf die Vorderfläche des Auges das Augengewebe derart schädigen, dass die Schädigung nicht innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation des Stoffes zurückgeht oder dass das Sehvermögen schwer beeinträchtigt ist; b) Stoffe, die als Augenreizstoffe der GHS-Kategorie 1, der EPA-Kategorie I oder der EU-Kategorie R41 eingestuft sind (1) (2) (3).

**Opazimeter:** Ein Instrument zur Messung der „Hornhauttrübung“ durch quantitative Evaluierung der Lichtübertragung durch die Hornhaut. Das Gerät besteht in der Regel aus zwei Kammern, beide mit eigener Lichtquelle und Fotozelle. Eine Kammer wird für die behandelte Hornhaut verwendet, die zweite zur Kalibrierung und Nulleinstellung des Instruments. Licht aus einer Halogenleuchte wird durch eine Kontrollkammer (leere Kammer ohne Fenster oder Flüssigkeit) zu einer Fotozelle geleitet und mit dem durch die Versuchskammer, die die Kammer mit der Hornhaut enthält, zu einer Fotozelle geleiteten Lichtstrahl verglichen. Der Unterschied bei der Lichtübertragung aus den Fotozellen wird errechnet und als numerischer Trübungswert digital angezeigt.

**Positivkontrolle:** Ein Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

▼M2

**Zuverlässigkeit:** Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet.

**Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle:** Eine unbehandelte Probe, die alle Komponenten eines Testsystems enthält, einschließlich des Lösungsmittels oder Vehikels, und die mit den Prüfsubstanzbehandelten Proben und anderen Kontrollproben mitgeführt wird, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfsubstanz behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst wurden, zu bestimmen. Bei der Testung mit einer konkurrierenden Negativkontrolle zeigt diese Probe außerdem an, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Testsystem interagiert.

**Stufenweiser Prüfansatz:** Eine schrittweise Prüfstrategie, bei der alle vorhandenen Informationen über eine Prüfsubstanz in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Bewertungsansatz (*weight-of-evidence*) vorgegangen wird, um feststellen zu können, ob genügend Informationen für einen Gefahrenklassifizierungsbeschluss vorliegen, bevor zur nächsten Stufe übergangen wird. Wenn das Reizpotenzial einer Prüfsubstanz auf Basis der vorliegenden Informationen zugeordnet werden kann, sind keine weiteren Testungen erforderlich. Ist dies nicht der Fall, müssen schrittweise sequenzielle Tierversuche durchgeführt werden, bis eine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden kann.

**Validierte Prüfmethode:** Eine Prüfmethode, für die zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien abgeschlossen wurden. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht genau und zuverlässig genug ist, um für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert zu werden.

**Evidenzbasierte Bewertung:** Der Prozess der Prüfung der Stärken und Schwächen verschiedener Informationen, um über das Gefahrenpotenzial eines Stoffes entscheiden zu können und diese Entscheidung zu untermauern.

▼M2

*Anlage 2*

**Leistungsstoffe für den BCOP**

Vor der routinemäßigen Anwendung eines Tests, der den Anforderungen der vorliegenden Prüfmethode genügt, können Laboratorien ihre technische Kompetenz demonstrieren, indem sie die zehn in Tabelle 1 empfohlenen Stoffe in die richtige Ätzwirkungsklasse einstufen. Die Stoffe wurden so ausgewählt, dass sie die Bandbreite lokaler Augenreizungs-/Augenverätzungswirkungen repräsentieren, die auf den Ergebnissen des *In-vivo*-Kaninchenaugentests basiert (TG 405) (d. h. Kategorien 1, 2A, 2B oder „nicht eingestuft und nicht gekennzeichnet“ nach dem UN-GHS-System (3) (7). Angesichts der validierten Eignung dieser Tests (d. h. zur ausschließlichen Identifizierung augenverätzender/stark augenreizender Stoffe) kann die Kompetenz des Labors jedoch nur anhand von zwei Klassifizierungsergebnissen (verätzend/stark reizend oder nicht verätzend/-schwach reizend) demonstriert werden. Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Stoffe im Handel, die Verfügbarkeit hochwertiger *In-vivo*-Referenzdaten und das Vorhandensein hochwertiger Daten aus zwei *In-vitro*-Methoden, für die zurzeit Testrichtlinien erarbeitet werden. Aus diesem Grunde wurden die Reizstoffe aus der von der ICCVAM empfohlenen Liste von 122 Referenzsubstanzen für die Validierung von *In-vitro*-Prüfmethoden zur Untersuchung auf okulare Toxizität ausgewählt (siehe Anhang H: von ICCVAM empfohlene Referenzsubstanzen) (5). Referenzdaten können aus den *Background Review Documents* der ICCVAM für die BCOP- und die ICE-Prüfmethode (Test am isolierten Hühnerauge) bezogen werden (17) (18).

*Tabelle 1*

Empfohlene Stoffe für die Demonstration der technischen Kompetenz von Laboratorien zur Durchführung des BCOP

| Stoff | CAS-Nr. | Chemikalien klasse ([1]) | Physikalischer Zustand | *In-vivo*-Klassifizierung ([2]) | *In-vitro*-Klassifizierung ([3]) |
|---|---|---|---|---|---|
| Benzalkoniumchlorid (5 %) | 8001-54-5 | Oniumverbindung | flüssig | Kategorie 1 | verätzend/stark reizend |
| Chlorhexidin | 55-56-1 | Amin, Amidin | fest | Kategorie 1 | verätzend/stark reizend |
| Dibenzoyl-D-Weinsäure | 2743-38-6 | Carbonsäure, Ester | fest | Kategorie 1 | verätzend/stark reizend |
| Imidazol | 288-32-4 | heterocyclisch | fest | Kategorie 1 | verätzend/stark reizend |
| Trichloressigsäure (30 %) | 76-03-9 | Carbonsäure | flüssig | Kategorie 1 | verätzend/stark reizend |
| 2,6-Dichlorbenzoyl-chlorid | 4659-45-4 | Acylhalolenid | flüssig | Kategorie 2A | Nicht verätzend/ schwach reizend |
| Ethyl-2-methylaceto-acetat | 609-14-3 | Ketone, Ester | flüssig | Kategorie 2B | Nicht verätzend/ schwach reizend |
| Ammoniumnitrat | 6484-52-2 | Anorganisches Salz | fest | Kategorie 2A | Nicht verätzend/ schwach reizend |

▼**M2**

| Stoff | CAS-Nr. | Chemikalien klasse ([1]) | Physikalischer Zustand | *In-vivo*-Klassifizierung ([2]) | *In-vitro*-Klassifizierung ([3]) |
|---|---|---|---|---|---|
| Glyzerin | 56-81-5 | Alkohol | flüssig | Nicht eingestuft | Nicht verätzend/ schwach reizend |
| n-Hexan | 110-54-3 | Kohlenwasserstoff (acyclisch) | flüssig | Nicht eingestuft | Nicht verätzend/ schwach reizend |

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registrierungsnummer des *Chemical Abstracts Service*

([1]) Jede Prüfsubstanz wurde anhand einer Standard-Klassifizierungsregelung auf Basis des Klassifizierungssystems der *National Library of Medicine Medical Subject Headings* (MeSH) einer Chemikalienklasse zugeordnet (abrufbar über http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) gestützt auf Ergebnisse aus dem *In-vivo*-Kaninchenaugentest (OECD TG 405) unter Verwendung des UN-GHS-Klassifizierungssystems (3)(7).

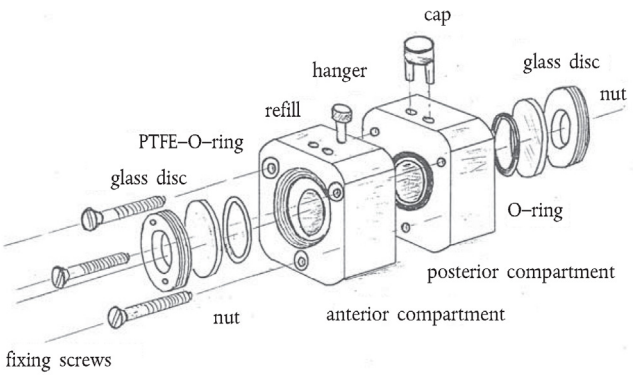
([3]) gestützt auf Ergebnisse der BCOP- und ICE-Prüfmethoden.

▼M2

*Anlage 3*

BCOP-HORNHAUTHALTER

1. BCOP-Hornhauthalter sind aus einem trägen Material (z. B. Polypropylen) gefertigt. Sie bestehen aus zwei Hälften (einer Vorder- und einer Hinterkammer) sowie zwei identischen zylindrischen Innenkammern. Jede Kammer hat ein Fassungsvermögen von 5 mL und schließt mit einer Glasscheibe ab, durch die die Trübungsmesswerte abgelesen werden. Jede Innenkammer hat einen Durchmesser von 1,7 cm und ist 2,2 cm tief ([1]). Ein auf der Hinterkammer positionierter Dichtungsring verhindert Leckagen. Die Hornhäute werden mit der Endothelseite nach unten auf den Dichtungsring der Hinterkammern platziert, während die Vorderkammern auf die Epithel-Seite der Hornhäute gesetzt werden. Die Kammern werden mit drei nichtrostenden Schrauben an den Außenkanten der Kammer fixiert. Jede Kammer schließt mit einer Glasscheibe ab, die für den leichten Zugang zur Hornhaut abgenommen werden kann. Um Leckagen zu verhindern, befindet sich zwischen Glasscheibe und Kammer ein weiterer Dichtungsring. Zwei Öffnungen auf der Oberseite jeder Kammer gestatten den Ein- und Auslass des Mediums und der Testverbindungen. Sie werden während der Behandlung und der Inkubation mit Gummistöpsel verschlossen.




*Glossar*

Glass disc: Glasscheibe

PTFE-O-ring: PTFE-Dichtungsring

Refill: Einlassöffnung

Hanger: Aufhänger

Cap: Stöpsel

Nut: Sicherungsmutter

O-ring: Dichtungsring

Posterior compartment: Hinterkammer

Anterior compartment: Vorderkammer

Fixing screws: Fixierschrauben

([1]) Es handelt sich um Abmessungen einer Halterung für Hornhäute von Kühen im Alter von 12 bis 16 Monaten. Soweit Tiere im Alter von sechs bis 12 Monaten verwendet werden, müsste die Halterung so konzipiert sein, dass jede Kammer 4 mL fasst und jede Innenkammer einen Durchmesser von 1,5 cm aufweist und 2,2 cm tief ist. Bei jedem neuen Halterungsmodell ist ausschlaggebend, dass das Verhältnis zwischen der exponierten Hornhautoberfläche und dem Fassungsvermögen der Hinterkammer dem jeweiligen Verhältniswert bei traditionellen Hornhauthaltern entspricht. Dadurch wird sichergestellt, dass die Durchlässigkeitswerte zwecks Berechnung des IVIS-Wertes nach der vorgeschlagenen Formel korrekt bestimmt werden.

▼**M2**

OPAZIMETER

2. Der Opazimeter ist ein Gerät zur Messung der Lichtübertragung. Licht aus einer Halogenleuchte wird durch eine Kontrollkammer (leere Kammer ohne Fenster oder Flüssigkeit) zu einer Fotozelle geleitet und mit dem Lichtstrahl verglichen, der durch die Versuchskammer, welche die Kammer mit der Hornhaut enthält, zu einer Fotozelle geleitet wird. Der Unterschied bei der Lichtübertragung aus den Fotozellen wird berechnet und als numerischer Trübungswert digital angezeigt. Die Trübungseinheiten sind vorgegeben.

3. Der Opazimeter sollte mittels eine Reihe von Trübungsmesswerten eine lineare Reaktion ergeben, die den Schwellenwerten für die vom Prognosemodell beschriebenen unterschiedlichen Klassifizierungen (d. h. bis zu dem Schwellenwert, der die verätzende/stark reizende Wirkung bestimmt) Rechnung trägt. Um lineare und akkurate Messwerte bis zu 75-80 Trübungseinheiten zu gewährleisten, muss der Opazimeter mit einer Reihe von Kalibratoren geeicht werden. Die Kalibratoren (undurchsichtige Polyesterfolien) werden in die Kalibrierkammer (eine für die Aufnahme der Kalibratoren konzipierte Hornhautkammer) platziert und auf dem Opazimeter abgelesen. Die Kalibrierkammer ist derart konzipiert, dass die Kalibratoren in ungefähr demselben Abstand zu Lichtquelle und Fotozelle gehalten werden, in dem sich die Hornhäute bei der Trübungsmessung befinden würden. Der Opazimeter wird zunächst auf null Trübungseinheiten geeicht, wobei die Kalibrierkammer ohne Kalibrator verwendet wird. Anschließend werden nacheinander drei unterschiedliche Kalibratoren in die Kalibrierkammer gesetzt, und die Trübungswerte werden gelesen. Die Kalibratoren 1, 2 und 3 sollten Trübungswerte ergeben, die ihren eingestellten Werten von 75, 150 bzw. 225 Trübungseinheiten ± 5 % entsprechen.

▼M2

## B. 48 TEST AM ISOLIERTEN HÜHNERAUGE ZUR IDENTIFIZIERUNG VON STOFFEN MIT AUGENVERÄTZENDER UND STARK AUGENREIZENDER WIRKUNG

### EINLEITUNG

1. Der Test am isolierten Hühnerauge (*Isolated Chicken Eye*, ICE) ist eine *In-vitro*-Prüfmethode, die unter bestimmten Bedingungen und mit bestimmten Grenzen eingesetzt werden kann, um Stoffe und Gemische als Stoffe und Gemische mit augenverätzender und stark augenreizender Wirkung einzustufen (1) (2) (3). Für die Zwecke dieser Prüfmethode sind Stoffe mit starker Reizwirkung Stoffe, welche Augenläsionen verursachen, die beim Kaninchen nach der Applikation mindestens 21 Tage lang anhalten. Auch wenn der Test den *In-vivo*-Kaninchenaugentest nicht absolut ersetzen kann, wird der ICE innerhalb eines spezifischen Anwendungsbereichs dennoch als Teil einer gestuften Prüfstrategie zur vorschriftsmäßigen Einstufung und Kennzeichnung empfohlen (4) (5). Bei diesem Test positiv testende Prüfsubstanzen und -gemische (6) können als Stoffe und Gemische mit augenverätzender oder stark augenreizender Wirkung eingestuft werden, ohne dass weitere Tests am lebenden Kaninchen erforderlich sind. Ein Stoff mit negativem Testergebnis müsste nach einer sequenziellen Prüfstrategie, wie in der OECD-Testrichtlinie 405 (7) (Kapitel B. 5 dieses Anhangs) dargelegt, am Kaninchen getestet werden.

2. Diese Prüfmethode beschreibt die Verfahrensschritte für die Beurteilung des augenverätzenden oder stark augenreizenden Potenzials einer Prüfsubstanz, gemessen als seine Fähigkeit, im isolierten Hühnerauge toxische Wirkung zu zeigen. Toxische Wirkungen auf die Hornhaut werden gemessen durch i) qualitative Bewertung der Trübung, ii) qualitative Bewertung der Schädigung der Epithel-Zellschicht durch Applikation von Fluorescein auf das Auge (Fluorescein-Verfärbung), iii) quantitative Messung verstärkter Dicke (Schwellung) und iv) qualitative Beurteilung makroskopischer morphologischer Oberflächenschädigungen. Hornhauttrübungen, Hornhautschwellungen und Hornhautschädigungen nach Applikation einer Prüfsubstanz werden zunächst einzeln bewertet und anschließend zwecks Klassifizierung des Augenreizwertes (*Eye Irritancy Classification*) kombiniert.

3. Augenreizende Stoffe, die Läsionen hervorrufen, welche in weniger als 21 Tagen abklingen, und Stoffe ohne augenreizende Wirkung wurden ebenfalls nach der ICE-Methode untersucht. Die Genauigkeit und Zuverlässigkeit des ICE bei Stoffen in diesen beiden Kategorien wurden jedoch nicht offiziell evaluiert.

4. Für Definitionen siehe Anhang 1.

### VORBEMERKUNGEN UND EINSATZGRENZEN

5. Diese Prüfmethode basiert auf dem ICE-Testprotokoll des Organisationsübergreifenden Koordinationsausschusses zur Validierung alternativer Methoden (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) (8), das im Anschluss an eine internationale Validierungsstudie (4) (5) (9) und unter Mitwirkung des Europäischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*), des Japanischen Zentrums zur Validierung alternativer Methoden (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*) und der Abteilung Toxikologie und angewandte Pharmakologie des niederländischen Forschungsinstituts TNO *Quality of Life* entwickelt wurde. Das Protokoll beruht auf Informationen aus veröffentlichten Protokollen und auf dem von TNO derzeit verwendeten Protokoll (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. Die anerkannten Einsatzgrenzen dieser Prüfmethode beruhen auf der Falsch-Positiv-Rate für Alkohole und den Falsch-Negativ-Raten für Feststoffe und Tenside (siehe Punkt 47) (4). Durch Ausschluss von Stoffen dieser chemischen und physikalischen Klassen aus der Datenbank lässt sich die Genauigkeit des ICE in allen Klassifizierungssystemen (EU, EPA und GHS) erheblich verbessern (4). Für die Zwecke dieser Prüfung (d. h. ausschließliche Identifizierung augenverätzender/stark augenreizender Stoffe) sind Falsch-Negativ-Raten nicht maßgeblich, da diese Stoffe anschließend an Kaninchen oder - je nach Vorschriften - im Rahmen anderer angemessen validierter *In-vitro*-Tests anhand einer sequenziellen Prüfstrategie mit einem evidenzbasierten Bewertungsansatz (*weight of evidence approach*) geprüft werden. Außerdem konnten bestimmte Chemikalien- oder Produktklassen (z. B. Gemische) mit den derzeitigen Validierungsdaten nicht angemessen evaluiert werden. Prüfer könnten diese Prüfmethode jedoch für alle Arten von Prüfmaterial (auch Gemische) einsetzen und ein Positivergebnis als Indikator einer augenverätzenden oder stark augenreizenden Wirkung akzeptieren. Positivergebnisse bei Verwendung von Alkohol sollten angesichts des Risikos von Falsch-Positiv-Prognosen (*over-prediction*) jedoch mit einer gewissen Zurückhaltung interpretiert werden.

7. Bei allen Verfahren, die Hühneraugen involvieren, sollten die geltenden Regeln und Verfahrensvorschriften der Prüfanstalt für den Umgang mit Human- bzw. Tiermaterial eingehalten werden, das auch Gewebe und Gewebeflüssigkeiten umfasst, jedoch nicht darauf beschränkt ist. Universelle Laborregeln sollten beachtet werden (15).

8. Eine Grenze der Prüfmethode liegt darin, dass, obgleich zwar einige der im Kaninchenaugentest evaluierten Reizwirkungen und bis zu einem gewissen Grad auch deren Schwere berücksichtigt werden, Bindehaut- und Irisverletzungen außer Acht gelassen werden. Auch wurde –obwohl sich die Reversibilität von Hornhautläsionen *per se* mit dem ICE nicht beurteilen lässt - ausgehend von Kaninchenaugenstudien dennoch vorgeschlagen, eine Bewertung der anfänglichen Dicke der Hornhautverletzung heranzuziehen, um zwischen irreversiblen und reversiblen Wirkungen zu unterscheiden (16). Schließlich sei auch zu erwähnen, dass eine potenziell mit der Augenexposition verbundene systemische Toxizität nach der ICE-Methode nicht bewertet werden kann.

9. Es laufen Arbeiten, um Eignung und Grenzen des ICE zur Identifizierung von Stoffen mit schwacher Reizwirkung oder von Stoffen ohne Reizwirkung genauer zu charakterisieren (siehe auch Punkt 48). Ferner wird empfohlen, dass Anwender den Validierungsorganisationen Exemplare und/oder Daten zur formellen Prüfung etwaiger künftiger Anwendungsbereiche des ICE übermitteln, auch um Stoffe mit schwacher Reizwirkung oder Stoffe ohne Reizwirkung identifizieren zu können.

10. Laboratorien, die diese Prüfmethode zum ersten Mal anwenden, sollten die in Anlage 2 genannten Leistungschemikalien verwenden. Laboratorien können diese Chemikalien verwenden, um ihre technische Kompetenz zur Durchführung des ICE zu demonstrieren, bevor sie ICE-Testdaten zum Zwecke der vorschriftsmäßigen Gefahrenklassifizierung einreichen.

TESTPRINZIP

11. Die ICE-Prüfmethode ist ein organtypisches Modell, das die Zellstruktur des Hühnerauges *in vitro* kurzfristig funktionsfähig hält. Bei dieser Prüfmethode werden durch die Prüfsubstanz hervorgerufene Schäden als Hornhautschwellungen, Hornhauttrübung und korneale Fluorescein-Verfärbung festgestellt. Während die beiden letztgenannten Parameter eine qualitative Bewertung erfordern, muss die Hornhautschwellung quantitativ bestimmt werden. Jedes Messergebnis wird entweder in einen quantitativen Wert umgerechnet, der seinerseits für die Berechnung eines Gesamtreizindexes (*Overall Irritancy Index*) zugrunde gelegt wird, oder einer Qualitätskategorie zugeordnet, die wiederum für die Einordnung in Klassen für Stoffe mit *in vitro* augenverätzender und stark augenreizender Wirkung herangezogen wird. Jedes dieser Ergebnisse kann alsdann verwendet werden, um das Potenzial einer Prüfsubstanz, *in vivo* Augenverätzungen und starke Augenreizungen hervorzurufen, vorauszusagen (siehe Entscheidungskriterien).

▼M2

**Bezugsquelle und Alter der Hühneraugen**

12. Traditionell werden für diesen Test Augen von Hühnern verwendet, die in einer Schlächterei für den menschlichen Verzehr geschlachtet wurden; auf diese Weise wird der Einsatz von Versuchstieren vermieden. Nur Augen von gesunden Tieren, die für die Nahrungskette geeignet angesehen werden, dürfen verwendet werden.

13. Es wurde keine kontrollierte Studie zur Bestimmung des optimalen Alters der Hühner durchgeführt, doch werden für diesen Test traditionsgemäß Hühner verwendet, bei denen es sich nach Alter und Gewicht um Junghühner handelt (d. h. Hühner im Alter von ungefähr sieben Wochen mit einem Gewicht von 1,5 bis 2,5 kg), die in der Regel in einer Geflügelschlächterei geschlachtet werden.

**Gewinnung und Beförderung der Augen zum Labor**

14. Die Köpfe sollten unmittelbar nach dem Betäuben der Tiere, normalerweise durch Elektroschock, und nach dem Entbluten durch Nackenstich abgesetzt werden. Sie sollten aus einer in Nähe des Labors gelegenen Quelle bezogen werden, um die Köpfe möglichst schnell vom Schlachthof zum Labor befördern zu können, damit sich ihr Zustand nicht verschlechtert und/oder Bakterienkontaminationen auf ein Mindestmaß begrenzt werden. Der Zeitabstand zwischen der Gewinnung der Hühnerköpfe und der Verwendung der Augen im ICE sollte möglichst gering sein (d. h. höchstens zwei Stunden betragen) und die Testergebnisse nachweislich nicht kompromittieren. Letztere hängen von den Auswahlkriterien für die Augen sowie von den Reaktionen der Positiv- und Negativkontrollen ab. Alle im Test verwendeten Augen sollten aus derselben Partie Augen stammen, die an ein und demselben Tag gewonnen wurden.

15. Da die Augen im Labor seziert werden, sind die intakten Köpfe in Kunststoffbehältnissen, die mit Tüchern, welche in isotonischer Kochsalzlösung getränkt wurden, ausgeschlagen sind, und bei Umgebungstemperatur vom Schlachthof zum Labor zu befördern.

**Auswahlkriterien für Augen, die im ICE-Test eingesetzt werden**

16. Augen mit starker Ausgangs-Fluorescein-Verfärbung (d. h. > 0,5) oder mit starker Hornhauttrübung (d. h. > 0,5) nach der Ausschälung werden verworfen.

17. Jede Behandlungsgruppe und die konkurrierende Positivkontrolle umfassen mindestens drei Augen. Die Negativkontrollen bzw. die Lösungsmittelkontrolle (wenn ein anderes Lösungsmittel als Kochsalzlösung verwendet wird) bestehen aus mindestens einem Auge.

VERFAHREN

**Präparieren der Augen**

18. Die Augenlider werden sorgfältig weggeschnitten, wobei darauf zu achten ist, dass die Hornhaut nicht beschädigt wird. Die Unversehrtheit der Hornhaut wird mithilfe eines Tropfens von 2 %igem (w/v) Natrium-Fluorescein, der für einige Sekunden auf die Hornhautoberfläche appliziert und anschließend mit isotonischer Kochsalzlösung abgespült wird, schnell überprüft. Fluorescein-behandelte Augen werden sodann mit einem Spaltlampenmikroskop auf Hornhautschädigung untersucht (d. h. Fluorescein-Verfärbung und Hornhauttrübungswerte müssen ≤ 0,5 betragen).

19. Liegt keine Schädigung vor, wird das Auge weiter freigelegt, wobei dafür Sorge zu tragen ist, dass die Hornhaut nicht beschädigt wird. Der Augapfel wird aus der Augenhöhle herausgezogen, indem die Nickhaut mithilfe einer chirurgischen Zange festgehalten und die Augenmuskulatur mit einer gebogenen, stumpfendigen Schere durchtrennt wird. Dieser Schritt ist wichtig, um zu vermeiden, dass die Hornhaut durch übermäßigen Druck geschädigt wird (Kompressionsartefakte).

20. Beim Herauslösen des Auges aus der Augenhöhle sollte ein sichtbarer Teil des Sehnervs noch anhaften. Das Auge wird anschließend auf eine saugfähige Unterlage gesetzt, und Nickhaut sowie anderes Bindegewebe werden weggeschnitten.

▼M2

21. Das auf diese Weise ausgeschälte Auge wird in einer Klemme aus rostfreiem Stahl fixiert, wobei die Hornhaut vertikal positioniert sein muss. Die Klemme wird sodann in eine Kammer des Superfusionsgeräts gesetzt (16). Im Superfusionsgerät sollten die Klemmen so positioniert werden, dass die gesamte Hornhaut mit der Kochsalzinfusion versorgt wird. Die Temperatur in den Kammern des Superfusionsgeräts sollte auf 32 ± 1,5 °C gehalten werden. Anlage 3 zeigt ein Schaubild eines typischen Superfusionsgeräts mit Augenklemmen; das Gerät ist im Handel fertig oder als Bausatz erhältlich. Es kann den Bedürfnissen des jeweiligen Labors angepasst werden (z. B. um Augen in verschiedener Anzahl aufzunehmen).

22. Nach dem Einsetzen ins Superfusionsgerät werden die Augen erneut mit einem Spaltlampenmikroskop untersucht, um sicherzustellen, dass sie während des Sezierens nicht beschädigt wurden. Bei dieser Gelegenheit sollte mit dem Pachometeraufsatz des Spaltlampenmikroskops auch die Hornhautdicke im Apex gemessen werden. Augen mit i) einer Fluorescein-Verfärbung von > 0,5, ii) einer Hornhauttrübung von > 0,5 oder iii) etwaigen anderen Anzeichen einer Schädigung sollten ersetzt werden. Einzelne Augen, auf die keines der genannten Kriterien zutrifft, werden verworfen, wenn sie eine Hornhautdicke aufweisen, die mehr als 10 % vom durchschnittlichen Dickenwert aller Augen zusammengerechnet abweicht. Anwender sollten sich darüber im Klaren sein, dass Spaltlampenmikroskope mit unterschiedlicher Spaltbreiteneinstellung unterschiedliche Dickenmesswerte ergeben können. Die Spaltbreite sollte auf 0,095 mm eingestellt sein.

23. Sobald alle Augen untersucht und für einwandfrei befunden wurden, werden sie zwecks Äquilibrierung des Testsystems vor Applikation der Prüfsubstanz für ungefähr 45 bis 60 Minuten inkubiert. Nach der Äquilibrierung werden Referenzmessungen von Hornhautdicke und Hornhauttrübung zum Zeitpunkt Null vorgenommen, welche als Referenzszenario dienen (d. h. Zeitpunkt = 0). Der beim Sezieren ermittelte Fluorescein-Wert wird als Referenzmesswert für diesen Endpunkt verwendet.

**Applikation der Prüfsubstanz**

24. Unmittelbar nach den Referenzmessungen zum Null-Zeitpunkt wird das Auge (in seiner Halterung) aus dem Superfusionsgerät entnommen, und zur Applikation der Prüfsubstanz auf die Hornhaut horizontal positioniert.

25. Flüssige Prüfsubstanzen werden in der Regel unverdünnt getestet, können jedoch verdünnt werden, sofern dies für notwendig gehalten wird (z. B. als Teil des Studienkonzepts). Bevorzugtes Lösungsmittel für verdünnte Stoffe ist physiologische Kochsalzlösung. Unter kontrollierten Bedingungen können auch alternative Lösungsmittel verwendet werden, deren Eignung jedoch nachgewiesen werden sollte.

26. Flüssige Prüfsubstanzen werden so auf die Hornhaut appliziert, dass die gesamte Hornhautoberfläche gleichmäßig von der Prüfsubstanz bedeckt ist; das Standardvolumen beträgt 0,03 mL.

27. Feste Prüfsubstanzen sollten wenn möglich im Mörser oder mit einem vergleichbaren Zerkleinerungsgerät so fein wie möglich gemahlen werden. Das Pulver wird so auf die Hornhaut appliziert, dass die Oberfläche von der Prüfsubstanz gleichmäßig bedeckt ist; die Standardmenge beträgt 0,03 g.

28. Die Prüfsubstanz (flüssig oder fest) wird für 10 Sekunden appliziert und anschließend mit isotonischer Kochsalzlösung (ungefähr 20 mL) bei Umgebungstemperatur vom Auge abgespült. Das Auge (in seiner Halterung) wird anschließend wieder in aufrechter Ausgangsstellung in das Superfusionsgerät eingesetzt.

**Kontrollsubstanzen**

29. Jeder Versuch sollte konkurrierende Negativ- oder Lösungsmittel-/-Vehikelkontrollen und konkurrierende Positivkontrollen umfassen.

▼M2

30. Beim Prüfen unverdünnter (100 % iger) Flüssigkeiten oder Feststoffe wird als konkurrierende Negativkontrolle im ICE-Test physiologische Kochsalzlösung verwendet, um unspezifische Veränderungen im Testsystem festzustellen und um sicherzustellen, dass die Testbedingungen keine ungerechtfertigten Reizwirkungen hervorrufen.

31. Zum Testen verdünnter Flüssigkeiten umfasst der Test auch eine Gruppe konkurrierender Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen, um unspezifische Veränderungen im Testsystem nachzuweisen und um sicherzustellen, dass die Testbedingungen keine ungerechtfertigten Reizwirkungen hervorrufen. Wie unter Punkt 25 erwähnt, sind nur Lösungsmittel/Vehikel zulässig, die das Testsystem nachweislich nicht beeinträchtigen.

32. Jeder Versuch umfasst als konkurrierende Positivkontrolle einen bekannten Augenreizstoff, damit überprüft werden kann, ob eine adäquate Wirkung eintritt. Da der ICE-Test bei dieser Prüfmethode eingesetzt wird, um verätzende oder stark reizende Stoffe zu identifizieren, sollte es sich bei der Positivkontrolle um eine Referenzsubstanz handeln, die bei dieser Prüfmethode eine starke Wirkung hervorruft. Um zu gewährleisten, dass die Veränderlichkeit der Reaktion der Positivkontrolle im Zeitverlauf bewertet werden kann, sollte die Reaktionsstärke nicht allzu heftig sein. Es sollten genügend *In-vitro*-Daten für die Positivkontrolle generiert werden, damit eine statistisch vorgegebene vertretbare Spanne für die Positivkontrolle berechnet werden kann. Liegen für eine bestimmte Positivkontrolle keine angemessenen historischen Daten zur ICE-Prüfmethode vor, so können Studien erforderlich werden, um die erforderlichen Daten zu generieren.

33. Beispiele für Positivkontrollen für flüssige Prüfsubstanzen sind 10 % ige Essigsäure oder 5 % iges Benzalkoniumchlorid, während für Positivkontrollen für feste Prüfsubstanzen Natriumhydroxid oder Imidazol in Frage kommen.

34. Referenzsubstanzen sind nützlich für die Evaluierung des AugenReizpotenzials unbekannter Chemikalien einer bestimmten Chemikalien- oder Produktklasse oder zur Evaluierung des relativen Reizpotenzials eines Augenreizstoffes innerhalb einer spezifischen Spanne von Reizwirkungen.

**Gemessene Endpunkte**

35. Behandelte Hornhäute werden vor der Behandlung evaluiert sowie in Abständen von 30, 75, 120, 180 und 240 Minuten (± 5 Minuten) nach dem Abspülen im Anschluss an die Behandlung. Diese Zeitreihe gestattet eine angemessene Anzahl von Messungen während des vierstündigen Behandlungszeitraums und lässt genügend Zeit zwischen den Messungen, um alle Augen vorschriftsgemäß beobachten zu können.

36. Die evaluierten Endpunkte sind Hornhauttrübung, Hornhautschwellung, Fluorescein-Verfärbung und morphologische Effekte (z. B. durchlöchertes oder abgelöstes Epithel). Alle Endpunkte mit Ausnahme der Fluorescein-Verfärbung (die ausschließlich vor der Behandlung sowie 30 Minuten nach Applikation der Prüfsubstanz ermittelt wird) werden zu jedem der vorgenannten Zeitpunkte bestimmt.

37. Hornhauttrübung, Fluorescein-Verfärbung, morphologische Effekte und, sofern sie vorliegen, histopathologische Befunde sollten fotografiert werden.

38. Nach der abschließenden Untersuchung am Ende des vierstündigen Behandlungszeitraums sollten die Augen in einer geeigneten Fixierlösung (z. B. neutrales gepuffertes Formalin) aufbewahrt werden, damit sie gegebenenfalls histopathologisch untersucht werden können.

▼**M2**

39. Hornhautschwellungen werden durch Hornhautdickenmessungen bestimmt, die mit dem optischen Pachometeraufsatz eines Spaltlampenmikroskops vorgenommen werden. Der Schwellungsmesswert wird als Prozentsatz ausgedrückt und auf Basis der Hornhautdickenmesswerte nach folgender Formel berechnet:

$$\left[\frac{Hornhaut\ -\ Dicke\ zum\ Zeitpunkt\ t - Hornhaut\ -\ Dicke\ zum\ Zeitpunkt\ =\ 0}{Hornhaut - Dicke\ zum\ Zeitpunkt\ =\ 0}\right] \times 100$$

40. Für alle getesteten Augen wird die durchschnittliche Hornhautschwellung (in Prozent) für sämtliche Beobachtungszeitpunkte berechnet. Auf Basis des höchsten Mittelwertes für die Hornhautschwellung (beliebiger Beobachtungszeitpunkt) wird jeder Prüfsubstanz ein Gesamtwert für die Kategorie (*overall category score*) zugeordnet.

41. Die Hornhauttrübung wird anhand der Hornhautfläche berechnet, die am stärksten getrübt ist. Für alle getesteten Augen wird der durchschnittliche Trübungswert für jeden Beobachtungszeitpunkt berechnet. Auf Basis des höchsten Mittelwertes für die Hornhauttrübung (beliebiger Beobachtungszeitpunkt) wird anschließend jede Prüfsubstanz ein Gesamtwert für die Kategorie (*overall category score*) zugeordnet (Tabelle 1).

*Tabelle 1*

Hornhauttrübungswerte

| Wert | Beobachtung |
|---|---|
| 0 | keine Trübung |
| 0,5 | sehr schwache Trübung |
| 1 | gestreute oder diffuse Strukturen; Iris deutlich sichtbar |
| 2 | leicht erkennbare lichtdurchlässige Struktur; Iris weniger deutlich sichtbar |
| 3 | starke Hornhauttrübung; Einzelheiten der Iris nicht sichtbar; Pupillengröße kaum erkennbar |
| 4 | vollständige Trübung/Iris unsichtbar |

42. Für alle getesteten Augen wird die durchschnittliche Fluorescein-Verfärbung nur für den 30-minütigen Beobachtungszeitpunkt berechnet, der zur Berechnung des jeder Prüfsubstanz zugeordneten Gesamtwertes für die Kategorie herangezogen wird (Tabelle 2).

*Tabelle 2*

Fluorescein-Verfärbung

| Wert | Beobachtung |
|---|---|
| 0 | keine Fluorescein-Verfärbung |
| 0,5 | sehr geringfügige Verfärbung einzelner Zellen |
| 1 | Verfärbung einzelner Zellen auf der gesamten behandelten Fläche der Hornhaut |
| 2 | punktuelle oder konfluierende dichte Zellverfärbung |
| 3 | konfluierende großflächige Fluorescein-Verfärbung der Hornhaut |

▼M2

43. Morphologische Effekte umfassen „durchlöcherte“ Hornhaut-Epithelzellen, „abgelöste“ Epithelzellen, „aufgeraute“ Hornhautoberfläche und „Verklebung“ der Hornhaut mit der Prüfsubstanz. Diese Befunde können unterschiedlich stark ausgeprägt sein und gleichzeitig auftreten. Ihre Einstufung erfolgt subjektiv je nach Auswertung des Prüfers.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Datenauswertung**

44. Die Ergebnisse für die Hornhauttrübung, die Hornhautschwellung und die Fluorescein-Verfärbung sollten einzeln evaluiert werden, um für jeden Endpunkt eine ICE-Klasse zu generieren. Kombiniert ergeben die ICE-Klassen für die einzelnen Endpunkte eine Reizklasse (*Irritancy Classification*) für die einzelnen Prüfsubstanzen.

**Entscheidungskriterien**

45. Nach der Evaluierung jedes Endpunktes können die ICE-Klassen entsprechend einer vorgegebenen Spanne zugeordnet werden. Die Auswertung der Hornhautdicke (Tabelle 3), der Hornhauttrübung (Tabelle 4) und der Fluorescein-Verfärbung (Tabelle 5) und ihre Einstufung in vier ICE-Klassen erfolgen in folgender Rangordnung:

*Tabelle 3*

Kriterien für die Einstufung in ICE-Klassen - Hornhautdicke

| Durchschnittliche Hornhautschwellung (in %) (*) | ICE-Klasse |
|---|---|
| 0 bis 5 | I |
| > 5 bis 12 | II |
| > 12 bis 18 (> 75 Minuten nach der Behandlung) | II |
| > 12 bis 18 (≤ 75 Minuten nach der Behandlung) | III |
| > 18 bis 26 | III |
| > 26 bis 32 (> 75 nach der Behandlung) | III |
| > 26 bis 32 (≤ 75 Minuten nach der Behandlung) | IV |
| > 32 | IV |

(*) Die Werte für die Hornhautschwellung sind nur gültig, wenn die Dicke mit einem Haag-Streit-BP900-Spaltlampenmikroskop mit Tiefenmessgerät Nr. I und einer Spaltbreiteneinstellung 9,5 (= 0,095 mm) gemessen wird. Anwender sollten sich darüber im Klaren sein, dass Spaltlampenmikroskope mit unterschiedlicher Spaltbreiteneinstellung unterschiedliche Dickenmesswerte ergeben können.

*Tabelle 4*

Kriterien für die Einstufung in ICE-Klassen - Hornhauttrübung

| Durchschnittlicher Höchstwert für die Hornhauttrübung (*) | ICE-Klasse |
|---|---|
| 0,0-0,5 | I |
| 0,6-1,5 | II |
| 1,6-2,5 | III |
| 2,6-4,0 | IV |

(*) Siehe Tabelle 1.

▼**M2**

*Tabelle 5*

Kriterien für die Einstufung in ICE-Klassen - durchschnittliche Fluorescein-Verfärbung

| Durchschnittliche Verfärbung 30 Minuten nach der Behandlung (*) | ICE-Klasse |
|---|---|
| 0,0-0,5 | I |
| 0,6-1,5 | II |
| 1,6-2,5 | III |
| 2,6-3,0 | IV |

(*) Siehe Tabelle 2.

46. Die Gesamtklassifizierung des *In-vitro*-Reizpotenzials (*overall in vitro irritancy classification*) einer Prüfsubstanz richtet sich nach der Reizklasse (*irritancy classification*), die der Kombination von Kategorien entspricht, die für die Hornhautschwellung, die Hornhauttrübung und die Fluorescein-Verfärbung ermittelt wurden, und wird nach dem Schema in Tabelle 6 vorgenommen.

*Tabelle 6*

Gesamtklassifizierung des *In-vitro*-Reizpotenzials

| Klassifizierung | Kombinationen der drei Endpunkte |
|---|---|
| verätzend / stark reizend | 3 × IV<br>2 × IV, 1 × III<br>2 × IV, 1 × II (*)<br>2 × IV, 1 × I (*)<br>Hornhauttrübung ≥ 3 nach 30 Min. (bei mindestens zwei Augen)<br>Hornhauttrübung = 4 zu beliebigem Zeitpunkt (bei mindestens zwei Augen)<br>starkes Ablösen der Epithel-Zellschicht (bei mindestens einem Auge) |

(*) weniger gängige Kombinationen.

47. Wie unter Punkt 1 bereits erwähnt, sollte die Prüfsubstanz, soweit er nicht als Stoff mit augenverätzender oder stark augenreizender Wirkung identifiziert wurde, zu Einstufungs- und Kennzeichnungszwecken zusätzlich getestet werden. Gemessen an Daten aus *In-vivo*-Kaninchenaugentests, die nach den EPA-(1)-, EU-(2)- oder GHS-(3)-Klassifizierungssystemen eingestuft wurden, zeichnet sich der ICE hinsichtlich der Identifizierung von Stoffen mit augenverätzender oder stark augenreizender Wirkung durch eine allgemeine Genauigkeit von 83 % (120/144) bis 87 % (134/154), eine Falsch-Positiv-Rate von 6 % (7/122) bis 8 % (9/116) und eine Falsch-Negativ-Rate von 41 % (13/32) bis 50 % (15/30) aus. Werden Stoffe einer bestimmten Chemikalienklasse (d. h. Alkohole und Tenside) oder einer bestimmten physikalischen Klasse (d. h. Feststoffe) aus der Datenbank ausgeschlossen, so liegen die Genauigkeit des ICE gemessen an den EU-, EPA- und GHS-Klassifizierungssystemen zwischen 91 % (75/82) und 92 % (69/-75), die Falsch-Positiv-Raten zwischen 5 % (4/73) und 6 % (4/70) und die Falsch-Negativ-Raten zwischen 29 % (2/7) und 33 % (3/9) (4).

48. Selbst wenn die augenverätzende oder stark augenreizende Wirkung einer Prüfsubstanz nicht klassifiziert werden kann, können Daten aus dem ICE in Kombination mit Testdaten aus dem *In-vivo*-Kaninchenaugentest oder aus einem angemessen validierten *In-vitro*-Test zweckdienlich sein, um Eignung und Grenzen des ICE zur Identifizierung von schwach augenreizenden Stoffen und von Stoffen ohne Reizwirkung besser zu evaluieren (ein Leitfaden für die Anwendung von *In-vitro*-Prüfmethoden zur Untersuchung auf okulare Toxizität wird zur Zeit erarbeitet).

▼M2

**Studienakzeptanzkriterien**

49. Ein Test gilt als akzeptabel, wenn die konkurrierenden Negativ- oder Vehikel-/Lösungsmittelkontrollen sowie die konkurrierenden Positivkontrollen eine Reizklasse ergeben, die unter die Kategorien „Stoffe ohne Reizwirkung“ bis hin zu „Stoffe mit starker Reizwirkung/Ätzwirkung“ fällt.

**Testbericht**

50. Der Testbericht sollte die folgenden Informationen umfassen, soweit sie für die Studie relevant sind:

*Prüfsubstanzen und Kontrollsubstanzen*

Chemische Bezeichnung(en) wie der vom *Chemical Abstracts Service* (CAS) benutzte strukturelle Name, gefolgt von anderen Bezeichnungen, soweit bekannt;

die CAS-Registrierungsnummer (CAS-Nr.), soweit bekannt;

Reinheit und Zusammensetzung des Stoffes oder des Gemisches (in Gewichtsprozent(en)), soweit diesbezügliche Informationen vorliegen;

Physiko-chemikalische Eigenschaften wie physikalischer Zustand, Flüchtigkeit, pH-Wert, Stabilität, Chemikalienklasse, Wasserlöslichkeit, soweit sie für die Studie relevant sind;

Behandlung der Prüfsubstanzen/Kontrollsubstanzen vor der Testung, soweit zutreffend (z. B. Erwärmung, Zerkleinerung);

Stabilität, soweit bekannt.

*Informationen zu Auftraggeber und Prüfanstalt*

Name und Anschrift des Auftraggebers, der Prüfanstalt und des Studienleiters;

Angaben zur Identifizierung der Bezugsquelle der Augen (d. h. Einrichtung, in der sie gewonnen wurden);

Lager- und Transportbedingungen der Augen (z. B. Datum und Uhrzeit der Gewinnung, Zeitspanne vor Testbeginn);

soweit bekannt, spezifische Daten betreffend die Tiere, von denen die Augen gewonnen wurden (z. B. Alter, Geschlecht, Gewicht des Spendertieres).

*Begründung der Prüfmethode und des angewandten Protokolls*

*Integrität der Prüfmethode*

Das zur Gewährleistung der Integrität (d. h. Genauigkeit und Zuverlässigkeit) der Prüfmethode im Zeitverlauf angewandte Verfahren (z. B. regelmäßige Testung von Leistungsstoffen, Hinzuziehung historischer Daten über Negativ- und Positivkontrollen).

*Testakzeptanzkriterien*

gegebenenfalls akzeptable Reihen konkurrierender Referenzkontrollen aufgrund historischer Daten;

*Testbedingungen*

Beschreibung des angewandten Testsystems;

verwendetes Spaltlampenmikroskop (z. B. Modell);

Einstellungen des verwendeten Spaltlampenmikroskops;

Angaben zu den verwendeten Hühneraugen, einschließlich Qualitätsbestätigungen;

▼M2

Einzelheiten des angewandten Testverfahrens;

verwendete Prüfsubstanzkonzentration(en);

Beschreibung etwaiger Änderungen am Testverfahren;

Verweis auf historische Modelldaten (z. B. Negativ- und Positivkontrollen, Leistungsstoffe, Referenzsubstanzen);

Beschreibung der angewandten Bewertungskriterien;

*Ergebnisse*

Beschreibung sonstiger festgestellter Wirkungen;

gegebenenfalls Aufnahmen vom Auge;

*Erörterung der Ergebnisse*

*Schlussfolgerung*

LITERATURANGABEN

(1) U.S. EPA (1996). *Label Review Manual*: Zweite Ausgabe. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1.

(3) (UN) (2007). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. Zweite überarbeitete Ausgabe, New York & Genf, 2007. Verfügbar unter:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ICCVAM (2007). *Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)*. NIH-Veröffentlichung Nr. 07-4517. Verfügbar unter:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(5) ESAC (2007). *Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic in vitro assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants*. Verfügbar unter:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(6) Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. ABl. L 396 vom 30.12.2006, S. 1.

(7) OECD (2002). Testrichtlinie 405. *OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion*. Verfügbar unter:

[http://www.oecd.org/document/40/0, 2340, en 2649 34377 37051368 1 1 1 1,00.html]

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007). *ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - In Vitro Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)*. NIH-Veröffentlichung Nr. 07-4517. Verfügbar unter:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). *Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method*. NIH-Veröffentlichung Nr. 06-4513. *Research Triangle Park: National Toxicology Program*. Verfügbar unter:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) Prinsen, M.K. und Koëter, B.W.M. (1993). *Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits*. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) INVITTOX (1994). Protokoll Nr. 80: *Chicken enucleated eye test* (CEET). Verfügbar unter:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. und Spielmann H. (1995). *The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test*. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). *The chicken enucleated eye test* (CEET): *A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials*. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. und Prinsen, M.K. (1997). IRAG-Arbeitsgruppe I: *Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation*. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. und das Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). *Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings*. Verfügbar unter:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) Maurer, J.K., Parker, R.D. und Jester, J.V. (2002). *Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays*. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(17) Burton, A.B.G., M. York und R.S. Lawrence (1981). *The in vitro assessment of severe irritants*. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006). Background review document, *Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method*. Verfügbar unter:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(19) ICCVAM (2006). Background review document, *Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method*. Verfügbar unter:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

*Anlage 1*

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

**Genauigkeit:** Der Grad der Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und anerkannten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der „Relevanz". Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung" verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode.

**Referenzsubstanz:** Eine zum Vergleich mit einer Prüfsubstanz verwendete Bezugsgröße. Eine Referenzsubstanz sollte die folgenden Eigenschaften aufweisen: i) beständige und zuverlässige Quelle(n); ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zur Klasse der geprüften Stoffe; iii) bekannte physikalische/chemische Eigenschaften; (iv) unterstützende Daten zu bekannten Wirkungen; v) bekannte Potenz innerhalb der erwünschten Wirkungsspanne.

**Hornhaut:** Der Iris und Pupille überdeckende transparente vordere Teil des Augapfels, über den Licht ins Augeninnere übertragen wird.

**Hornhauttrübung:** Messwert für die Undurchsichtigkeit der Hornhaut nach Applikation einer Prüfsubstanz. Eine verstärkte Hornhauttrübung ist ein Indikator für die Schädigung der Hornhaut.

**Hornhautschwellung:** Objektiver Messwert im Rahmen des ICE für die Umfangszunahme der Hornhaut nach Applikation einer Prüfsubstanz. Der Wert wird als Prozentsatz ausgedrückt und auf Basis von Referenz-Hornhautdickenmessungen (Messung vor der Applikation) und der in regelmäßigen Abständen nach der Applikation der Prüfsubstanz im ICE aufgezeichneten Dicke berechnet. Das Ausmaß der Hornhautschwellung ist ein Indikator der Hornhautschädigung.

**EPA-Kategorie 1:** Verätzende Wirkung (irreversible Schädigung des Augengewebes) oder Hornhautkomplikation oder -reizwirkung, die über 21 Tage lang anhält (1).

**EU-Kategorie R41:** Schädigung des Augengewebes oder schwere physikalische Beeinträchtigung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfsubstanz auf die Vorderfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig zurückgeht (2).

**Falsch-Negativ-Rate:** Der Anteil aller positiven Substanzen, die von einer Prüfmethode fälschlicherweise als negativ identifiziert werden. Die Falsch-Negativ-Rate ist ein Leistungsindikator der Prüfmethode.

**Falsch-Positiv-Rate:** Der Anteil aller negativen Substanzen, die von einer Prüfmethode fälschlicherweise als positiv identifiziert werden. Die Falsch-Positiv-Rate ist ein Leistungsindikator der Prüfmethode.

**Fluorescein-Verfärbung:** Subjektiver Messwert im Rahmen des ICE für die Fluorescein-Natrium-Verfärbung der Epithel-Zellen in der Hornhaut nach Applikation einer Prüfsubstanz. Das Ausmaß der Fluorescein-Verfärbung ist ein Indikator der Schädigung der kornealen Epithel-Zellen.

**GHS (Globales Harmonisierte System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien):** Ein System zur Klassifizierung von Chemikalien (Stoffe und Gemische) nach standardisierten Typen und Stufen physikalischer, gesundheitlicher und ökologischer Gefahren und zur entsprechenden Kennzeichnung durch Piktogramme, Signalwörter, Gefahrenhinweise, Sicherheitshinweise und Sicherheitsdatenblätter, um zum Schutz des Menschen (einschließlich Arbeitgeber, Arbeiter, Spediteure, Verbraucher und Notfall-Einsatzkräfte) und der Umwelt Informationen über die schädlichen Wirkungen der betreffenden Chemikalien zu verbreiten (3).

▼M2

**GHS-Kategorie 1:** Schädigung des Augengewebes oder schwere physikalische Beeinträchtigung des Sehvermögens nach Applikation einer Prüfsubstanz auf die Vorderfläche des Auges, die innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation nicht vollständig zurückgeht (3).

**Gefahr:** Inhärente Eigenschaft eines Stoffes oder eines Umfelds mit dem Potenzial, einen Organismus, ein System oder eine (Sub)population bei Exposition gegenüber diesem Stoff zu schädigen.

**Negativkontrolle:** Ein unbehandeltes Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält. Diese Probe wird mit Prüfsubstanzbehandelten Proben oder anderen Kontrollproben mitgeführt, um festzustellen, ob das Lösungsmittel mit dem Testsystem interagiert.

**Stoffe ohne Reizwirkung:** Stoffe, die nicht als Augenreizstoffe der EPA-Kategorien I, II oder III, der EU-Kategorien R41 oder R36 oder der GHS-Kategorien 1, 2A oder 2B eingestuft sind (1) (2) (3).

**Augenverätzende Stoffe:** a) Stoffe, die das Augengewebe irreversibel schädigen; b) Stoffe, die als Augenreizstoffe der GHS-Kategorie 1, der EPA-Kategorie I oder der EU-Kategorie R41 eingestuft sind (1) (2) (3).

**Augenreizende Stoffe:** a) Stoffe, die nach Applikation auf die Vorderfläche des Auges eine reversible Augenschädigung verursachen; b) Stoffe, die als Augenreizstoffe der EPA-Kategorie II oder III, der EU-Kategorie R36 oder der GHS-Kategorien 2A oder 2B eingestuft sind (1) (2) (3).

**Stark augenreizende Stoffe:** a) Stoffe, die nach Applikation auf die Vorderfläche des Auges das Augengewebe derart schädigen, dass die Schädigung nicht innerhalb von 21 Tagen nach der Applikation des Stoffes zurückgeht oder dass das Sehvermögen schwer beeinträchtigt ist; b) Stoffe, die als Augenreizstoffe der GHS-Kategorie 1, der EPA-Kategorie I oder der EU-Kategorie R41 eingestuft sind (1) (2) (3).

**Positivkontrolle:** Ein Replikat, das alle Komponenten eines Testsystems enthält und mit einem Stoff behandelt wird, der bekanntermaßen eine positive Reaktion hervorruft. Um sicherzustellen, dass Abweichungen bei der Positivkontrollreaktion im Zeitverlauf bewertet werden können, sollte die Reaktion nicht zu heftig sein.

**Zuverlässigkeit:** Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Die Zuverlässigkeit wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet.

**Spaltlampen-Mikroskop:** Ein Instrument zur direkten Untersuchung des Auges, vergrößert mit einem binokularen Aufrechtbild-Stereomikrosop. Beim ICE-Test wird dieses Instrument eingesetzt, um die Vorderkammern des Hühnerauges visuell zu untersuchen und um die Hornhautdicke anhand eines Pachometer-Aufsatzes objektiv zu messen.

**Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle:** Eine unbehandelte Probe, die alle Komponenten eines Testsystems enthält, einschließlich des Lösungsmittels oder Vehikels und die mit den Prüfsubstanzbehandelten und anderen Kontrollproben mitgeführt wird, um die Referenzreaktion für die mit der Prüfsubstanz behandelten Proben, die im selben Lösungsmittel oder Vehikel aufgelöst wurden, zu bestimmen. Bei der Testung mit einer konkurrierenden Negativkontrolle zeigt diese Probe außerdem an, ob das Lösungsmittel oder Vehikel mit dem Testsystem interagiert.

▼M2

**Stufenweiser Prüfansatz:** Eine schrittweise Prüfstrategie, bei der allen vorhandenen Informationen über eine Prüfsubstanz in einer vorgegebenen Reihenfolge überprüft werden, wobei auf jeder Stufe nach dem evidenzbasierten Bewertungsansatz (*weight-of-evidence*) vorgegangen wird, um feststellen zu können, ob genügend Informationen für eine Gefahrenklassifizierung vorliegen, bevor zur nächsten Stufe übergangen wird. Wenn das Reizpotenzial einer Prüfsubstanz auf Basis der vorliegenden Informationen zugeordnet werden kann, sind keine weiteren Testungen erforderlich. Ist dies nicht der Fall, müssen schrittweise sequenzielle Tierversuche durchgeführt werden, bis eine eindeutige Klassifizierung vorgenommen werden kann.

**Validierte Prüfmethode:** Eine Prüfmethode, für die zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien abgeschlossen wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht genau und zuverlässig genug ist, um für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert zu werden.

**Evidenzbasierte Bewertung:** Der Prozess der Prüfung der Stärken und Schwächen verschiedener Informationen, um über das Gefahrenpotenzial eines Stoffes entscheiden zu können und diese Entscheidung zu untermauern.

▼M2

*Anlage 2*

LEISTUNGSSTOFFE FÜR DEN ICE

Vor der routinemäßigen Anwendung eines Tests, der den Anforderungen der vorliegenden Prüfmethode genügt, können Laboratorien ihre technische Kompetenz demonstrieren, indem sie die zehn in Tabelle 1 empfohlenen Stoffe in die richtige Ätzwirkungsklasse einstufen. Die Stoffe wurden so ausgewählt, dass sie die Bandbreite lokaler Augenreizungs-/Augenverätzungswirkungen repräsentieren, die auf den Ergebnissen des *In-vivo*-Kaninchenaugentests basieren (TG 405) (d. h. Kategorien 1, 2A, 2B oder „nicht eingestuft und nicht gekennzeichnet“ nach dem UN-GHS-System (3) (7). Angesichts der validierten Eignung dieser Tests (d. h. Tests zur ausschließlichen Identifizierung augenverätzender/-stark augenreizender Stoffe) kann die Kompetenz des Labors jedoch nur anhand von zwei Klassifizierungsergebnissen (verätzend/stark reizend oder nicht verätzend/schwach reizend) demonstriert werden. Weitere Auswahlkriterien betrafen die Erhältlichkeit der Stoffe im Handel, die Verfügbarkeit hochwertiger *In-vivo*-Referenzdaten und das Vorhandensein hochwertiger Daten aus zwei *In-vitro*-Methoden, für die zurzeit Testrichtlinien erarbeitet werden. Aus diesem Grunde wurden die Reizstoffe aus der von der ICCVAM empfohlenen Liste von 122 Referenzsubstanzen für die Validierung von *In-vitro*-Prüfmethoden zur Untersuchung auf okulare Toxizität ausgewählt (siehe Anhang H: von ICCVAM empfohlene Referenzsubstanzen) (4). Referenzdaten können aus den *Background Review Documents* der ICCVAM für die BCOP-Prüfmethode (Test an der isolierten Rinderhornhaut) und die ICE-Prüfmethode bezogen werden (18) (19).

*Tabelle 1*

Empfohlene Stoffe für die Demonstration der technischen Kompetenz von Laboratorien zur Durchführung des ICE

| Stoff | CAS-Nr. | Chemikalienklasse ([1]) | Physikalischer Zustand | *In-vivo*-Klassifizierung ([2]) | *In-vitro*-Klassifizierung ([3]) |
|---|---|---|---|---|---|
| Benzalkoniumchlorid (5 %) | 8001-54-5 | Oniumverbindung | flüssig | Kategorie 1 | verätzend/stark reizend |
| Chlorhexidin | 55-56-1 | Amin, Amidin | fest | Kategorie 1 | verätzend/stark reizend |
| Dibenzoyl-D-Weinsäure | 2743-38-6 | Carbonsäure, Ester | fest | Kategorie 1 | verätzend/stark reizend |
| Imidazol | 288-32-4 | heterocyclisch | fest | Kategorie 1 | verätzend/stark reizend |
| Trichloressigsäure (30 %) | 76-03-9 | Carbonsäure | flüssig | Kategorie 1 | verätzend/stark reizend |
| 2,6-Dichlorbenzoylchlorid | 4659-45-4 | Acylhalolenid | flüssig | Kategorie 2A | Nicht verätzend/ schwach reizend |
| Ethyl-2-methylacetoacetat | 609-14-3 | Ketone, Ester | flüssig | Kategorie 2B | Nicht verätzend/ schwach reizend |
| Ammoniumnitrat | 6484-52-2 | Anorganisches Salz | fest | Kategorie 2A | Nicht verätzend/ schwach reizend |

▼**M2**

| Stoff | CAS-Nr. | Chemikalienklasse ([1]) | Physikalischer Zustand | *In-vivo*-Klassifizierung ([2]) | *In-vitro*-Klassifizierung ([3]) |
|---|---|---|---|---|---|
| Glyzerin | 56-81-5 | Alkohol | flüssig | Nicht eingestuft | Nicht verätzend/ schwach reizend |
| n-Hexan | 110-54-3 | Kohlenwasserstoff (acyclisch) | flüssig | Nicht eingestuft | Nicht verätzend/ schwach reizend |

Abkürzungen: CAS-Nr. = Registrierungsnummer des *Chemical Abstracts Service*

([1]) Jede Prüfsubstanz wurde anhand einer Standard-Klassifizierungsregelung auf Basis des Klassifizierungssystems der *National Library of Medicine Medical Subject Headings* (MeSH) einer Chemikalienklasse zugeordnet (abrufbar über http// www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) gestützt auf Ergebnisse aus dem *In-vivo*-Kaninchenaugentest (OECD TG 405) unter Verwendung des UN-GHS-Klassifizierungssystems (3)(7).

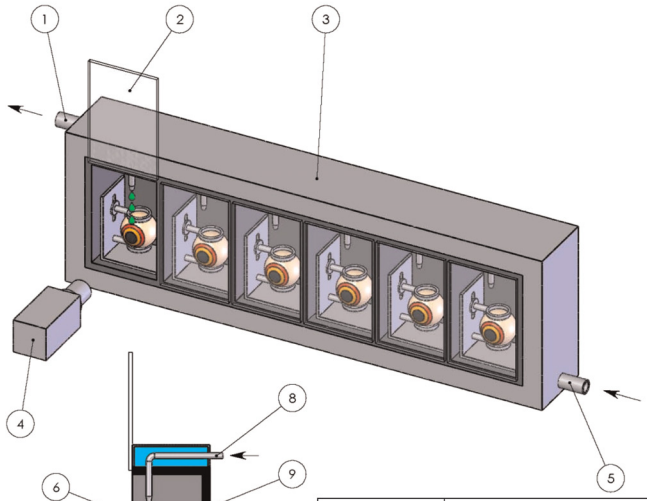
([3]) gestützt auf Ergebnisse der BCOP- und ICE-Prüfmethoden.

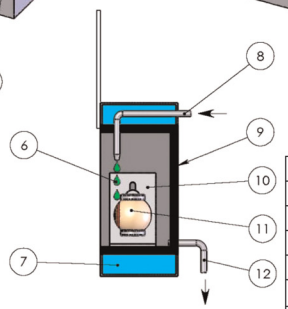
▼M2

*Anlage 3*

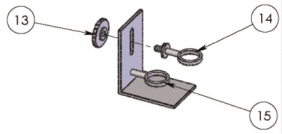
**Schaubilder des ICE-Superfusionsgeräts und der ICE-Augenklemmen**

*(Siehe Burton et al. (17) für weitere generische Beschreibungen von Superfusionsgeräten und Augenklemmen)*




CROSS SECTION COMPARTMENT




EYE HOLDER

| Nr. | BESCHREIBUNG |
|---|---|
| 1 | WARMWASSERAUSLASS |
| 2 | SCHIEBEFENSTER |
| 3 | SUPERFUSIONSGERÄT |
| 4 | OPTISCHES MESSINSTRUMENT |
| 5 | WARMWASSEREINLASS |
| 6 | KOCHSALZLÖSUNG |
| 7 | WARMES WASSER |
| 8 | EINLASS KOCHSALZLÖSUNG |
| 9 | KAMMER |
| 10 | AUGENHALTERUNGSVORRICHTUNG |
| 11 | HÜHNERAUGE |
| 12 | AUSLASS KOCHSALZLÖSUNG |
| 13 | FESTSTELLSCHRAUBE |
| 14 | OBERER JUSTIERBARER FIXIERARM |
| 15 | UNTERER UNBEWEGLICHER FIXIERARM |

▼M3

## B.49. *IN VITRO*-MIKRONUKLEUSTEST AN SÄUGETIERZELLEN

### EINLEITUNG

1. Der *in vitro*-Mikronukleustest (MNvit) ist ein Genotoxizitätstest zum Nachweis von Mikronuklei im Zytoplasma von Interphasezellen. Mikronuklei oder Mikrokerne können aus azentrischen Chromosomenfragmenten (d. h. Chromosomen, denen ein Zentromer fehlt) oder aus ganzen Chromosomen entstehen, die während der Anaphase der Zellteilung nicht zu den Polen wandern können. Der Test weist die Aktivität klastogener und aneugener chemischer Substanzen (Stoffe und Gemische) (1) (2) in Zellen nach, die während oder nach Kontakt mit der Prüfsubstanz eine Zellteilung durchlaufen haben. Die vorliegende Prüfmethode gestattet die Verwendung von Protokollen mit und ohne den Aktin-Polymerisationsinhibitor Cytochalasin B (cytoB). Die Hinzufügung von cytoB vor der angestrebten Mitose ermöglicht die Identifizierung und selektive Analyse der Mikrokernfrequenz in Zellen, die eine Mitose durchlaufen haben, da solche Zellen zwei Kerne aufweisen (3) (4). Diese Prüfmethode gestattet auch die Verwendung von Protokollen ohne Zytokinese-Block, vorausgesetzt es gibt Beweise dafür, dass die analysierte Zellpopulation eine Mitose durchlaufen hat.

2. Zusätzlich zum MNvit-Test zur Identifizierung chemischer Substanzen (Stoffe und Gemische), die Mikrokerne erzeugen, können auch ein Zytokinese-Block, die immunchemische Markierung von Kinetochoren oder die Hybridisierung mit Zentromer- bzw. Telomer-Sonden (Fluoreszenz-*in*-*situ*-Hybridisierung (FISH)) Informationen über die Mechanismen der Chromosomenschädigung und der Bildung von Mikrokernen liefern (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Die Markierungs- und Hybridisierungsverfahren können angewandt werden, wenn eine verstärkte Mikrokernbildung festgestellt wird und der Prüfer erkennen will, ob diese Zunahme das Ergebnis klastogener und/oder aneugener Ereignisse ist.

3. Mikrokerne stellen auf Tochterzellen übertragene Schäden dar, während in Metaphasezellen festgestellte Chromosomenaberrationen unter Umständen nicht übertragen werden. Da Mikrokerne in Zellen im Stadium der Interphase mit relativer Objektivität bewertet werden können, muss das Laborpersonal nur feststellen, ob die Zellen eine Teilung durchlaufen haben oder nicht, und wie viele Zellen einen Mikrokern enthalten. Infolgedessen können die Zubereitungen relativ schnell bewertet werden und die Analyse lässt sich automatisieren. Dies macht es praktisch möglich, Tausende statt Hunderte von Zellen pro Behandlung zu bewerten und so die Aussagekraft des Tests zu erhöhen. Da schließlich die Mikrokerne von verzögert transportierten Chromosomen herrühren können, besteht die Möglichkeit, Aneuploidie induzierende Agenzien nachzuweisen, deren Untersuchung in konventionellen Chromosomenaberrationstests nur schwer möglich ist, z. B. OECD-Prüfrichtlinie 473 (Kapitel B.10 dieses Anhangs) (17). Allerdings gestattet der MNvit-Test die Differenzierung zwischen Polyploidie induzierenden und Klastogenizität verursachenden Chemikalien nur, wenn besondere Techniken wie die in Absatz 2 beschriebene FISH eingesetzt werden.

4. Der MNvit-Test ist eine *in vitro*-Methode, bei der in der Regel kultivierte menschliche Zellen oder Nagetierzellen zum Einsatz kommen. Der Test bildet eine breite Basis für die *in vitro*-Erforschung potenzieller Chromosomenschädigungen, da sowohl Aneugene als auch Klastogene nachgewiesen werden können.

5. Der MNvit-Test ist zuverlässig und wirksam bei einer Vielfalt von Zelltypen und kann mit oder ohne Zusatz von cytoB durchgeführt werden. Umfassende Daten belegen die Validität des MNvit-Tests im Zusammenhang mit unterschiedlichen Nagetier-Zelllinien (CHO, V79, CHL/IU und L5178Y) sowie menschlichen Lymphozyten (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Hierzu zählen insbesondere die internationalen Validierungsstudien, koordiniert durch die Société Française

▼M3

de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22), und die Berichte des International Workshop on Genotoxicity Testing (4) (16). Die verfügbaren Daten wurden außerdem vom Europäischen Zentrum zur Validierung von Alternativmethoden (ECVAM) der Europäischen Kommission in einer retrospektiven Validierungsstudie nach dem *Weight-of-Evidence*-Ansatz neu bewertet, und die Prüfmethode wurde vom Wissenschaftlich Beratenden Ausschuss (ESAC) des ECVM als wissenschaftlich validiert anerkannt (32) (33) (34). Die Verwendung von menschlichen Lymphoblastoidzellen der Zelllinie TK6 (35), von HepG2-Zellen (36) (37) und von primären Embryonalzellen des Syrischen Hamsters (38) wurde beschrieben, obwohl diese Zellen nicht in Validierungsstudien verwendet wurden.

DEFINITIONEN

6. Es gelten die Definitionen gemäß Anlage 1.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

7. *In vitro* durchgeführte Versuche erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Stoffwechsel-Aktivierungssystems, sofern die Zellen nicht im Hinblick auf die zu prüfenden Substanzen metabolisch kompetent sind. Mit diesem exogenen Stoffwechsel-Aktivierungssystem lassen sich die *in vivo*-Bedingungen jedoch nicht gänzlich nachvollziehen. Es sind auch Bedingungen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Ergebnissen führen, die nicht die intrinsische Mutagenität widerspiegeln und möglicherweise aus Faktoren wie markanten Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität oder hochgradiger Zytotoxizität herrühren (39) (40) (41). Wenn die Prüfsubstanz zum Zeitpunkt der Hinzufügung eine Änderung im pH-Wert des Mediums auslöst, sollte der pH-Wert entsprechend angepasst werden, vorzugsweise durch Pufferung der Stammlösung, so dass alle Volumina bei allen Prüfkonzentrationen und für sämtliche Kontrollen gleich bleiben.

8. Zur Analyse der Mikrokerninduktion ist es wesentlich, dass sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Kulturen eine Mitose durchlaufen haben. Das informativste Stadium für die Auswertung von Mikrokernen liegt in Zellen vor, die eine Mitose während oder nach der Behandlung mit der Prüfsubstanz vollzogen haben.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

9. Zellkulturen menschlichen Ursprungs oder von Säugetieren werden sowohl mit als auch ohne Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems in Kontakt mit der Prüfsubstanz gebracht, außer wenn Zellen mit eigener adäquater Metabolisierungskapazität verwendet werden. Für alle Tests sind parallellaufende Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen (VK) und Positivkontrollen (PK) anzulegen.

10. Während oder nach dem Kontakt mit der Prüfsubstanz werden die Zellen so lange kultiviert, dass Chromosomen- oder Spindelschäden zur Bildung von Mikrokernen in Interphasezellen führen können. Zur Induktion einer Aneuploidie sollte die Prüfsubstanz während der Mitose vorhanden sein. Geerntete und gefärbte Interphasezellen werden auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht. Im Idealfall sollten Mikrokerne nur in Zellen ausgewertet werden, die während oder ggf. nach Kontakt mit der Prüfsubstanz eine Mitose durchlaufen haben. In Kulturen, die mit einem Zytokinese-Blocker behandelt wurden, werden deshalb nur zweikernige Zellen ausgewertet. Wenn kein Zytokinese-Blocker verwendet wurde, ist es wichtig nachzuweisen, dass die analysierten Zellen mutmaßlich während oder nach dem Kontakt mit der Prüfsubstanz eine Zellteilung durchlaufen haben. Bei allen Protokollen ist es wichtig nachzuweisen, dass sowohl in den Kontrollkulturen als auch in den behandelten Kulturen eine Zellproliferation stattgefunden hat. Das Ausmaß der von der Prüfsubstanz induzierten Zytotoxizität oder Zytostase sollte in den Kulturen (oder Parallelkulturen) bewertet werden, die auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht werden.

▼M3

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

*Vorbereitungen*

11. Es können kultivierte primäre Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Menschen (5) (19) (42) (43) sowie verschiedene Zelllinien von Nagetieren wie CHO, V79, CHL/IU und L5178Y verwendet werden (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Die Verwendung anderer Zelllinien und -typen sollte anhand ihrer nachgewiesenen Leistung im Test begründet werden, wie im Abschnitt „Akzeptanzkriterien" beschrieben. Da die Hintergrundfrequenz von Mikrokernen die Empfindlichkeit des Tests beeinflusst, empfiehlt es sich, Zelltypen mit einer niedrigen und stabilen Hintergrundfrequenz der Mikrokernbildung zu verwenden.

12. Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Menschen sollten jungen (ca. 18- bis 35-jährigen) gesunden, nicht rauchenden Individuen entnommen werden, die bekanntermaßen in letzter Zeit nicht mit genotoxischen Chemikalien oder Strahlung in Kontakt standen. Wenn Zellen von mehr als einem Spender zur Verwendung gepoolt werden, sollte die Zahl der Spender angegeben werden. Die Mikrokernfrequenz nimmt mit fortschreitendem Alter zu. Dieser Trend ist bei Frauen ausgeprägter als bei Männern (44), was bei der Auswahl von Spenderzellen für die gepoolte Auswertung berücksichtigt werden sollte.

Kulturmedien und Inkubationsbedingungen

13. Zur Kultivierung sind geeignete Kulturmedien- und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße, $CO_2$-Konzentration, Temperatur und Feuchtigkeit) zu verwenden. Etablierte Zelllinien und -stämme sind routinemäßig auf Stabilität der modalen Chromosomenzahl und Mykoplasmaverunreinigung zu überprüfen und sollten bei Verunreinigung oder bei Veränderungen der modalen Chromosomenzahl nicht herangezogen werden. Die normale Zellzyklusdauer sollte zur Festlegung der Inkubationsbedingungen im Prüflabor bekannt sein. Bei Anwendung der Zytokinese-Block-Methode sollte die Konzentration des Zytokinese-Hemmers für den betreffenden Zelltyp optimiert werden und nachweislich eine gute Ausbeute an zweikernigen Zellen zur Auswertung ergeben.

Vorbereitung der Kulturen

14. Etablierte Zelllinien und -stämme: Die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen und im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, dass vor dem Zeitpunkt der Gewinnung Kulturen in Monolagen nicht konfluent werden und Suspensionskulturen keine übermäßige Dichte erreichen. Die Kulturen werden bei 37 °C inkubiert.

15. Lymphozyten: Mit einem Antikoagulans (*z. B.* Heparin) behandeltes Vollblut oder separierte Lymphozyten werden vor dem Kontakt mit der Prüfsubstanz und cytoB unter Einwirkung eines Mitogens (*z. B.* Phytohämagglutinin) inkubiert.

Stoffwechsel-Aktivierung

16. Bei Zellen mit ungeeigneter endogener Stoffwechselkapazität sollten exogene metabolisierende Systeme eingesetzt werden. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (45) (46) oder einem Gemisch aus Phenobarbital und β-Naphthoflavon (46) (47) (48) (49) vorbehandelt wurden. Das letztgenannte Gemisch verstößt weder gegen das Stockholmer Übereinkommen über persistente organische Schadstoffe (50) noch gegen die Verordnung (EG) Nr. 850/2004 über persistente organische Schadstoffe (66) und hat sich bei der Induktion von Mischfunktionsoxidasen als ebenso wirksam wie Aroclor 1254 erwiesen (46) (47) (48) (49). Im Endmedium wird die S9-Fraktion in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 10 % v/v verwendet. Die Bedingungen des Metabolisierungssystems können von der geprüften chemischen Klasse abhängig sein. In manchen Fällen ist es sinnvoll, mehr als eine S9-Konzentration zu verwenden.

▼M3

17. Gentechnisch veränderte Zelllinien zur Expression spezifischer Aktivierungsenzyme bei Menschen oder Nagetieren machen möglicherweise den Einsatz exogener Metabolisierungssysteme entbehrlich und könnten als Prüfzellen verwendet werden. In solchen Fällen sollte die Auswahl der verwendeten Zelllinien wissenschaftlich begründet werden, z. B. mit der Relevanz der Mischfunktionsoxidasen für den Stoffwechsel der Prüfsubstanz (51) und mit ihrer Reaktionsfähigkeit auf bekannte Klastogene und Aneugene (siehe besonderer Abschnitt über Akzeptanzkriterien). Es ist zu beachten, dass die geprüfte Substanz unter Umständen nicht von der/den zur Expression gebrachten Mischfunktionsoxidase(n) verstoffwechselt wird; in diesem Fall würden die negativen Ergebnisse nicht anzeigen, dass die Prüfsubstanz keine Mikrokerne induzieren kann.

Prüfsubstanzvorbereitung

18. Feste Chemikalien sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst und ggf. verdünnt werden. Flüssige Chemikalien können den Versuchssystemen vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Gasförmige oder flüchtige Chemikalien sind mit Hilfe geeigneter Änderungen der Standardprotokolle, wie z. B. Behandlung in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (52) (53), zu prüfen. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Lagerungsstabilität der Substanz wird nachgewiesen.

*Prüfbedingungen*

Lösungsmittel/Vehikel

19. Das Lösungsmittel/Vehikel sollte mit der Prüfsubstanz keine chemische Reaktion eingehen, und es sollte mit dem Überleben der Zellen und der S9-Aktivität in der verwendeten Konzentration kompatibel sein. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet (*z. B.* Wasser, ein Zellkulturmedium, Dimethylsulfoxid), so sind Daten über ihre Kompatibilität mit der Prüfsubstanz und über das Nichtvorliegen einer genetischen Toxizität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

Verwendung von cytoB als Zytokinese-Blocker

20. Eine der wichtigsten Überlegungen bei der Durchführung des MNvit-Tests gilt der Vergewisserung, dass die bewerteten Zellen während der Behandlung oder ggf. während der Inkubationszeit nach der Behandlung eine Mitose durchlaufen haben. CytoB ist das am häufigsten verwendete Agens zur Zytokinese-Blockierung, da es den Aktinaufbau hemmt und somit die Trennung der Tochterzellen nach der Mitose verhindert, was wiederum zur Bildung zweikerniger Zellen führt (5) (54) (55). Die Auswertung von Mikrokernen kann daher auf Zellen beschränkt werden, die während oder nach der Behandlung eine Mitose vollzogen haben. Zugleich kann die Auswirkung der Prüfsubstanz auf die Zellproliferationskinetik gemessen werden. CytoB sollte bei der Verwendung menschlicher Lymphozyten als Zytokinese-Blocker eingesetzt werden, da die Zellzyklendauer innerhalb der Kulturen und zwischen einzelnen Spendern variiert und da nicht alle Lymphozyten auf Phytohämagglutinin reagieren. Andere Methoden wurden für Tests an Zelllinien eingesetzt, um zu bestimmen, ob die bewerteten Zellen eine Teilung durchlaufen haben; diese Methoden werden weiter unten erläutert (siehe Absatz 26).

21. Für jeden Zelltyp sollte das Labor die geeignete cytoB-Konzentration festlegen, um in den Lösungsmittel-/Vehikelkontrollkulturen eine optimale Frequenz der zweikernigen Zellen zu erreichen. Die geeignete cytoB-Konzentration liegt in der Regel zwischen 3 und 6 μg/ml.

▼M3

Messung von Zellproliferation und Zytotoxizität und Auswahl der Expositionskonzentrationen

22. Bei der Festlegung der höchsten zu testenden Konzentration der Prüfsubstanz sind Konzentrationen zu vermeiden, die zu künstlich positiven Reaktionen führen können, wie z. B. zu übermäßiger Zytotoxizität, Ausfällungen im Kulturmedium oder ausgeprägten Änderungen des pH-Werts oder der Osmolalität (39) (40) (41).

23. Es werden Messungen der Zellproliferation durchgeführt, um sicherzustellen, dass die behandelten Zellen während des Tests eine Mitose durchlaufen haben und dass die Behandlungen bei geeigneten Zytotoxizitätsniveaus durchgeführt werden (siehe Absatz 29). Die Zytotoxizität sollte mit und ohne Stoffwechsel-Aktivierung in Zellen bestimmt werden, die eine Stoffwechsel-Aktivierung benötigen. Hierzu wird die relative Erhöhung der Zellzahl (RICC) oder die relative Populationsverdopplung (RPD) verwendet (entsprechende Formeln vgl. Anlage 2), wenn nicht cytoB zum Einsatz kommt. Wenn cytoB verwendet wird, kann die Zytotoxizität mittels des Replikationsindex (RI) bestimmt werden (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

24. Die Behandlung von Kulturen mit cytoB und die Messung der relativen Frequenzen von einkernigen, zweikernigen und mehrkernigen Zellen in der Kultur sind ein genaues Verfahren zur Quantifizierung des Effekts auf die Zellproliferation und die zytotoxische oder zytostatische Wirkung einer Behandlung (5) und stellen sicher, dass nur Zellen bewertet werden, die während oder nach der Behandlung eine Teilung vollzogen haben.

25. In Studien mit cytoB kann die Zytostase/Zytotoxizität mittels des Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) quantifiziert werden (5) (26) (56) oder vom RI bei mindestens 500 Zellen pro Kultur abgeleitet werden (entsprechende Formeln vgl. Anlage 2). Wenn cytoB zur Bewertung der Zellproliferation verwendet wird, sollte von mindestens 500 Zellen pro Kultur ein CBPI oder RI festgelegt werden. Diese Messungen können unter anderen verwendet werden, um die Zytotoxizität durch den Vergleich der Werte in behandelten Kulturen und Kontrollkulturen zu bewerten. Die Bewertung anderer Zytotoxizitäts-Marker (*z. B.* Konfluenz, Zellzahl, Apoptose, Nekrose, Metaphasezählung) kann ebenfalls nützliche Informationen liefern.

26. In Studien ohne cytoB muss nachgewiesen werden, dass die in der Kultur bewerteten Zellen während oder nach Behandlung mit der Prüfsubstanz eine Teilung durchlaufen haben. Andernfalls kann es zu falsch negativen Reaktionen kommen. Um die Auswertung geteilter Zellen sicherzustellen, werden folgende Methoden eingesetzt: die Hinzufügung und der spätere Nachweis von Bromodeoxyuridin (BrdU) zur Identifikation replizierter Zellen (57), die Bildung von Klonen, wenn Zellen permanenter Zelllinien behandelt und *in situ* auf einem Mikroskop-Objektträger ausgewertet werden (Proliferationsindex (PI)) (25) (26) (27) (28), oder die Messung der Relativen Populationsverdopplung (RPD) bzw. der Relativen Erhöhung der Zellzahl (RICC) sowie andere bewährte Methoden (16) (56) (58) (59) (entsprechende Formeln vgl. Anlage 2). Die Bewertung anderer Marker für Zytotoxizität oder Zytostase (*z. B.* Konfluenz, Zellzahl, Apoptose, Nekrose, Metaphasezählung) kann ebenfalls nützliche Informationen liefern.

27. Es sind mindestens drei analysierbare Prüfkonzentrationen zu bewerten. Um dies zu erreichen, kann es notwendig sein, den Versuch mit einer größeren Zahl dicht aufeinander folgender Konzentrationen durchzuführen und die Mikrokernbildung in den Konzentrationen zu analysieren, die die geeignete Bandbreite der Zytotoxizitätswerte ergeben. Eine alternative Strategie wäre ein vorläufiger Zytotoxizitätstest zur Einengung des Spektrums für den definitiven Test.

28. Die Höchstkonzentration sollte darauf abzielen, eine Zytotoxizität von 55 ± 5 % hervorzurufen. Höhere Niveaus könnten Chromosomenschäden als Sekundäreffekt der Zytotoxizität induzieren (60). Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten die ausgewählten Prüfkonzentrationen die Bandbreite von der Erzeugung einer Zytotoxizität von 55 ± 5 % bis zu geringer oder nicht vorhandener Zytotoxizität umfassen.

▼M3

29. Wenn keine Zytotoxizität oder keine Ausfälle festgestellt werden, sollte die Höchstkonzentration bei Versuchen 0,01 M, 5 mg/mL oder 5 µl/ml betragen, je nachdem, welcher Wert am niedrigsten ist. Zwischen den für die Analyse gewählten Konzentrationen sollten im Allgemeinen Abstände von jeweils höchstens 10 liegen. Bei Prüfsubstanzen mit einer steilen Konzentrations-Wirkungs-Kurve kann es notwendig sein, die Konzentrationsabstände der Prüfsubstanz enger zu bemessen, damit auch Kulturen im mäßigen und niedrigen Toxizitätsbereich ausgewertet werden.

30. Falls die Löslichkeit ein begrenzender Faktor ist, sollte die Höchstkonzentration — falls keine Einschränkung durch Zytotoxizität gegeben ist — die geringste Konzentration sein, bei der eine minimale Ausfällung in den Kulturen sichtbar ist, sofern dabei keine Interferenzen mit der Auswertung auftreten. Die Bewertung von Ausfällungen sollte mit Methoden wie der Lichtmikroskopie erfolgen, wobei festzustellen ist, ob Ausfällungen während der Inkubation andauern oder (gegen Ende der Behandlung) auftreten.

Kontrollen

31. Für jeden Versuch sind parallel laufende Positiv- und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen mit und ohne Zusatz eines Stoffwechsel-Aktivierungssystems anzulegen.

32. Positivkontrollen werden benötigt, um die Fähigkeit der verwendeten Zellen und des Testprotokolls zur Identifizierung von Klastogenen und Aneugenen nachzuweisen und die Stoffwechselkapazität der S9-Zubereitung zu bestätigen. Zur Positivkontrolle sollten bekannte Induktoren der Mikrokernbildung in Konzentrationen verwendet werden, die voraussichtlich eine geringe, aber reproduzierbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben, womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems nachweisen lässt. Die PK-Konzentrationen sollten so gewählt werden, dass die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen.

33. Zum Nachweis der Stoffwechselkapazität und der Fähigkeit des Testsystems zur Erkennung von Klastogenen sollte ein Klastogen verwendet werden, das eine Stoffwechsel-Aktivierung benötigt (*z. B.* Zyklophosphamid; Benzo[a]pyren). Sofern begründet, können weitere Positivkontrollen verwendet werden. Da einige Positivkontrollen, die eine Stoffwechsel-Aktivierung benötigen, unter bestimmten Behandlungsbedingungen oder in bestimmten Zelllinien auch ohne exogene Stoffwechsel-Aktivierung wirken können, sollten die Notwendigkeit der Stoffwechsel-Aktivierung und die Wirkung der S9-Zubereitung in der gewählten Zelllinie und den gewählten Konzentrationen geprüft werden.

34. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind keine Aneugene bekannt, die zu ihrer genotoxischen Wirkung eine Stoffwechsel-Aktivierung benötigen (16). Im Allgemeinen akzeptierte Positivkontrollen für eine aneugene Wirkung sind zum Beispiel Colchicin und Vinblastin. Es können auch andere Chemikalien verwendet werden, sofern sie Mikrokerne nur oder primär durch ihre aneugene Wirkung induzieren. Um zu vermeiden, dass zwei PK (für Klastogenizität und Aneugenizität) ohne Stoffwechsel-Aktivierung benötigt werden, kann die Aneugenizitätskontrolle als PK ohne S9 dienen, und die Klastogenizitätskontrolle kann verwendet werden, um die Eignung des eingesetzten Stoffwechsel-Aktivierungssystems zu prüfen. Positivkontrollen für Klastogenizität und Aneugenizität sollten in Zellen verwendet werden, die kein S9 benötigen. Die vorgeschlagenen Positivkontrollen sind in Anlage 3 aufgeführt.

35. Die Verwendung einer Positivkontrolle derselben chemischen Klasse kann in Erwägung gezogen werden, wenn geeignete Chemikalien zur Verfügung stehen. Alle Positivkontrollen sollten für den Zelltyp und die Aktivierungsbedingungen geeignet sein.

▼M3

36. Für jeden Erntezeitpunkt sind Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen anzulegen. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Negativkontrollen (ohne Lösungsmittel/Vehikel) verwendet werden, soweit nicht veröffentlichte oder laborspezifische historische Kontrolldaten belegen, dass das gewählte Lösungsmittel in den verwendeten Konzentrationen keine genotoxischen oder sonstigen schädlichen Wirkungen hervorruft.

TESTVERFAHREN

*Behandlungsplan*

37. Um die Wahrscheinlichkeit zu maximieren, dass ein Aneugen oder Klastogen in einem bestimmten Stadium des Zellzyklus erkannt wird, muss eine ausreichende Anzahl an Zellen während aller Stadien ihrer Zellzyklen mit der Prüfsubstanz behandelt werden. Der Behandlungsplan für Zelllinien und primäre Zellkulturen kann daher in gewisser Weise von dem für Lymphozyten abweichen, die für den Beginn ihres Zellzyklus einer mitogenen Stimulation bedürfen. Hierauf wird in den Absätzen 41-43 genauer eingegangen (16).

38. Theoretische Überlegungen und veröffentlichte Daten (18) legen nahe, dass die meisten Aneugene und Klastogene entdeckt werden, wenn eine kurze Behandlung von 3 bis 6 Stunden mit oder ohne Vorhandensein von S9 erfolgt, worauf die Prüfsubstanz entfernt wird und sich eine Wachstumsperiode von 1,5-2,0 Zellzyklen anschließt (6). Die Zellen werden in einem Zeitraum beprobt, der etwa der 1,5-fachen bis 2-fachen Dauer des normalen (*d. h.* unbehandelten) Zellzyklus entweder nach Behandlungsbeginn oder nach Ende der Behandlung entspricht (siehe Tabelle 1). Die Zeiträume für die Probenahme oder Regenerierung können ausgedehnt werden, wenn bekannt ist oder der Verdacht besteht, dass die Prüfsubstanz die Dauer des Zellzyklus beeinflusst (*z. B.* bei der Prüfung von Nucleosidanalogen).

39. Aufgrund der potenziellen zytotoxischen Wirkung von S9-Zubereitungen auf kultivierte Säugetierzellen wird eine verlängerte Expositionsbehandlung der 1,5-fachen bis 2-fachen Dauer des normalen Zellzyklus nur ohne Vorhandensein von S9 vorgenommen. Bei der verlängerten Behandlung werden Optionen angeboten, um eine Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz mit oder ohne cytoB zu ermöglichen. Diese Optionen gelten für Situationen, in denen Befürchtungen hinsichtlich der möglichen Wechselwirkung zwischen der Prüfsubstanz und cytoB bestehen.

40. Die empfohlenen Zellbehandlungspläne sind in Tabelle 1 aufgeführt. Es handelt sich um allgemeine Behandlungspläne, die je nach der Stabilität oder Reaktivität der Prüfsubstanz oder den besonderen Wachstumseigenschaften der verwendeten Zellen modifiziert werden können. Alle Behandlungen sollten während des exponentiellen Wachstums der Zellen einsetzen und enden. Die genannten Pläne werden ausführlicher in den nachstehenden Absätzen 41-47 vorgestellt.

*Tabelle 1*

**Pläne für Zellbehandlung und -gewinnung beim MNvit-Test**

| | | |
|---|---|---|
| Lymphozyten, Primärzellen und Zelllinien, die mit cytoB behandelt wurden | + S9 | 3-6 Stunden Behandlung in Anwesenheit von S9;<br>Entfernung von S9 und Behandlungsmedium;<br>Zugabe von neuem Medium und cytoB;<br>Zellgewinnung nach 1,5-2,0 normalen Zellzyklen. |
| | – S9<br>Kurze Exposition | 3-6 Stunden Behandlung;<br>Entfernung des Behandlungsmediums;<br>Zugabe von neuem Medium und cytoB;<br>Zellgewinnung nach 1,5-2,0 normalen Zellzyklen. |

▼M3

| | | |
|---|---|---|
| | – S9<br>Verlängerte Expositionen | *Option A:* Behandlung über 1,5-2,0 normale Zellzyklen in Anwesenheit von cytoB;<br>Gewinnung am Ende der Expositionsdauer.<br>*Option B:* Behandlung über 1,5-2,0 normale Zellzyklen;<br>Entfernung der Prüfsubstanz;<br>Zugabe von neuem Medium und cytoB;<br>Zellgewinnung nach 1,5-2,0 normalen Zellzyklen. |
| Zelllinien, die ohne cytoB behandelt wurden<br>(Ebenso wie die oben genannten Behandlungspläne mit der Ausnahme, dass kein cytoB zugegeben wird) | | |

*Lymphozyten, Primärzellen und Zelllinien mit cytoB*

41. Bei Lymphozyten ist es am wirksamsten, die Exposition gegenüber der Prüfsubstanz 44-48 Stunden nach der PHA-Stimulation zu beginnen, wenn die Zyklussynchronisierung nicht mehr vorhanden ist (5). Bei dem anfänglichen Test werden die Zellen über einen Zeitraum von 3-6 Stunden mit und ohne Zusatz von S9 mit der Prüfsubstanz behandelt. Das Behandlungsmedium wird entfernt und durch ein frisches Medium, das cytoB enthält, ersetzt. Die Zellgewinnung erfolgt nach weiteren 1,5-2,0 normalen Zellzyklen.

42. Wenn beide anfänglichen Tests nach der kurzen (3- bis 6-stündigen) Behandlung zu negativen oder nicht eindeutigen Ergebnissen führen, erfolgt eine weitere verlängerte Expositionsbehandlung ohne S9. Zwei weitere Behandlungsoptionen sind verfügbar und gleichermaßen akzeptabel. Möglicherweise ist es jedoch sinnvoller, Option A mit stimulierten Lymphozyten anzuwenden, da das exponentielle Wachstum 96 Stunden nach der Stimulation abnehmen dürfte. Ebenso sollten die Zellkulturen zum Zeitpunkt der abschließenden Probenahme in Option B noch nicht konfluent geworden sein.

— Option A: Die Zellen werden über 1,5 bis 2,0 normale Zellzyklen mit der Prüfsubstanz behandelt und die Gewinnung erfolgt am Ende der Behandlungsdauer.

— Option B: Die Zellen werden über 1,5 bis 2,0 normale Zellzyklen mit der Prüfsubstanz behandelt. Das Behandlungsmedium wird entfernt und durch ein frisches Medium ersetzt. Die Zellgewinnung erfolgt nach zusätzlichen 1,5-2,0 normalen Zellzyklen.

43. Primärzellen und Zelllinien sollten ähnlich wie Lymphozyten behandelt werden. Es ist allerdings nicht notwendig, sie für 44-48 Stunden mit PHA zu stimulieren. Andere Zellen als Lymphozyten sollten so exponiert werden, dass sich die Zellen bei Abschluss des Versuchs immer noch im Log-Phase-Wachstum befinden.

*Zelllinien ohne cytoB*

44. Die Zellen sollten über einen Zeitraum von 3-6 Stunden mit und ohne Zusatz von S9 behandelt werden. Das Behandlungsmedium wird entfernt und durch ein frisches Medium ersetzt. Die Zellgewinnung erfolgt nach zusätzlichen 1,5-2,0 normalen Zellzyklen.

▼M3

45. Wenn beide anfänglichen Tests nach der kurzen (3- bis 6-stündigen) Behandlung zu negativen oder nicht eindeutigen Ergebnissen führen, erfolgt eine weitere verlängerte Expositionsbehandlung (ohne S9). Zwei weitere Behandlungsoptionen sind verfügbar und beide gleichermaßen akzeptabel:

— Option A: Die Zellen werden über 1,5 bis 2,0 normale Zellzyklen mit der Prüfsubstanz behandelt und die Gewinnung erfolgt am Ende der Behandlungsdauer.

— Option B: Die Zellen werden über 1,5 bis 2,0 normale Zellzyklen mit der Prüfsubstanz behandelt. Das Behandlungsmedium wird entfernt und durch ein frisches Medium ersetzt. Die Zellgewinnung erfolgt nach zusätzlichen 1,5-2,0 normalen Zellzyklen.

46. In Monolagern können am Ende der 3- bis 6-stündigen Behandlung mitotische Zellen vorhanden sein (diese sind daran zu erkennen, dass sie rund sind und sich von der Oberfläche lösen). Da diese mitotischen Zellen sich leicht lösen, können sie bei Entfernung des Mediums mit der Prüfsubstanz verloren gehen. Es ist sorgfältig darauf zu achten, diese Zellen beim Spülen der Kulturen aufzufangen und sie in die Kulturen zurückzugeben, damit nicht in Mitose befindliche Zellen, die das Risiko einer Mikrokernbildung aufweisen, zum Zeitpunkt der Gewinnung unberücksichtigt bleiben.

*Anzahl der Kulturen*

47. Für jede Konzentration der Prüfsubstanz sowie für die Vehikel-/Lösungsmittelkulturen und Kontrollkulturen sollten zwei gleichzeitige Kulturen angelegt werden. Lässt sich anhand von historischen Labordaten nachweisen, dass zwischen den Zweifachkulturen nur eine minimale Abweichung besteht, so ist ggf. die Verwendung von Einfachkulturen vertretbar. Wenn Einfachkulturen verwendet werden, wird die Analyse einer erhöhten Anzahl von Konzentrationen empfohlen.

*Zellgewinnung und Präparation des Objektträgers*

48. Jede Kultur wird gesondert gewonnen und aufgearbeitet. Die Zellpräparation kann eine Behandlung mit hypotoner Lösung beinhalten, dieser Schritt ist jedoch nicht notwendig, wenn eine angemessene Ausbreitung der Zellen anderweitig sichergestellt wird. Bei der Präparation der Objektträger können verschiedene Techniken verwendet werden, vorausgesetzt, es werden Zellpräparate hoher Qualität zur Auswertung bereitgestellt. Dabei sollte Zytoplasma zurückgehalten werden, um die Erkennung von Mikrokernen sowie (bei der Zytokinese-Block-Methode) die zuverlässige Identifizierung zweikerniger Zellen zu ermöglichen.

49. Die Objektträger können mit verschiedenen Verfahren gefärbt werden, wie zum Beispiel mit Giemsa oder fluoreszierenden DNA-spezifischen Farbstoffen (59). Durch Verwendung eines DNA-spezifischen Farbstoffs (*z. B.* Acridin Orange (61) oder Hoechst 33258 Plus Pyronin-Y (62)) lassen sich bestimmte Artefakte vermeiden, die bei Verwendung eines nicht DNA-spezifischen Farbstoffs auftreten. Zur Identifizierung des Inhalts (Chromosomen/Chromosomenfragmente) von Mikrokernen können Anti-Kinetochor-Antikörper, FISH mit panzentromerischen DNA-Sonden oder eine präparierte *in situ*-Markierung mit panzentromer-spezifischen Primern, zusammen mit der geeigneten DNA-Gegenfärbung, verwendet werden, wenn mechanistische Informationen zu ihrer Bildung benötigt werden (15) (16). Andere Methoden zur Unterscheidung zwischen Klastogenen und Aneugenen können ebenfalls verwendet werden, wenn sie sich als wirksam erwiesen haben.

*Analyse*

50. Alle Objektträger, auch die für die Lösungsmittel-/Vehikelgruppen und die Kontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite zu kodieren. Alternativ dazu können kodierte Proben mittels eines validierten automatisierten Analysesystems (Durchflusszytometrie oder Bildanalyse) untersucht werden.

▼**M3**

51. In Kulturen, die mit cytoB behandelt wurden, sollten die Mikrokernfrequenzen von mindestens 2 000 zweikernigen Zellen pro Konzentration (mindestens 1 000 zweikernige Zellen pro Kultur; zwei Kulturen pro Konzentration) analysiert werden. Wenn Einfachkulturen verwendet werden, sollten in einer solchen Kultur mindestens 2 000 zweikernige Zellen pro Konzentration ausgewertet werden. Wenn wesentlich weniger als 1 000 zweikernige Kellen pro Kultur, bzw. 2 000 bei Einfachkulturen, in jeder Konzentration für die Auswertung zur Verfügung stehen, und wenn keine signifikante Zunahme an Mikrokernen festgestellt wird, sollte der Versuch mit einer höheren Anzahl an Zellen oder mit weniger toxischen Konzentrationen durchgeführt werden, je nachdem, was angemessen ist. Es sollte darauf geachtet werden, keine zweikernigen Zellen auszuwerten, die unregelmäßige Formen aufweisen oder deren zwei Kerne in der Größe beträchtlich voneinander abweichen; außerdem sollten zweikernige Zellen nicht mit schlecht auf dem Träger verteilten mehrkernigen Zellen verwechselt werden. Zellen mit mehr als zwei Hauptkernen sollten nicht auf Mikrokerne untersucht werden, da in diesen Zellen die zugrunde liegende Mikrokernfrequenz höher sein könnte (63) (64). Die Auswertung einkerniger Zellen ist akzeptabel, wenn die Prüfsubstanz nachweislich mit der Wirkung von cytoB interferiert.

52. In Zelllinien, die ohne cytoB-Behandlung getestet wurden, sollten die Mikrokerne in mindestens 2 000 Zellen pro Konzentration (mindestens 1 000 Zellen pro Kultur; zwei Kulturen pro Konzentration) ausgewertet werden. Wenn nur eine Kultur pro Konzentration verwendet wird, sollten in dieser Kultur mindestens 2 000 Zellen ausgewertet werden.

53. Wenn cytoB verwendet wird, sollte von mindestens 500 Zellen pro Kultur ein CBPI oder RI zur Bewertung der Zellproliferation (siehe Anlage 2) festgelegt werden. Wenn die Behandlungen in Abwesenheit von cytoB durchgeführt werden, muss unbedingt nachgewiesen werden, dass die ausgewerteten Zellen proliferiert haben, wie in den Absätzen 24-27 erläutert.

*Akzeptanzkriterien*

54. Ein Labor, das die Durchführung des in dieser Prüfmethode beschriebenen MNvit-Tests anbietet, sollte nachweisen, dass es in der Lage ist, mit Hilfe der in Anlage 3 aufgeführten Referenzsubstanzen Chemikalien mit bekannter aneugener und klastogener Wirkung, mit und ohne Stoffwechsel-Aktivierung, sowie auch bekannte negative Chemikalien, zuverlässig und genau festzustellen. Als Nachweis seiner Fähigkeit, diese Prüfmethode ordnungsgemäß anzuwenden, sollte das Labor belegen, dass die auf Mikrokernbildung untersuchten Zellen eine Kernteilung durchlaufen haben, wenn der Test ohne cytoB durchgeführt wird.

55. Die Substanzen in Anlage 3 sind die zur Verwendung empfohlenen Referenzsubstanzen. Ersatzstoffe oder zusätzliche Chemikalien können einbezogen werden, wenn ihre Wirkung bekannt ist, wenn sie Mikrokerne mittels derselben Wirkmechanismen induzieren und wenn sie sich als relevant für die Chemikalien erweisen, die mit dem MNvit-Verfahren geprüft werden. Die Begründung könnte eine Validierungsstudie enthalten, die entweder auf einer breiten Auswahl an Substanzen beruht oder sich auf ein engeres Spektrum auf der Grundlage der chemischen Klasse der Prüfsubstanz oder des untersuchten Schädigungsmechanismus konzentriert.

56. Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen und unbehandelte Kulturen sollten reproduzierbar niedrige und gleichbleibende Mikrokernfrequenzen zeigen (in der Regel 5-25 Mikrokerne pro 1 000 Zellen für die in Absatz 11 genannten Zelltypen). Andere Zelltypen können hiervon abweichende Reaktionsbereiche aufweisen, die bei ihrer Validierung zur Verwendung im MNvit-Test bestimmt werden sollten. Daten von Negativ-, Lösungsmittel- und Positivkontrollen sollten herangezogen werden, um historische Kontrollbereiche festzulegen. Diese Werte sollten bei Entscheidungen über die Eignung einer gleichzeitigen Negativkontrolle/Positivkontrolle für einen Versuch zugrunde gelegt werden.

▼M3

57. Wenn für den Test geringfügige Änderungen des Protokolls vorgeschlagen werden (*z. B.* Verwendung automatisierter statt manueller Auswertungsverfahren; Verwendung eines neuen Zelltyps), sollte die Wirksamkeit der Änderung nachgewiesen werden, bevor das geänderte Protokoll als einsatztauglich befunden werden kann. Der Wirksamkeitsnachweis beinhaltet den Beweis, dass wesentliche Mechanismen wie Chromosomenbrüche oder Hinzugewinn bzw. Verlust von Chromosomenmaterial festgestellt werden können, und dass die entsprechenden positiven und negativen Ergebnisse für die Klasse der einzelnen Prüfsubstanz oder für die gesamte Bandbreite der zu testenden Substanzen erzielt werden können.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

*Behandlung der Ergebnisse*

58. Bei Verwendung des Zytokinese-Block-Verfahrens werden nur die Frequenzen zweikerniger Zellen mit Mikrokernen (unabhängig von der Anzahl der Mikrokerne pro Zelle) zur Bewertung der Mikrokern-Induktion herangezogen. Die Auswertung der Anzahl an Zellen mit einem, zwei oder mehr Mikrokernen könnte nützliche Informationen liefern, ist jedoch nicht zwingend notwendig.

59. Festzulegen sind auch Maßnahmen, die gleichzeitig zur Bestimmung der Zytotoxizität und/oder Zytostase aller behandelten und Lösungsmittel-/Vehikelkontrollkulturen durchgeführt werden (58). Der CBPI oder der RI sollte für alle behandelten Kulturen und Kontrollkulturen berechnet werden, da sich bei Verwendung des Zytokinese-Block-Verfahrens die Messungen des Zellzyklus verzögern. Kommt cytoB nicht zum Einsatz, sollten die Relative Populationsverdopplung (RPD), die Relative Erhöhung der Zellzahl (RICC) oder der Proliferationsindex (PI) herangezogen werden (siehe Anlage 2).

60. Es sind die Daten für die einzelnen Kulturen zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden.

61. Wenn Chemikalien im MNvit-Test Mikrokerne induzieren, könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass sie Chromosomenbrüche, Chromosomenverlust oder eine Kombination aus beidem verursachen. Deshalb können weitere Analysen unter Einsatz von Anti-Kinetochor-Antikörpern, zentromer-spezifischen *in situ*-Sonden oder mit Hilfe sonstiger Methoden vorgenommen werden, um festzustellen, ob der Mechanismus der Mikrokern-Induktion von einer klastogenen und/oder aneugenen Wirkung herrührt.

*Bewertung und Interpretation der Ergebnisse*

62. Bei einer eindeutigen positiven oder negativen Reaktion ist eine Verifizierung durch zusätzliche Versuche nicht erforderlich. Zur Klärung nicht eindeutiger Ergebnisse empfiehlt sich die Analyse von weiteren 1 000 Zellen aller Kulturen, um die erforderliche Verblindung aufrechtzuerhalten. Sollte diese Methode nicht zur Klärung des Ergebnisses führen, müssen weitere Tests durchgeführt werden. Bei Folgeversuchen sollte die Abänderung der Studienparameter mit Erweiterung oder Verengung des Bedingungsumfangs in Betracht gezogen werden. Zu den Studienparametern, die für eine Abänderung in Frage kommen, gehören die Abstände der Prüfkonzentrationen, der Zeitplan für Behandlung und Zellgewinnung und/oder die Bedingungen für die Stoffwechsel-Aktivierung.

63. Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z. B. eine konzentrationsbezogene Zunahme oder eine statistisch signifikante Zunahme der Anzahl der Zellen mit Mikrokernen. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Die Betrachtung der Frage, ob die festgestellten Werte innerhalb oder außerhalb des historischen Kontrollbereichs liegen, kann Anhaltspunkte für die Bewertung der biologischen Relevanz der Reaktion liefern. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können geeignete statistische Methoden dienen (65). Allerdings sollten die Ergebnisse statistischer Untersuchungen im Hinblick auf die Dosis-Wirkungs-Beziehung bewertet werden. Dabei ist auch der Reproduzierbarkeit und den historischen Daten Rechnung zu tragen.

▼M3

64. Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in manchen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, dass unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin nicht eindeutige oder fragwürdige Ergebnisse auftreten.

65. Positive Befunde beim MNvit-Test deuten darauf hin, dass die Prüfsubstanz in kultivierten Säugetierzellen Chromosomenbrüche oder Chromosomenverlust hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, dass die Prüfsubstanz unter den zugrunde gelegten Versuchsbedingungen keine Chromosomenbrüche und/oder Gewinn bzw. Verlust von Chromosomenmaterial in kultivierten Säugetierzellen hervorruft.

*Prüfbericht*

66. Der Prüfbericht sollte mindestens folgende Informationen enthalten, wenn diese für die Durchführung der Studie relevant sind:

*Prüfchemikalie*

— Angaben zur Identifikation und CAS- (Chemical Abstract Services) Nummer sowie EG-Nummer;

— physikalische Eigenschaft und Reinheit;

— physikalisch-chemische Eigenschaften, die für die Durchführung der Studie relevant sind;

— Reaktionsfähigkeit der Substanz mit dem Lösungsmittel/Vehikel oder dem Zellkulturmedium;

*Lösungsmittel/Vehikel*

— Begründung für die Wahl des Vehikels/Lösungsmittels;

— Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

*Zellen*

— Typ und Herkunft der verwendeten Zellen;

— Eignung des verwendeten Zelltyps;

— ggf. Nichtvorhandensein von Mykoplasma;

— Informationen zu Zellzyklusdauer, Verdopplungsdauer oder Proliferationsindex;

— bei Verwendung von Lymphozyten: Geschlecht, Alter und Anzahl der Blutspender soweit zutreffend;

— bei Verwendung von Lymphozyten: Angaben darüber, ob Vollblut oder separierte Lymphozyten in Kontakt mit der Prüfsubstanz gebracht werden;

— ggf. Passagenanzahl;

— ggf. zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;

— Modalwert der Chromosomen;

— normale Zellzyklusdauer (Negativkontrolle);

*Prüfbedingungen*

— Bezeichnung der Zytokinese-Block-Substanz (z. B. cytoB), falls verwendet, deren Konzentration und Dauer der Zellexposition;

— Begründung für die Auswahl der Konzentrationen und die Anzahl der Kulturen, darunter z. B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze, falls vorhanden;

— Medienzusammensetzung, ggf. $CO_2$-Konzentration;

— Konzentrationen der Prüfsubstanz;

▼**M3**

— Konzentration (und/oder Volumen) des Vehikels und der beigegebenen Prüfsubstanz;

— Inkubationstemperatur und -dauer;

— Behandlungsdauer;

— Zeitpunkt der Gewinnung nach der Behandlung;

— ggf. Zelldichte bei der Beimpfung;

— Art und Zusammensetzung des Stoffwechsel-Aktivierungssystems einschließlich Akzeptanzkriterien;

— Positivkontrollsubstanzen und Negativkontrollen;

— Methoden der Objektträger-Präparation und verwendetes Färbeverfahren;

— Kriterien für die Identifizierung von Mikrokernen;

— Anzahl der analysierten Zellen;

— Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität;

— alle zusätzliche Angaben zur Zytotoxizität;

— Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig;

— verwendete statistische Analysemethode(n);

— Methoden, z. B. die Verwendung von Kinetochor-Antikörpern, um ggf. zu beschreiben, ob Mikrokerne ganze oder fragmentierte Chromosomen enthalten;

*Ergebnisse*

— Verwendete Messung der Zytotoxizität, z. B. CBPI oder RI bei der Zytokinese-Block-Methode; RICC, RPD oder PI, wenn keine Zytokinese-Block-Verfahren verwendet werden; sonstige Beobachtungen bei Bedarf, z. B. Zell-Konfluenz, Apoptose, Nekrose, Metaphasezählung, Frequenz zweikerniger Zellen;

— Ausfällungszeichen;

— Angaben zum pH-Wert und zur Osmolalität des Behandlungsmediums, falls ermittelt;

— Definition geeigneter Zellen für die Analyse;

— Verteilung einkerniger, zweikerniger und mehrkerniger Zellen, falls ein Zytokinese-Block-Verfahren verwendet wird;

— Anzahl der Zellen mit Mikrokernen, gesondert für jede behandelte Kultur und Kontrollkultur, und Angabe, ob diese von zweikernigen oder einkernigen Zellen stammen, sofern zutreffend;

— nach Möglichkeit Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis;

— chemische Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-) Kontrollen und Positivkontrollen (Konzentrationen und Lösungsmittel);

— Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten, Standardabweichungen sowie Konfidenzniveau (z. B. 95 %).

— ggf. statistische Analysen; p-Werte;

*Diskussion der Ergebnisse*

*Schlussfolgerungen*

▼**M3**

LITERATUR

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.

(2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.

(3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen*., 35, 167-172.

(5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols, 2* (5), 1084-1104.

(6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.

(7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.

(8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.

▼M3

(17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [www.oecd.org/env/testguidelines]

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res*., 468, 137-163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.

▼**M3**

(31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.

(32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006. Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Abrufbar unter: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin $B_1$ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.

(41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen*., 8, 789-886.

(42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.

(43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.

▼**M3**

(45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.

(50) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Abrufbar unter: [http://www.pops.int/]

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.

(54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“, *Mutation Res.*, 564, 97-100.

(57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.

(60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191-201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.

(66) Verordnung (EG) Nr. 850/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über persistente organische Schadstoffe und zur Änderung der Richtlinie 79/117/EWG, ABl. 229 vom 30.4.2004, S. 5.

▼M3

*Anlage 1*

**Begriffsbestimmungen**

*Aneugen:* Substanz oder Prozess, die/der durch Wechselwirkung mit den Komponenten des mitotischen oder meiotischen Zellteilungszyklus zu Aneuploidie in Zellen oder Organismen führt.

*Aneuploidie:* Abweichung von der normalen diploiden (oder haploiden) Chromosomenzahl durch ein einziges Chromosom oder mehr, nicht aber durch einen ganzen (oder mehrere) Chromosomensatz/-sätze (Polyploidie).

*Apoptose:* Programmierter Zelltod, der durch eine Reihe von Schritten charakterisiert ist, an deren Ende eine Desintegration von Zellen in membranumschlossene Partikel steht, die schließlich durch Phagozytose oder Shedding abgebaut werden.

*Zellproliferation:* Zunahme der Anzahl von Zellen als Ergebnis der mitotischen Zellteilung.

*Zentromer:* DNA-Bereich eines Chromosoms, an dem die beiden Chromatiden zusammengehalten werden, und an dem beide Kinetochoren Seite an Seite angeordnet sind.

*Klastogen:* Substanz oder Prozess, die/der strukturelle Chromosomenaberrationen in Zell- oder Organismenpopulationen verursacht.

*Zytokinese:* Prozess der Zellteilung unmittelbar nach der Mitose, in dem zwei Tochterzellen, jeweils mit einem einzigen Kern, gebildet werden.

*Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI):* Anteil der Zellen aus zweiter Teilung in der behandelten Population im Verhältnis zur nicht behandelten Kontrollgruppe (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

*Zytostase:* Hemmung des Zellwachstums (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

*Zytotoxizität:* schädliche Auswirkungen auf Zellstruktur und -funktion, die letztlich zum Zelltod führen.

*Genotoxisch:* allgemeiner Begriff, der alle Typen von DNA- oder Chromosomenschädigungen umfasst, einschließlich Brüchen, Addukt-Neubildungen, Mutationen, Chromosomenaberrationen sowie Aneuploidie. Nicht alle genotoxischen Effekte führen zu Mutationen oder stabilen Chromosomenschäden.

*Interphasezellen:* Zellen, die sich nicht im Stadium der Mitose befinden.

*Kinetochor:* proteinhaltige Struktur, die sich am Zentromer eines Chromosoms sammelt, an der während der Zellteilung die Spindelfasern anhaften, wodurch die ordnungsgemäße Beförderung der Tochterchromosomen zu den Polen der Tochterzellen ermöglicht wird.

*Mikronuklei/Mikrokerne:* kleine Kerne zusätzlich zu den Hauptkernen der Zellen und von diesen getrennt, die während der Telophase der Mitose oder Meiose durch zurückgebliebene Chromosomenteile oder ganze Chromosomen gebildet werden.

*Mitose:* Teilung des Zellkerns, die in der Regel in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase gegliedert ist.

*Mitoseindex:* Anteil der Zellen einer Zellpopulation, die sich zum Beobachtungszeitpunkt in Metaphase befinden; zugleich Hinweis auf den Grad der Zellproliferation in dieser Population.

▼**M3**

*Mutagen:* Auslöser einer Erbgutveränderung der DNA-Basenpaarsequenz(en) in Genen oder in der Chromosomenstruktur (Chromosomenaberrationen).

*Non-Disjunktion:* Unvermögen der paarweise angeordneten Chromatiden, sich zu trennen und sich auf die in Entwicklung begriffenen Tochterzellen aufzuteilen. Dabei entstehen Tochterzellen mit abweichenden Chromosomenzahlen.

*Polyploidie:* Zahlenmäßige Chromosomenaberrationen in Zellen oder Organismen, von denen ein oder mehrere ganze Chromosomensätze betroffen sind, im Gegensatz zur Aneuploidie, bei der nur ein oder mehrere einzelne Chromosomen betroffen sind.

*Proliferationsindex (PI):* Verfahren zur Messung der Zytotoxizität, wenn kein cytoB verwendet wird (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

*Relative Erhöhung der Zellzahl (RICC):* Verfahren zur Messung der Zytotoxizität, wenn kein cytoB verwendet wird (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

*Relative Populationsverdopplung (RPD):* Verfahren zur Messung der Zytotoxizität, wenn kein cytoB verwendet wird (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

*Replikationsindex (RI):* Anteil der abgeschlossenen Zellteilungszyklen in einer behandelten Kultur im Verhältnis zur nicht behandelten Kontrollgruppe während der Expositions- und Regenerationsphase (entsprechende Formel vgl. Anlage 2).

*Prüfchemikalie (auch Prüfsubstanz):* Jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

▼M3

*Anlage 2*

**Formeln zur Bewertung der Zytotoxizität**

1. *Wenn cytoB zum Einsatz kommt*, sollte die Bewertung der Zytotoxizität auf dem Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) oder dem Replikationsindex (RI) beruhen (16) (58). Der CBPI gibt die mittlere Zahl der Zellzyklen pro Zelle während der Exposition gegenüber cytoB an und kann zur Berechnung der Zellproliferation eingesetzt werden. Der RI gibt die relative Zahl der Zellkerne in behandelten Kulturen im Vergleich zu Kontrollkulturen an und kann zur Berechnung der Zytostase in % verwendet werden:

$$\% \text{ Zytostase} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

Und:

T = mit der Prüfchemikalie behandelte Kultur

C = Vehikel-Kontrollkultur

Dabei gilt:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{Zahl der einkernigen Zellen}) + (2 \times \text{Zahl der zweikernigen Zellen}) + (3 \times \text{Zahl der mehrkernigen Zellen}))}{(\text{Gesamtzellzahl})}$$

Damit entspricht ein CBPI von 1 (alle Zellen sind einkernig) einer Zytostase von 100 %.

$$\text{Zytostase} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{Zahl der zweikernigen Zellen}) + (2 \times \text{Zahl der mehrkernigen Zellen})) \div (\text{Gesamtzellzahl})_T}{((\text{Zahl der zweikernigen Zellen}) + (2 \times \text{Zahl der mehrkernigen Zellen})) \div (\text{Gesamtzellzahl})_C} \times 100$$

T = behandelte Kulturen

C = Kontrollkulturen

2. Folglich bedeutet ein RI von 53 %: von 100 % der Zellen in der Kontrollkultur, die sich geteilt und anschließend zweikernige und mehrkernige Zellen gebildet haben, haben sich in der behandelten Kultur nur 53 % geteilt, d. h. es ergibt sich für die Zytostase ein prozentualer Wert von 47 %.

3. *Wenn kein cytoB zum Einsatz kommt*, wird eine Bewertung der Zytotoxizität auf der Basis der Relativen Erhöhung der Zellzahl (RICC) oder der Relativen Populationsverdopplung (RPD) empfohlen (58), da bei beiden der Anteil der Zellpopulation berücksichtigt wird, die eine Teilung vollzogen hat.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{Erhöhung der Zellzahl in behandelten Kulturen (Ende — Beginn)})}{(\text{Erhöhung der Zellzahl in Kontrollkulturen (Ende — Beginn)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{Zahl der Populationsverdopplungen in behandelten Kulturen})}{(\text{Zahl der Populationsverdopplungen in Kontrollkulturen})} \times 100$$

▼**M3**

Dabei gilt:

Populationsverdopplung = [log (Zellzahl nach Behandlung ÷ Anfängliche Zellzahl)] ÷ log 2

4. Somit zeigt ein RICC oder eine RPD von 53 % eine Zytotoxizität/Zytostase von 47 % an.

5. Bei Verwendung eines Proliferationsindex (PI) kann die Zytotoxizität durch das Zählen aller Klone bewertet werden, die aus 1 Zelle (cl1), 2 Zellen (cl2), 3 bis 4 Zellen (cl4) sowie 5 bis 8 Zellen (cl8) bestehen.

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. Der PI wurde als aussagefähiger und zuverlässiger Parameter für Zytotoxizität auch bei Zelllinien verwendet, die *in situ* ohne cytoB kultiviert wurden (25) (26) (27) (28).

▼M3

*Anlage 3*

**Zur Leistungsbewertung empfohlene Referenzsubstanzen** ([1])

| Kategorie | Substanz | CAS-Nr. | EG-Nr.: |
|---|---|---|---|
| 1. Klastogene, die ohne Stoffwechsel-Aktivierung wirken | | | |
| | Zytosin-Arabinosid | 147-94-4 | 205-705-9 |
| | Mitomycin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| 2. Klastogene, die eine Stoffwechsel-Aktivierung erfordern | | | |
| | Benzo(a)pyren | 50-32-8 | 200-028-5 |
| | Zyklophosphamid | 50-18-0 | 200-015-4 |
| 3. Aneugene | | | |
| | Colchicin | 64-86-8 | 200-598-5 |
| | Vinblastin | 143-67-9 | 205-606-0 |
| 4. Negative Substanzen | | | |
| | Di(2-ethylhexyl)phthalat | 117-81-7 | 204-211-0 |
| | Nalidixinsäure | 389-08-2 | 206-864-7 |
| | Pyren | 129-00-0 | 204-927-3 |
| | Natriumchlorid | 7647-14-5 | 231-598-3 |

([1]) Die Referenzsubstanzen sind die zur Verwendung empfohlenen Chemikalien. Der Ersatz oder die Hinzufügung bestimmter Stoffe zu der Liste der Referenzsubstanzen ist möglich, wenn ihre Wirkung bekannt ist, wenn sie Mikrokerne mittels derselben Wirkmechanismen induzieren und wenn sie sich als relevant für die Chemikalien erweisen, die mit dem MNvit-Verfahren geprüft werden. Je nach Verwendungszweck könnte die Begründung eine Validierungsstudie enthalten, die entweder auf einer breiten Auswahl an Substanzen beruht oder sich auf ein engeres Spektrum auf der Grundlage der chemischen Klasse der Prüfsubstanz oder des untersuchten Schädigungsmechanismus konzentriert.

▼M3

B.50. **HAUTSENSIBILISIERUNG: LOKALER LYMPHKNOTENTEST: DA**

EINLEITUNG

1. Die OECD-Leitlinien für die Prüfung von Chemikalien und die EU-Prüfmethoden werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Die ursprüngliche Prüfmethode (B.42) zur Bestimmung der Hautsensibilisierung bei der Maus, der Lokale Lymphknotentest (Local Lymph Node Assay bzw. LLNA; OECD-Prüfrichtlinie 429) wurde inzwischen überarbeitet (1). Verschiedene Veröffentlichungen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) gehen genauer auf die Validierung des LLNA und auf die mit ihm verbundenen wissenschaftlichen Arbeiten ein. Bei dem LLNA wird zur Messung der Lymphozytenproliferation radioisotopisches Thymidin oder Jod verwendet. Der Test hat daher Beschränkungen, wenn der Erwerb, die Verwendung oder die Entsorgung radioaktiver Materialien mit Problemen verbunden sind. Bei dem LLNA: DA (entwickelt von Daicel Chemical Industries, Ltd.) handelt es sich um eine nicht-radioaktive Modifikation des LLNA, die den Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP) mittels Biolumineszenz als Indikator für die Lymphozytenproliferation bestimmt. Die Prüfmethode LLNA: DA wurde durch ein internationales Gremium für Sachverständigengutachten (peer review) validiert, geprüft und zur Identifizierung sensibilisierender und nicht sensibilisierender Chemikalien mit einigen Beschränkungen als geeignet befunden (10) (11) (12) (13). Diese Prüfmethode wurde zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) bei Tieren entwickelt. Kapitel B.6 dieses Anhangs und OECD-Prüfrichtlinie 406 stützen sich auf Meerschweinchen-Tests, insbesondere den Meerschweinchen-Maximierungstest und den Bühler-Test (14). Der LLNA (Kapitel B.42 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 429) und die beiden nicht-radioaktiven Modifikationen, LLNA: DA (Kapitel B.50 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 442 A) und LLNA: BrdU-ELISA (Kapitel B.51 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 442 B) haben insofern Vorteile gegenüber den Meerschweinchen-Tests in B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 (14), als sie einen verringerten und gezielteren Einsatz von Versuchstieren ermöglichen.

2. Ebenso wie im LLNA wird bei dem LLNA: DA die Induktionsphase der Hautsensibilisierung untersucht. Der Test liefert quantitative Daten für die Bewertung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Durch den möglichen Nachweis von hautsensibilisierenden Stoffen ohne die Verwendung radioaktiver Markierungen für die DNA können die berufliche Exposition gegenüber Radioaktivität und Entsorgungsprobleme vermieden werden. Dies wiederum ermöglicht eine verstärkte Verwendung von Mäusen zur Bestimmung hautsensibilisierender Stoffe und somit eine geringere Verwendung von Meerschweinchen zur Bewertung des hautsensibilisierenden Potenzials (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (14).

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

3. Die verwendeten Begriffsbestimmungen sind in Anlage 1 aufgeführt.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

4. Der LLNA: DA ist eine modifizierte LLNA-Methode zum Nachweis von Chemikalien mit potenziell hautsensibilisierenden Eigenschaften, mit bestimmten Beschränkungen. Dies bedeutet nicht notwendigerweise, dass der LLNA: DA zwingend in jedem Fall anstelle des LLNA oder der Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie) (14) eingesetzt werden muss. Vielmehr erweist sich der Test als gleichermaßen wertvoll und kann als Alternative gewählt werden, bei der im Allgemeinen keine weitere Bestätigung von positiven oder negativen Ergebnissen erforderlich ist. (10) (11). Das Prüflabor sollte vor der Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz auswerten und berücksichtigen. Zu diesen Informationen zählen die Identität und die chemische Struktur der

▼M3

Prüfsubstanz, ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, die Ergebnisse aller sonstigen *in vitro*- oder *in vivo*-Toxizitätsprüfungen der Prüfsubstanz sowie toxikologische Daten zu strukturell verwandten Chemikalien. Diese Informationen sind zu berücksichtigen, um die Eignung des LLNA: DA für die jeweilige Prüfsubstanz festzustellen (bestimmte Arten chemischer Stoffe sind mit dem LLNA: DA nicht kompatibel [siehe Absatz 5]) und die Festlegung der Dosis zu erleichtern.

5. Beim LLNA: DA handelt es sich um eine *in vivo*-Methode. Das bedeutet, dass die kontaktsensibilisierenden Eigenschaften weiterhin an Tieren bewertet werden. Der Test erlaubt es jedoch, im Vergleich zu den Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) die Anzahl der für diesen Zweck benötigten Tiere zu reduzieren (14). Zudem ist der LLNA: DA eine wesentlich verfeinerte Methode im Hinblick auf die Verwendung der Tiere (weniger Schmerzen und Leiden) bei den Tests zur Kontraktsensibilisierung, da es beim LLNA: DA, anders als bei B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406, nicht erforderlich ist, provozierte Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut auszulösen. Trotz der Vorteile, die der LLNA: DA gegenüber B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 (14) aufweist, ist er mit gewissen Einschränkungen behaftet, die die Anwendung von B.6 oder von OECD-Prüfrichtlinie 406 erforderlich machen können (z. B. die Prüfung bestimmter Metalle, falsch positive Ergebnisse bei bestimmten hautreizenden Stoffen [wie etwa bei tensidähnlichen Chemikalien] (6) (1 und Kapitel B.42 in diesem Anhang), oder die Löslichkeit der Prüfsubstanz). Zudem können chemische Klassen oder Substanzen mit Funktionsgruppen, die erwiesenermaßen als potenzielle Störfaktoren wirken können (16), den Einsatz von Meerschweinchen-Tests erforderlich machen (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (14)). Beschränkungen, die für den LLNA festgestellt wurden (1, und Kapitel B.42 dieses Anhangs), empfehlen sich auch für den LLNA: DA (10). Zudem könnte die Verwendung des LLNA: DA ungeeignet sein für die Prüfung von Substanzen mit Auswirkungen auf das ATP-Niveau (z. B. Substanzen, die als ATP-Hemmer wirken) oder Substanzen, die die genaue Messung der intrazellulären ATP-Messung beeinträchtigen (z. B. Vorhandensein ATP abbauender Enzyme, Vorhandensein extrazellulären ATPs im Lymphknoten). Abgesehen von diesen bekannten Beschränkungen dürfte der LLNA: DA für die Prüfung aller Substanzen geeignet sein, sofern mit diesen Substanzen keine Eigenschaften verbunden sind, die die Genauigkeit des LLNA: DA beeinträchtigen könnten. Außerdem sollte die Möglichkeit positiver Grenzergebnisse in Betracht gezogen werden, wenn für den Stimulationsindex (SI) Werte zwischen 1,8 und 2,5 ermittelt werden (siehe Absätze 31-32). Dies beruht auf der Validierungs-Datenbasis von 44 Substanzen mit einem SI $\geq$ 1,8 (siehe Absatz 6), bei denen der LLNA: DA alle 32 LLNA-Sensibilisatoren richtig identifizierte, jedoch drei von 12 LLNA-Nichtsensibilisatoren mit SI-Werten zwischen 1,8 und 2,5 (d. h. positive Grenzwerte) (10) nicht korrekt identifizierte. Da allerdings derselbe Datensatz für die Einstellung der SI-Werte und die Berechnung der prädiktiven Eigenschaften des Tests verwendet wurde, könnten die festgestellten Ergebnisse auch eine Überbewertung der tatsächlichen prädiktiven Eigenschaften sein.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

6. Der LLNA: DA beruht auf dem Prinzip, dass sensibilisierende Stoffe eine Lymphozytenproliferation in den drainierenden Lymphknoten an der Stelle der Applikation des chemischen Stoffes induzieren. Diese Proliferation verläuft proportional zur Dosis und zur Wirksamkeit des applizierten Allergens und bietet sich als einfache Möglichkeit an, eine quantitative Messung der Sensibilisierung zu erhalten. Die Proliferation wird gemessen, indem man die mittlere Proliferation jeder Prüfgruppe mit der mittleren Proliferation der mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe (VK) vergleicht. Das Verhältnis der mittleren Proliferation in jeder Behandlungsgruppe zu dem in der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe, auch als SI bezeichnet, wird

▼M3

festgelegt und sollte ≥ 1,8 betragen, ehe eine weitere Bewertung einer Prüfsubstanz als potenzieller Hautsensibilisator erfolgt. Die hier beschriebenen Methoden beruhen auf der Messung des ATP-Gehalts durch Biolumineszenz (die bekanntermaßen mit der Anzahl lebender Zellen korreliert) (17), um einen erhöhten Anteil proliferierender Zellen in den drainierenden aurikulären Lymphknoten nachzuweisen (18) (19). Die Biolumineszenz-Methode stützt sich auf das Enzym Luciferase, um die Bildung von Licht aus ATP und Luciferin mittels der folgenden Reaktion zu katalysieren:

$$ATP + Luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + Light$$

Die emittierte Lichtintensität steht in linearer Beziehung zur ATP-Konzentration und wird mit einem Luminometer gemessen. Bei dem Luciferin-Luciferase-Test handelt es sich um eine sensible Methode zur ATP-Quantifizierung, die in einer breiten Palette von Anwendungen zum Einsatz kommt (20).

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

**Auswahl von Versuchstierarten**

7. Für diesen Test ist die Maus die Spezies der Wahl. Validierungsstudien für den LLNA: DA wurden ausschließlich mit dem CBA/J-Stamm durchgeführt, der daher als bevorzugter Stamm gilt (12) (13). Es werden junge erwachsene weibliche Mäuse verwendet, die weder geworfen haben noch trächtig sind. Bei Versuchsbeginn sollten die Tiere 8-12 Wochen alt sein, die Gewichtsunterschiede minimal sein und 20 % des mittleren Gewichts nicht übersteigen. Alternativ können Tests an anderen Stämmen und männlichen Tieren erfolgen, wenn anhand von hinlänglich großen Datenangaben nachgewiesen werden kann, dass keine signifikanten stamm- und/oder geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Reaktion auf den LLNA: DA bestehen.

**Haltungs- und Fütterungsbedingungen**

8. Mäuse sollten in Gruppen gehalten werden (21), wenn nicht angemessene wissenschaftliche Begründungen eine Einzelhaltung nahelegen. Die Temperatur im Versuchsraum sollte 22 ± 3 °C betragen. Obwohl die relative Luftfeuchtigkeit mindestens 30 % betragen und zu anderen Zeiten als während der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen soll, ist ein Wert von 50-60 % anzustreben. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, und eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung ist zu gewährleisten.

**Vorbereitung der Tiere**

9. Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zur individuellen Identifizierung markiert (aber nicht am Ohr) und vor Beginn der Dosierung für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen gewöhnt. Vor Behandlungsbeginn werden alle Tiere untersucht, um sicherzustellen, dass keine sichtbaren Hautverletzungen bestehen.

**Vorbereitung der Dosierlösungen**

10. Feste Chemikalien sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in Lösungsmitteln/Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Chemikalien können direkt appliziert oder zuvor verdünnt werden. Unlösliche Chemikalien, wie sie in der Regel in Medizinprodukten vorliegen, sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in einem geeigneten Lösungsmittel einer übertrieben starken Extraktion unterzogen werden, um alle extrahierbaren Inhaltsstoffe vor der Prüfung sichtbar zu machen. Die Prüfsubstanzen sollten täglich zubereitet werden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

▼M3

**Überprüfung der Zuverlässigkeit:**

11. Anhand von positiven Kontrollchemikalien (PC) wird die ordnungsgemäße Leistung des Tests nachgewiesen. Hierzu ist eine angemessene und reproduzierbare Empfindlichkeit der Reaktion auf eine sensibilisierende Prüfsubstanz erforderlich, wobei die Reaktionsstärke gut charakterisiert ist. Es wird die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrolle empfohlen, da diese die Fähigkeit des Labors belegt, jeden Test erfolgreich durchzuführen und eine Bewertung der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Labors ermöglicht. Einige Regulierungsbehörden schreiben eine Positivkontrolle für jede Studie vor. Daher wird Anwendern empfohlen, vor Durchführung des LLNA: DA die zuständigen Behörden zu Rate zu ziehen. Dementsprechend wird die routinemäßige Verwendung einer gleichzeitigen Positivkontrolle angeregt, um die Notwendigkeit zusätzlicher Tierversuche zur Erfüllung von Anforderungen zu vermeiden, die aus der Verwendung einer nur periodischen Positivkontrolle resultieren könnten (siehe Absatz 12). Die Positivkontrolle sollte eine positive Reaktion auf den LLNA: DA bei einem Expositionsniveau hervorrufen, das einen Anstieg des Stimulationsindex (SI ≥ 1,8 im Vergleich zur Negativkontrollgruppe, NK) bewirkt. Die positive Kontrolldosis soll so gewählt werden, dass sie keine übermäßige Hautreizung oder systemische Toxizität verursacht und die Induktion reproduzierbar, aber nicht exzessiv ist (z. B. ein SI > 10 würde als exzessiv gelten). Bevorzugte positive Kontrollstoffe sind 25 % Hexylcinnaminaldehyd (Chemical Abstracts Service [CAS]-Nr. 101-86-0) und 25 % Eugenol (CAS-Nummer 97-53-0) in Aceton: Olivenöl (4:1, v/v). Unter bestimmten Umständen können in ausreichend begründeten Fällen andere Kontrollsubstanzen eingesetzt werden, die den genannten Kriterien entsprechen.

12. Obwohl die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrollgruppe empfohlen wird, können in gewissen Situationen periodische Prüfungen (d. h. in Abständen ≤ 6 Monaten) der Positivkontrolle für Laboratorien ausreichen, die den LLNA: DA regelmäßig (d. h. mindestens einmal pro Monat) durchführen und über eine etablierte historische Kontrolldatenbasis verfügen, die die Fähigkeit des Labors bestätigt, reproduzierbare und genaue Ergebnisse mit Positivkontrollen zu erzielen. Eine angemessene Beherrschung des LLNA: DA kann erfolgreich nachgewiesen werden, indem durchgehend positive Ergebnisse mit den positiven Kontrollchemikalien in mindestens 10 unabhängigen Prüfungen erzielt werden, die innerhalb eines angemessenen Zeitraums (d. h. in weniger als einem Jahr) durchgeführt wurden.

13. Eine gleichzeitige Positivkontrollgruppe sollte immer einbezogen werden, wenn Verfahrensänderungen im LLNA: DA auftreten (z. B. Wechsel des geschulten Personals, Änderung der Materialien bei den Prüfmethoden und/oder der Reagenzien, Änderung der Ausrüstung, Änderung der Herkunft der Versuchstiere). Solche Änderungen sollten in Laborberichten dokumentiert werden. Ferner ist der Einfluss dieser Änderungen auf die Aussagefähigkeit der zuvor eingerichteten historischen Datenbank zu bedenken. Dabei sollte die Notwendigkeit überdacht werden, eine neue historische Datenbank einzurichten, um die gleichbleibende Qualität der positiven Kontrollergebnisse zu dokumentieren.

14. Die Prüfer sollten sich der Tatsache bewusst sein, dass die Entscheidung, eine PC-Studie periodisch statt gleichzeitig durchzuführen, Auswirkungen auf die Aussagefähigkeit und Akzeptanz negativer Studienergebnisse haben kann, die ohne gleichzeitige Positivkontrolle im Zeitraum zwischen den einzelnen periodischen PC-Studien auftreten können. Wenn zum Beispiel ein falsch negatives Ergebnis in der periodischen PC-Studie auftritt, können negative Ergebnisse für die Prüfsubstanz, die in dem Zeitraum zwischen der letzten akzeptablen periodischen PC-Studie und der inakzeptablen periodischen PC-Studie aufgetreten waren, in Frage gestellt werden. Die Auswirkungen solcher Ergebnisse sollten sorgfältig bedacht werden, wenn entschieden wird, ob gleichzeitige oder nur periodische PC-Studien durchgeführt werden sollen. Auch ist die Verwendung einer geringeren Anzahl an Versuchstieren bei der gleichzeitigen Positivkontroll-Gruppe zu bedenken, wenn dies wissenschaftlich zu begründen ist und wenn das Labor auf der Grundlage laborspezifischer historischer Daten nachweist, dass eine geringere Anzahl an Mäusen ausreicht (22).

▼M3

15. Obwohl eine positive Kontrollchemikalie in einem Vehikel getestet werden sollte, das bekanntermaßen eine gleichbleibende Reaktion auslöst (z. B. Aceton: Olivenöl; 4:1, v/v), können in bestimmten Rechtssituationen außerdem Prüfungen in einem Nichtstandard-Vehikel (klinisch/chemisch relevante Formulierung) erforderlich sein (23). Wenn die gleichzeitige Positivkontrolle in einem anderen Vehikel als der Prüfsubstanz getestet wird, sollte eine gesonderte Vehikelkontrolle für die gleichzeitige PC einbezogen werden.

16. In Fällen, in denen Prüfsubstanzen einer bestimmten chemischen Klasse oder eine Reihe von Reaktionen bewertet werden, können Referenzsubstanzen nützlich sein, um nachzuweisen, dass die Prüfmethode zur Feststellung des Hautsensibilisierungspotenzials dieser Art von Prüfsubstanzen ordnungsgemäß funktioniert. Geeignete Referenzsubstanzen sollten die folgenden Eigenschaften haben:

— strukturelle und funktionale Ähnlichkeit mit der Klasse der getesteten Prüfsubstanz;

— bekannte physikalische/chemische Eigenschaften;

— zugrunde liegende Daten aus dem LLNA: DA;

— zugrunde liegende Daten aus anderen Tiermodellen und/oder von Menschen.

TESTVERFAHREN

**Anzahl der Versuchstiere und Dosierungen**

17. Mindestens vier Tiere pro Dosisgruppe mit jeweils mindestens drei Konzentrationen der Prüfsubstanz werden benötigt; zusätzlich braucht man eine Negativkontrollgruppe, die nur mit dem Vehikel für die Prüfsubstanz behandelt wird, sowie eine Positivkontrolle (gleichzeitig oder jüngeren Datums, auf der Grundlage der Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11-15). Tests mit Mehrfachdosen der PC sollten in Erwägung gezogen werden, insbesondere wenn die Positivkontrolle intermittierend getestet wird. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

18. Die Auswahl der Dosis und des Vehikels soll anhand der Empfehlungen in (2) und (24) erfolgen. Für aufeinanderfolgende Dosierungen werden normalerweise geeignete abgestufte Konzentrationen gewählt, wie z. B. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % usw. Die Auswahl der Konzentrationsfolge sollte angemessen wissenschaftlich begründet werden. Alle vorhandenen toxikologischen Angaben (z. B. über die akute Toxizität und Hautreizung) sowie strukturelle und physiochemische Angaben zu der jeweiligen Prüfsubstanz (und/oder strukturverwandten Substanzen) sollten bei der Festlegung von drei aufeinander folgenden Konzentrationen berücksichtigt werden, so dass bei der Höchstkonzentration einerseits die Exposition maximiert und andererseits eine systemische Toxizität und/oder eine übermäßige lokale Hautreizung ausgeschlossen werden (24) (25). Mangels solcher Informationen kann ein anfänglicher Dosisfindungstest erforderlich sein (siehe Absätze 21-24).

19. Das Vehikel sollte das Testergebnis nicht beeinflussen oder beeinträchtigen und sollte so gewählt werden, dass die Löslichkeit zur Erzielung einer möglichst hohen Konzentration maximiert und gleichzeitig eine für das Applizieren der Prüfsubstanz geeignete Lösung/Suspension hergestellt werden kann. Empfohlene Vehikel sind Aceton: Olivenöl (4:1, v/v), *N,N*-Dimethylformamid, Methylethylketon, Propylenglykol und Dimethylsulphoxid (6), wobei mit hinreichender wissenschaftlicher Begründung auch andere Vehikel verwendet werden können. Unter bestimmten Umständen muss ein klinisch relevantes Lösungsmittel oder die handelsübliche Zubereitung, in der die Prüfsubstanz vermarktet wird, als zusätzliche Kontrolle genutzt werden. Besondere Sorgfalt sollte darauf verwendet werden, zu gewährleisten, dass in das Vehikelsystem durch die Verwendung geeigneter Lösungsvermittler (z. B. 1 % Pluronic® L92) hydrophile Stoffe eingearbeitet werden, die die Haut befeuchten und nicht sofort ablaufen. Folglich sind vollständig wässrige Vehikel zu vermeiden.

▼M3

20. Die Bearbeitung von Lymphknoten einzelner Mäuse ermöglicht die Bewertung der Variabilität von Tieren sowie einen statistischen Vergleich zwischen der Prüfsubstanz und Messungen an der Vehikelkontrollgruppe (siehe Absatz 33). Die Möglichkeit, die Anzahl der Mäuse in der Positivkontrollgruppe zu verringern, ist nur realistisch, wenn Einzeltierdaten erhoben werden (22). Außerdem verlangen einige Regulierungsbehörden die Erhebung von Daten einzelner Tiere. Die regelmäßige Erhebung von Einzeltierdaten stellt im Hinblick auf den Tierschutz einen Vorteil dar, indem Doppeltests vermieden werden. Diese wären notwendig, wenn die ursprünglich gemeinsam gesammelten Ergebnisse für die Prüfsubstanz (z. B. über gepoolte Daten) später von Regulierungsbehörden mit anderen Vorschriften (z. B. Einzeltierdaten) geprüft würden.

**Dosisfindungstest**

21. Wenn über die höchst mögliche Dosierung keine Informationen vorliegen (siehe Absatz 18), sollte ein Dosisfindungstest durchgeführt werden, um die geeignete Dosierung für den LLNA: DA festzulegen. Der Dosisfindungstest soll eine Orientierung bei der Auswahl der höchst möglichen Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA: DA in Fällen liefern, in denen keine Informationen über Konzentrationen vorliegen, die zur systemischen Toxizität (siehe Absatz 24) und/oder zu übermäßiger Hautreizung führen (siehe Absatz 23). Die höchsten geprüften Dosisstufen sollten 100 % der Prüfsubstanz bei Flüssigkeiten bzw. die höchst möglichen Konzentrationen bei Feststoffen oder Suspensionen sein.

22. Der Dosisfindungstest wird unter Bedingungen durchgeführt, die denen der Hauptstudie des LLNA: DA genau entsprechen. Allerdings gibt es hier keine Bewertung der Lymphknotenproliferation und es können weniger Tiere pro Dosisgruppe eingesetzt werden. Es werden ein oder zwei Tiere pro Dosisgruppe empfohlen. Alle Mäuse werden täglich auf klinische Zeichen für systemische Toxizität oder lokale Reizungen an der Applikationsstelle untersucht. Das Körpergewicht wird vor dem Test und vor dem Abschluss (Tag 8) protokolliert. Beide Ohren jeder Maus werden auf Anzeichen für Erytheme untersucht und mit Hilfe von Tabelle 1 bewertet (25). Die Ohrdicke wird mit Hilfe eines Ohrdickenmessgeräts (z. B. digitaler Mikrometer oder Peacock Dickenmessuhr) an Tag 1 vor der Dosierung, Tag 3 (ca. 48 Stunden nach der ersten Dosis), Tag 7 (24 Stunden vor Abschluss) und Tag 8 bestimmt. Zusätzlich kann an Tag 8 die Ohrdicke durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben ermittelt werden. Dies sollte nach der tierschutzgerechten Tötung der Tiere erfolgen. Eine übermäßige lokale Hautreizung wird durch eine Erythem-Punktzahl von ≥ 3 und/oder eine Zunahme der Ohrdicke ≥ 25 % an jedem beliebigen Messtag angezeigt (26) (27). Als höchste Dosis für die Hauptuntersuchung des LLNA: DA wird die nächst niedrigere Dosis in der Konzentrationsreihe des Dosisfindungstests gewählt (siehe Absatz 18), die keine systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung verursacht.

*Tabelle 1*

**Erythem-Klassifizierung**

| Beobachtung | Punktzahl |
|---|---|
| Kein Erythem | 0 |
| Sehr leichtes Erythem (kaum wahrnehmbar) | 1 |
| Klar abgegrenztes Erythem | 2 |

▼M3

| Beobachtung | Punktzahl |
|---|---|
| Mäßiges bis ausgeprägtes Erythem | 3 |
| Schweres Erythem (dunkelrot) bis hin zur Schorfbildung, so dass eine Bewertung nicht möglich ist | 4 |

23. Zusätzlich zu einer Zunahme der Ohrdicke um 25 % (26) (27) wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der Ohrdicke bei den behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen zugrunde gelegt, um Reizstoffe in dem LLNA zu identifizieren (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Obwohl ein statistisch signifikanter Anstieg auch bei einer Ohrdicke von weniger als 25 % auftreten kann, konnte kein spezifischer Zusammenhang mit einer übermäßigen Hautreizung festgestellt werden (30) (31) (32) (33) (34).

24. Die folgenden klinischen Beobachtungen können, sofern sie Bestandteil einer Gesamtbewertung sind, auf systemische Toxizität hinweisen (35) und somit die höchst mögliche Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA: DA anzeigen: Änderungen der Funktionen des Nervensystems (*z. B*. Piloerektion, Ataxie, Tremor und Krämpfe); Verhaltensänderungen (*z. B*. Aggressivität, Änderungen bei der Fellpflege, auffallende Änderung des Aktivitätsniveaus); Änderungen des Atemmusters (*d. h*. Änderung der Häufigkeit und Intensität des Atmens wie Dyspnoe, Keuchen, rasselnder Atem) sowie Änderungen der Futter- und Wasseraufnahme. Zusätzlich sollten Anzeichen von Lethargie und/oder Teilnahmslosigkeit sowie alle klinischen Anzeichen für mehr als leichte oder momentane Schmerzen und Qual, eine Gewichtsreduktion > 5 % zwischen Tag 1 und Tag 8 sowie die Sterblichkeit in der Bewertung berücksichtigt werden. Moribunde Tiere oder Tiere, die Anzeichen starker und andauernder Qualen zeigen, sollten tierschutzgerecht getötet werden (36).

**Versuchsplan der Hauptuntersuchung**

25. Der Versuchsplan des Tests ist wie folgt:

— *Tag 1:* Jedes Tier wird einzeln gekennzeichnet und das Gewicht sowie jede klinische Beobachtung protokolliert. Es wird 1 % Natriumlaurylsulfat (NLS) in wässriger Lösung auf die Rückseite jedes Ohrs aufgetragen. Dies erfolgt mit vier bis fünf Strichen einer in die NLS-Lösung getauchten Bürste, so dass die gesamte Rückseite jedes Ohrs bedeckt ist. Eine Stunde nach der NLS-Behandlung werden 25 µL der Prüfsubstanz in der jeweiligen Verdünnung, des Vehikels allein oder der PK (gleichzeitig oder jüngeren Datums) gemäß den Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11-15) auf die Rückseite jedes Ohrs appliziert.

— *Tage 2, 3 und 7:* Die an Tag 1 erfolgte Vorbehandlung mit 1 % NLS wässriger Lösung und die Applikation der Prüfsubstanz werden wiederholt.

— *Tage 4, 5 und 6:* Keine Behandlung.

— *Tag 8:* Das Gewicht jedes Tiers sowie jede klinische Beobachtung werden protokolliert. Ca. 24 bis 30 Stunden nach Beginn der Applikation an Tag 7 werden die Tiere tierschutzgerecht getötet. Die drainierenden aurikulären Lymphknoten jedes Mäuseohrs werden entfernt und separat (für jedes Tier einzeln) in phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) gegeben. Einzelheiten und Diagramme der Lymphknotenidentifikation und -entfernung sind unter Referenz (22) aufgeführt. Zur weiteren Kontrolle der lokalen Hautreaktion in der Hauptuntersuchung können zusätzliche Parameter wie die Auswertung des Ohr-Erythems oder Ohrdickemessungen (mittels eines Dickenmessgeräts oder durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben bei der Nekropsie) in das Untersuchungsprotokoll aufgenommen werden.

▼M3

**Vorbereitung der Zellsuspensionen**

26. Für jede Maus wird eine Einzelzellsuspension der beidseitig entnommenen Lymphknotenzellen (LNC) erstellt, indem die Lymphknoten zwischen zwei Glasträger geklemmt werden und leichter Druck ausgeübt wird, um die Knoten zu zerquetschen. Nach der Vergewisserung, dass das Gewebe sich dünnflächig verteilt hat, können die beiden Träger voneinander gelöst werden. Das Gewebe auf beiden Trägern wird in PBS gelöst, indem jeder Träger im Winkel über die Petrischale gehalten wird und mit PBS gespült wird, während gleichzeitig das Gewebe mit einem Zellschaber von dem Träger abgeschabt wird. Die Lymphknoten bei Tieren der Negativkontrollgruppe sind klein; daher ist Vorsicht geboten, um eine ungewollte Beeinflussung der SI-Werte zu vermeiden. Für das Spülen beider Träger sollte ein Gesamtvolumen von 1 mL PBS verwendet werden. Die Lymphknoten-Lösung in der Petrischale sollte mit dem Zellschaber leicht homogenisiert werden. Anschließend wird mit einer Mikropipette ein 20 µL Aliquot der Lymphknotenlösung entnommen (Achtung: nicht die für das Auge sichtbare Membran entnehmen) und mit 1,98 mL PBS gemischt, sodass sich eine Probe von 2 mL ergibt. Darauf wird eine zweite Probe von 2 mL mittels desselben Verfahrens zubereitet, sodass für jedes Tier zwei Proben vorliegen.

**Bestimmung der Zellproliferation (Messung des ATP-Gehalts der Lymphozyten)**

27. Erhöhungen des ATP-Gehalts in den Lymphknoten werden mittels der Luciferin-/Luciferase-Methode mit einem ATP-Mess-Kit bestimmt, das die Biolumineszenz in Relativen Lumineszenz-Einheiten (Relative Luminescence Units; RLU) misst. Die Testzeit zwischen dem Zeitpunkt der Tiertötung bis zur Messung des ATP-Gehalts für jedes einzelne Tier sollte gleich bleiben und bei bis zu ca. 30 Minuten liegen, da davon ausgegangen wird, dass der ATP-Gehalt nach der Tiertötung allmählich abnimmt (12). Folglich sollten die verschiedenen Verfahrensschritte ab der Entnahme der aurikulären Lymphknoten bis zur ATP-Messung nach einem vorher festgelegten Zeitplan, der für jedes Tier gleich ist, innerhalb von 20 Minuten abgeschlossen werden. Die ATP-Lumineszenz sollte in jeder Probe von 2 mL gemessen werden, so dass für jedes Tier zwei ATP-Messungen vorliegen. Anschließend wird die mittlere ATP-Lumineszenz bestimmt und in den folgenden Berechnungen verwendet (siehe Absatz 30).

BEOBACHTUNGEN

**Klinische Beobachtungen**

28. Jede Maus sollte mindestens einmal täglich sorgfältig auf klinische Zeichen, d. h. lokale Reizung an der Applikationsstelle, oder auf systemische Toxizität untersucht werden. Alle Beobachtungen werden systematisch in Einzelprotokollen dokumentiert, die für jedes Tier geführt werden. Die Überwachungspläne sollten Kriterien beinhalten, anhand derer Mäuse mit systemischer Toxizität, übermäßiger lokaler Hautreizung oder Hautätzung schnell zu Zwecken der schmerzlosen Tötung identifiziert werden können (36).

**Körpergewicht**

29. In Abschnitt 25 wurde bereits ausgeführt, dass das Körpergewicht der einzelnen Tiere zu Versuchsbeginn und zum Zeitpunkt der tierschutzgerechten Tötung der Tiere laut Versuchsplan festgestellt werden soll.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

30. Die Ergebnisse für jede Behandlungsgruppe werden als mittlerer Stimulationsindex (SI) angegeben. Den SI erhält man durch Teilen der mittleren RLU pro Maus innerhalb jeder Prüfgruppe und der Positivkontrollgruppe durch die mittleren RLU pro Maus für die Lösungsmittel-/Vehikelkontrollgruppe. Der durchschnittliche SI beträgt demnach für die mit Vehikel behandelten Kontrollen 1.

▼M3

31. In dem Entscheidungsprozess gilt ein Ergebnis als positiv, wenn SI ≥ 1,8 ist (10). Die Stärke der Dosis-Wirkung, die statistische Signifikanz und die gleichbleibende Qualität der Lösungsmittel-/Vehikel-Reaktion sowie der Reaktion der Positivkontrolle können aber auch benutzt werden, um festzulegen, ob ein Grenzergebnis (d. h. SI-Wert zwischen 1,8 und 2,5) als positiv bezeichnet werden soll (2) (3) (37).

32. Bei einer positiven Grenzwertreaktion mit einem SI zwischen 1,8 und 2,5 können Anwender zusätzliche Informationen berücksichtigen, wie z. B. die Dosis-Wirkungs-Beziehung, das Vorliegen einer systemischen Toxizität oder übermäßigen Hautreizung, sowie gegebenenfalls die statistische Signifikanz zusammen mit den SI-Werten, um zu bestätigen, dass die Ergebnisse positiv sind (10). Zu beachten sind ferner die verschiedenen Eigenschaften der Prüfsubstanz, wobei es unter anderem zu klären gilt, ob ein struktureller Zusammenhang mit bekannten Hautsensibilisatoren besteht, ob sie eine übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus hervorruft und wie die festgestellte Art der Reaktion bezüglich der Dosis ist. Diese und weitere Aspekte werden an anderer Stelle ausführlich erörtert (4).

33. Werden die Daten für jede einzelne Maus erhoben, kann eine statistische Analyse zu Vorhandensein und Grad des Dosis-Wirkungs-Verhältnisses in den Daten durchgeführt werden. Jede statistische Auswertung könnte eine Bewertung der Dosis-Wirkungs-Beziehung sowie geeignete Testgruppen-Vergleiche beinhalten (z. B. Gruppe mit paarweiser Dosierung vs. gleichzeitige Lösungsmittel-/Vehikelkontrollgruppen). Die statistischen Analysen könnten z. B. die lineare Regression, den Williams-Test zur Bewertung von Dosis-Wirkungs-Trends oder den Dunnett-Test für paarweise Vergleiche beinhalten. Bei der Auswahl einer geeigneten Methode für die statistische Analyse sollte sich der Prüfer möglicher ungleicher Varianzen und anderer damit zusammenhängender Probleme stets bewusst sein, denn diese erfordern unter Umständen eine Datentransformation oder ein nicht-parametrisches statistisches Verfahren. Auf jeden Fall muss der Prüfer unter Umständen SI-Berechnungen und statistische Analysen mit und ohne bestimmte Datenpunkte (manchmal als „Ausreißer“ bezeichnet) vornehmen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Daten**

34. Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Sie sollten die RLU-Einzelwerte, die mittleren RLU-Gruppenwerte pro Tier, die damit verbundene Fehlervariable (z. B. SD, SEM) und den mittleren SI für jede Dosisgruppe, verglichen mit der gleichzeitigen Lösungsmittel-/Vehikelkontrollgruppe angeben.

**Prüfbericht**

35. Der Testbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüf- und Kontrollsubstanzen:

— Angaben zur Identität (z. B. CAS-Nummer und EG-Nummer, falls vorhanden; Bezugsquelle; Reinheit; bekannte Verunreinigungen; Chargennummer);

— physikalische Beschaffenheit und physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. Flüchtigkeit, Stabilität, Löslichkeit);

— bei Mischungen Zusammensetzung und relative Anteile der Bestandteile in Prozent;

Lösungsmittel/Vehikel:

— Angaben zur Identität (Reinheit, Konzentration, gegebenenfalls verwendete Mengen);

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

▼M3

Versuchstiere:

— Herkunft der CBA-Mäuse;

— mikrobiologischer Status der Tiere, soweit bekannt;

— Anzahl und Alter der Tiere;

— Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

Prüfbedingungen:

— Herkunft, Chargennummer und Daten des Herstellers zur Qualitätssicherung/Qualitätskontrolle für das ATP-Kit;

— Angaben zur Vorbereitung und Applikation der Prüfsubstanz;

— Begründung der gewählten Dosierung (mit Ergebnissen des eventuell durchgeführten Dosisfindungstests);

— verwendete Konzentrationen des Vehikels und der Prüfsubstanz sowie Gesamtmenge der applizierten Prüfsubstanz;

— Angaben über Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Wasserquelle);

— nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;

— Methoden zur Bestimmung der Toxizität;

— Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv oder negativ;

— Einzelheiten zu eventuellen Protokollabweichungen und eine Erklärung dazu, wie sich diese Abweichung auf Prüfdesign und Ergebnisse auswirkt.

Überprüfung der Zuverlässigkeit:

— Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der letzten Überprüfung der Zuverlässigkeit mit Angaben zu verwendeten Prüfsubstanzen, Konzentration und Vehikel;

— gleichzeitige und/oder historische PC und gleichzeitige Daten der Negativkontrolle (Lösungsmittel/Vehikel) für das Prüflabor;

— wenn keine gleichzeitige PC eingeschlossen war, Datum und Laborbericht über die jüngste periodische PC sowie ein Bericht mit ausführlichen Angaben über die historischen positiven Kontrolldaten des Labors mit Angabe der Gründe, warum keine gleichzeitige PC durchgeführt wurde;

Ergebnisse:

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Beginn der Prüfung und zum Zeitpunkt der Tötung laut Versuchsplan, sowie mittlere und zugehörige Fehlervariable (z. B. SD, SEM) für jede Behandlungsgruppe;

— Beginn und zeitlicher Verlauf der toxischen Erscheinungen für jedes Tier, einschließlich gegebenenfalls Hautreizungen an der Stelle der Verabreichung;

— Zeitpunkt der Tötung und Zeitpunkt der ATP-Messungen für jedes Tier;

— Tabelle der RLU-Werte für jede Maus und der SI-Werte für jede Dosisgruppe;

— mittlere verbundene Fehlervariable (z. B. SD, SEM) für RLU/Maus für jede Behandlungsgruppe sowie die Ergebnisse der Ausreißer-Analyse für jede Behandlungsgruppe;

▼M3

— berechneter SI und geeignete Messung der Variabilität, welche die Variabilität der Tiere sowohl in der Behandlungsgruppe als auch in der Kontrollgruppe berücksichtigt;

— Dosis-Wirkungs-Beziehung;

— gegebenenfalls statistische Analysen.

Diskussion der Ergebnisse:

— Kurze Kommentierung der Ergebnisse, der Dosis-Wirkungs-Beziehung und gegebenenfalls der statistischen Analysen mit Schlussfolgerungen zur Frage, ob die Prüfsubstanz als Hautsensibilisator eingestuft werden soll.

LITERATUR

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

*Anlage 1*

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

*Genauigkeit:* Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (38).

*Vergleichssubstanz:* Eine sensibilisierende oder nicht sensibilisierende Substanz, die als Standard zu Vergleichszwecken für eine Prüfsubstanz verwendet wird. Eine Vergleichssubstanz sollte die folgenden Eigenschaften haben: i) gleichbleibende und verlässliche Quelle(n); ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; iv) unterstützende Daten zu bekannten Effekten und v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

*Falsch negativ:* Eine Substanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als negativ oder nicht wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit positiv bzw. wirksam ist.

*Falsch positiv:* Eine Substanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als positiv oder wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit negativ bzw. nicht wirksam ist.

*Gefahr:* Potenzial eines schädlichen Effekts für Gesundheit oder Umwelt. Die schädliche Wirkung manifestiert sich nur, wenn es zu einem ausreichenden Expositionsniveau kommt.

*Inter-Labor-Reproduzierbarkeit:* Das Ausmaß, in dem unterschiedliche qualifizierte Laboratorien, die dasselbe Protokoll verwenden und dieselben Prüfsubstanzen testen, qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen können. Die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wird während der Prävalidierungs- und Validierungsverfahren ermittelt und zeigt das Maß an, in dem ein Test erfolgreich zwischen Laboratorien übertragen werden kann. Im englischen Sprachgebrauch spricht man in diesem Zusammenhang auch von „Between-laboratory reproducibility“ (38).

*Intra-Labor-Reproduzierbarkeit:* Das Ausmaß, in dem qualifizierte Personen innerhalb desselben Labors, die dasselbe spezifische Protokoll zu unterschiedlichen Zeiten verwenden, erfolgreich dieselben Ergebnisse replizieren können. In diesem Zusammenhang spricht man auch von laborinterner Reproduzierbarkeit (38).

*Ausreißer:* Ein Ausreißer ist ein Messwert, der sich beträchtlich von anderen Werten in einem zufällig ausgewählten Muster in einer Population unterscheidet.

*Qualitätssicherung:* Ein Managementprozess, mittels dessen die Einhaltung von Laborprüfnormen, Anforderungen und Aufzeichnungsverfahren, sowie die Genauigkeit des Datentransfers durch Individuen bewertet wird, die von den testenden Personen unabhängig sind.

*Zuverlässigkeit:* Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit der Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (38).

*Hautsensibilisierung:* Ein immunologischer Prozess, der auftritt, wenn ein empfindliches Individuum oberflächlich einem induzierenden chemischen Allergen ausgesetzt ist, das eine kutane Immunreaktion auslöst, die zur Entwicklung einer Kontaktsensibilisierung führen kann.

*Stimulationsindex (SI):* Ein Wert, der zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials einer Prüfsubstanz berechnet wird. Der SI ist das Verhältnis der Proliferation in behandelten Gruppen zu dem der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe.

*Prüfsubstanz (auch Prüfchemikalie):* Jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

▼M3

## B.51. HAUTSENSIBILISIERUNG: LOKALER LYMPHKNOTENTEST: BRDU-ELISA

### EINLEITUNG

1. Die OECD-Leitlinien für die Prüfung von Chemikalien und die EU-Prüfmethoden werden regelmäßig überarbeitet, um dem wissenschaftlichen Fortschritt, sich ändernden Rechtsvorgaben und Belangen des Tierschutzes gerecht zu werden. Die ursprüngliche Prüfmethode (B.42) zur Bestimmung der Hautsensibilisierung bei der Maus, der Lokale Lymphknotentest (Local Lymph Node Assay bzw. LLNA; OECD-Prüfrichtlinie 429) wurde inzwischen überarbeitet (1, und Kapitel B.42 in diesem Anhang). Verschiedene Veröffentlichungen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) gehen genauer auf die Validierung des LLNA und auf die mit ihm verbundenen wissenschaftlichen Arbeiten ein. Bei dem LLNA wird zur Messung der Lymphozytenproliferation radioisotopisches Thymidin oder Jod verwendet. Der Test hat daher Beschränkungen, wenn der Erwerb, die Verwendung oder die Entsorgung radioaktiver Materialien mit Problemen verbunden sind. Die Prüfmethode LLNA: BrdU-ELISA [Enzymgebundener Immunoassay] ist eine nicht-radioaktive Modifikation der LLNA-Prüfmethode, bei der nicht radioaktiv gekennzeichnetes 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) (Chemical Abstracts Service [CAS-] Nr. 59-14-3) in einem ELISA-basierten Testsystem zur Messung der Lymphozytenproliferation zum Einsatz kommt. Die Prüfmethode LLNA: BrdU-ELISA wurde durch ein internationales wissenschaftliches Gremium für Sachverständigengutachten (peer review) validiert, geprüft und zur Identifizierung sensibilisierender und nicht sensibilisierender Chemikalien mit einigen Beschränkungen als geeignet befunden (10) (11) (12). Diese Prüfmethode wurde zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials von Chemikalien (Stoffen und Gemischen) bei Tieren entwickelt. Kapitel B.6 dieses Anhangs und OECD-Prüfrichtlinie 406 stützen sich auf Meerschweinchen-Tests, insbesondere den Meerschweinchen-Maximierungstest und den Bühler-Test (13). Der LLNA (Kapitel B.42 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 429) und die beiden nicht-radioaktiven Modifikationen, LLNA: BrdU-ELISA (Kapitel B.51 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 442 B) und LLNA: DA (Kapitel B.50 dieses Anhangs; OECD-Prüfrichtlinie 442 A) haben insofern Vorteile gegenüber den Meerschweinchen-Tests in B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 (13), als sie einen verringerten und gezielteren Einsatz von Versuchstieren ermöglichen.

2. Ähnlich wie der LLNA untersucht der LLNA: BrdU-ELISA die Induktionsphase der Hautsensibilisierung, und der Test liefert quantitative Daten für die Bewertung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Durch den möglichen Nachweis von hautsensibilisierenden Stoffen ohne die Verwendung radioaktiver Markierungen für die DNA können die berufliche Exposition gegenüber Radioaktivität und Entsorgungsprobleme vermieden werden. Dies wiederum ermöglicht eine verstärkte Verwendung von Mäusen zur Bestimmung hautsensibilisierender Stoffe und somit eine geringere Verwendung von Meerschweinchen zur Bewertung des hautsensibilisierenden Potenzials (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13).

### BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

3. Die verwendeten Begriffsbestimmungen sind in Anlage 1 aufgeführt.

### AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN

4. Die Prüfmethode LLNA: BrdU-ELISA ist eine modifizierte LLNA-Methode zum Nachweis von Chemikalien mit potenziell hautsensibilisierenden Eigenschaften, mit bestimmten Beschränkungen. Dies bedeutet nicht notwendigerweise, dass der LLNA: BrdU-ELISA zwingend in jedem Fall anstelle des LLNA oder der Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) (13) eingesetzt werden muss. Vielmehr erweist sich der Test als gleichermaßen wertvoll und kann als Alternative gewählt werden, bei der im Allgemeinen keine weitere Bestätigung von positiven wie auch negativen Ergebnissen erforderlich ist (10) (11). Das Prüflabor sollte vor der

▼M3

Durchführung der Studie alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz auswerten und berücksichtigen. Zu diesen Informationen zählen die Identität und die chemische Struktur der Prüfsubstanz, ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften, die Ergebnisse aller sonstigen *in vitro*- oder *in vivo*-Toxizitätsprüfungen der Prüfsubstanz sowie toxikologische Daten zu strukturell verwandten Chemikalien. Dies gilt es zu berücksichtigen, um die Eignung des LLNA: BrdU-ELISA für die jeweilige Prüfsubstanz festzustellen (bestimmte Arten chemischer Stoffe sind mit dem LLNA: BrdU-ELISA nicht kompatibel [siehe Absatz 5]) und die Festlegung der Dosis zu erleichtern.

5. Die Prüfmethode LLNA: BrdU-ELISA ist eine *in vivo*-Methode. Das bedeutet, dass die kontaktsensibilisierenden Eigenschaften weiterhin an Tieren bewertet werden. Der Test erlaubt es jedoch, im Vergleich zu den Meerschweinchen-Tests (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406) die Anzahl der für diesen Zweck benötigten Tiere zu reduzieren (13). Ferner stellt der LLNA: BrdU-ELISA eine substanzielle Verfeinerung in der Behandlung von Versuchstieren bei Tests auf allergische Kontaktsensibilisierung dar, da anders als B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 der LLNA: BrdU-ELISA keine Auslösung von provozierten Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut erfordert. Außerdem erfordert der LLNA: BrdU-ELISA, anders als der Meerschweinchen-Maximierungstest, keinen Einsatz von Adjuvanzien (Kapitel B.6 dieses Anhangs, 13). Damit verringert der LLNA: BrdU-ELISA das Leiden der Tiere. Trotz der Vorteile des LLNA: BrdU-ELISA gegenüber B.6 und OECD-Prüfrichtlinie 406 (13) ist er mit gewissen Einschränkungen behaftet, die die Anwendung von B.6 oder von OECD-Prüfrichtlinie 406 erforderlich machen können (*z. B.* die Prüfung bestimmter Metalle, falsch positive Ergebnisse bei bestimmten hautreizenden Stoffen [wie etwa bei tensidähnlichen Chemikalien] (6) (1 und Kapitel B.42 in diesem Anhang), oder die Löslichkeit der Prüfsubstanz). Zudem können chemische Klassen oder Substanzen mit Funktionsgruppen, die erwiesenermaßen als potenzielle Störfaktoren wirken können (15), den Einsatz von Meerschweinchen-Tests erforderlich machen (B.6; OECD-Prüfrichtlinie 406 (13)). Beschränkungen, die für den LLNA festgestellt wurden (1 und Kapitel B.42 dieses Anhangs), empfehlen sich auch für den LLNA: BrdU-ELISA (10). Abgesehen von diesen bekannten Beschränkungen dürfte der LLNA: BrdU-ELISA für die Prüfung aller Chemikalien geeignet sein, sofern mit diesen Chemikalien keine Eigenschaften verbunden sind, die die Genauigkeit des LLNA: BrdU-ELISA beeinträchtigen könnten. Außerdem sollte die Möglichkeit positiver Grenzergebnisse in Betracht gezogen werden, wenn für den Stimulationsindex (SI) Werte zwischen 1,6 und 1,9 ermittelt werden (siehe Absätze 31-32). Dies beruht auf der Validierungs-Datenbasis von 43 Substanzen mit einem SI $\geq$ 1,6 (siehe Absatz 6), bei denen der LLNA: BrdU-ELISA alle 32 LLNA-Sensibilisatoren richtig identifizierte, jedoch zwei von 11 LLNA-Nichtsensibilisatoren mit SI-Werten zwischen 1,6 und 1,9 (*d. h.* positive Grenzwerte) nicht korrekt identifizierte (10). Da allerdings derselbe Datensatz für die Einstellung der SI-Werte und die Berechnung der prädiktiven Eigenschaften des Tests verwendet wurde, könnten die festgestellten Ergebnisse auch eine Überbewertung der tatsächlichen prädiktiven Eigenschaften sein.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

6. Der LLNA: BrdU-ELISA beruht auf dem Prinzip, dass sensibilisierende Stoffe eine Lymphozytenproliferation in den drainierenden Lymphknoten an der Stelle der Applikation des chemischen Stoffes induzieren. Diese Proliferation verläuft proportional zur Dosis und zur Wirksamkeit des applizierten Allergens und bietet sich als einfache Möglichkeit an, eine quantitative Messung der Sensibilisierung zu erhalten. Die Proliferation wird gemessen, indem man die mittlere Proliferation jeder Prüfgruppe mit der mittleren Proliferation der mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe vergleicht. Das Verhältnis der mittleren Proliferation in jeder Behandlungsgruppe zu dem in der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe, auch als SI bezeichnet, wird festgelegt und sollte $\geq$ 1,6 betragen, ehe eine weitere Bewertung einer Prüfsubstanz als potenzieller Hautsensibilisator erfolgt. Die hier beschriebenen Methoden beruhen auf der Messung des

▼M3

BrdU-Gehalts zur Anzeige einer erhöhten Anzahl proliferierender Zellen in den drainierenden aurikulären Lymphknoten. BrdU ist eine Nachbildung von Thymidin und wird ähnlich in die DNA proliferierender Zellen integriert. Die Integration von BrdU wird durch ELISA mittels eines für BrdU spezifischen Antikörpers gemessen, der auch mit Peroxidase markiert wird. Bei Hinzufügung des Substrats reagiert die Peroxidase mit diesem und es entsteht ein gefärbtes Produkt, das mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts auf ein bestimmtes Absorptionsmaß gemessen wird.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

**Auswahl von Versuchstierarten**

7. Für diesen Test ist die Maus die Spezies der Wahl. Validierungsstudien für den LLNA: BrdU-ELISA wurden ausschließlich mit dem CBA/JN-Stamm durchgeführt, der daher als bevorzugter Stamm gilt (10) (12). Es werden junge erwachsene weibliche Mäuse verwendet, die weder geworfen haben noch trächtig sind. Bei Versuchsbeginn sollten die Tiere 8-12 Wochen alt sein, die Gewichtsunterschiede minimal sein und 20 % des mittleren Gewichts nicht übersteigen. Alternativ können Tests an anderen Stämmen und männlichen Tieren erfolgen, wenn anhand von hinlänglich großen Datenangaben nachgewiesen werden kann, dass keine signifikanten stamm- und/oder geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Reaktion auf den LLNA: BrdU-ELISA bestehen.

**Haltungs- und Fütterungsbedingungen**

8. Mäuse sollten in Gruppen gehalten werden (16), wenn nicht angemessene wissenschaftliche Begründungen eine Einzelhaltung nahelegen. Die Temperatur im Versuchsraum sollte 22 ± 3 °C betragen. Obwohl die relative Luftfeuchtigkeit mindestens 30 % betragen und zu anderen Zeiten als während der Reinigung vorzugsweise nicht über 70 % liegen soll, ist ein Wert von 50-60 % anzustreben. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. An die Versuchstiere kann herkömmliches Laborfutter verfüttert werden, und eine unbegrenzte Trinkwasserversorgung ist zu gewährleisten.

**Vorbereitung der Tiere**

9. Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zur individuellen Identifizierung markiert (aber nicht am Ohr) und vor Beginn der Dosierung für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen gewöhnt. Vor Behandlungsbeginn werden alle Tiere untersucht, um sicherzustellen, dass keine sichtbaren Hautverletzungen bestehen.

**Vorbereitung der Dosierlösungen**

10. Feste Chemikalien sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in Lösungsmitteln/Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Chemikalien können direkt appliziert oder zuvor verdünnt werden. Unlösliche Chemikalien, wie sie in der Regel in Medizinprodukten vorliegen, sollten vor der Applikation in ein Mäuseohr in einem geeigneten Lösungsmittel einer übertrieben starken Extraktion unterzogen werden, um alle extrahierbaren Inhaltsstoffe vor der Prüfung sichtbar zu machen. Die Prüfsubstanzen sollten täglich zubereitet werden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

**Überprüfung der Zuverlässigkeit:**

11. Anhand von positiven Kontrollchemikalien (PC) wird die ordnungsgemäße Leistung des Tests nachgewiesen. Hierzu ist eine angemessene und reproduzierbare Empfindlichkeit der Reaktion auf eine sensibilisierende Prüfsubstanz erforderlich, wobei die Reaktionsstärke gut charakterisiert ist. Es wird die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrolle empfohlen, da diese die Fähigkeit des Labors belegt, jeden Test erfolgreich durchzuführen und eine Bewertung der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Labors ermöglicht. Einige Regulierungsbehörden schreiben auch eine Positivkontrolle für jede Studie vor. Daher wird Anwendern empfohlen, vor Durchführung des LLNA: BrdU-ELISA die zuständigen Behörden

▼M3

zu Rate zu ziehen. Dementsprechend wird die routinemäßige Verwendung einer gleichzeitigen Positivkontrolle angeregt, um die Notwendigkeit zusätzlicher Tierversuche zur Erfüllung von Anforderungen zu vermeiden, die aus der Verwendung einer nur periodischen Positivkontrolle resultieren könnten (siehe Absatz 12). Die Positivkontrolle sollte eine positive Reaktion auf den LLNA: BrdU-ELISA bei einem Expositionsniveau hervorrufen, das einen Anstieg des Stimulationsindex (SI ≥ 1,6 im Vergleich zur Negativkontrollgruppe, NK) bewirkt. Die positive Kontrolldosis soll so gewählt werden, dass sie keine übermäßige Hautreizung oder systemische Toxizität verursacht und die Induktion reproduzierbar, aber nicht exzessiv ist (*z. B.* ein SI > 14 würde als exzessiv gelten). Bevorzugte positive Kontrollstoffe sind 25 % Hexylcinnaminaldehyd (CAS-Nr. 101-86-0) und 25 % Eugenol (CAS-Nr. 97-53-0) in Aceton: Olivenöl (4:1, v/v). Unter bestimmten Umständen können in ausreichend begründeten Fällen andere Kontrollsubstanzen eingesetzt werden, die den genannten Kriterien entsprechen.

12. Obwohl die Einbeziehung einer gleichzeitigen Positivkontrollgruppe empfohlen wird, können in gewissen Situationen periodische Prüfungen (*d. h.* in Abständen ≤ 6 Monaten) der Positivkontrolle für Laboratorien ausreichen, die denen der LLNA: BrdU-ELISA regelmäßig (*d. h.* mindestens einmal pro Monat) durchgeführt wird und die über eine etablierte historische Kontrolldatenbasis verfügen, die die Fähigkeit des Labors bestätigt, reproduzierbare und genaue Ergebnisse mit Positivkontrollen zu erzielen. Eine angemessene Beherrschung des LLNA: BrdU-ELISA kann erfolgreich nachgewiesen werden, indem durchgehend positive Ergebnisse mit den positiven Kontrollchemikalien in mindestens 10 unabhängigen Prüfungen erzielt werden, die innerhalb eines angemessenen Zeitraums (*d. h.* in weniger als einem Jahr) durchgeführt wurden.

13. Eine gleichzeitige Positivkontrollgruppe sollte immer einbezogen werden, wenn Verfahrensänderungen im LLNA: BrdU-ELISA auftreten (*z. B.* Wechsel des geschulten Personals, Änderung der Materialien bei den Prüfmethoden und/oder der Reagenzien, Änderung der Ausrüstung, Änderung der Herkunft der Versuchstiere). Solche Änderungen sollten in Laborberichten dokumentiert werden. Ferner ist der Einfluss dieser Änderungen auf die Aussagefähigkeit der zuvor eingerichteten historischen Datenbank zu bedenken. Dabei sollte die Notwendigkeit überdacht werden, eine neue historische Datenbank einzurichten, um die gleichbleibende Qualität der positiven Kontrollergebnisse zu dokumentieren.

14. Die Prüfer sollten sich der Tatsache bewusst sein, dass die Entscheidung, eine PC-Studie periodisch statt gleichzeitig durchzuführen, Auswirkungen auf die Aussagefähigkeit und Akzeptanz negativer Studienergebnisse haben kann, die ohne gleichzeitige Positivkontrolle im Zeitraum zwischen den einzelnen periodischen PC-Studien auftreten können. Wenn zum Beispiel ein falsch negatives Ergebnis in der periodischen PC-Studie auftritt, können negative Ergebnisse für die Prüfsubstanz, die in dem Zeitraum zwischen der letzten akzeptablen periodischen PC-Studie und der inakzeptablen periodischen PC-Studie aufgetreten waren, in Frage gestellt werden. Die Auswirkungen solcher Ergebnisse sollten sorgfältig bedacht werden, wenn entschieden wird, ob gleichzeitige oder nur periodische PC-Studien durchgeführt werden sollen. Auch ist die Verwendung einer geringeren Anzahl an Versuchstieren bei der gleichzeitigen Positivkontrollgruppe zu bedenken, wenn dies wissenschaftlich zu begründen ist und wenn das Labor auf der Grundlage laborspezifischer historischer Daten demonstriert, dass eine geringere Anzahl an Mäusen ausreicht (17).

15. Obwohl eine positive Kontrollchemikalie in dem Vehikel geprüft werden sollte, von dem bekannt ist, dass es eine gleichbleibende Reaktion hervorruft (*z. B.* Aceton: Olivenöl; 4:1, v/v), können in bestimmten Rechtssituationen auch Prüfungen in einem Nichtstandard-Vehikel (klinisch/chemisch relevante Formulierung) erforderlich sein (18). Wenn die gleichzeitige Positivkontrolle in einem anderen Vehikel als der Prüfsubstanz getestet wird, sollte eine gesonderte Vehikelkontrolle für die gleichzeitige PC einbezogen werden.

▼M3

16. In Fällen, in denen Prüfsubstanzen einer bestimmten chemischen Klasse oder eine Reihe von Reaktionen bewertet werden, können Referenzsubstanzen nützlich sein, um nachzuweisen, dass die Prüfmethode zur Feststellung des Hautsensibilisierungspotenzials dieser Art von Substanzen ordnungsgemäß funktioniert. Geeignete Referenzsubstanzen sollten die folgenden Eigenschaften haben:

— strukturelle und funktionale Ähnlichkeit mit der Klasse der getesteten Prüfsubstanz;

— bekannte physikalische/chemische Eigenschaften;

— zugrunde liegende Daten aus dem BrdU-ELISA;

— zugrunde liegende Daten aus anderen Tiermodellen und/oder von Menschen.

TESTVERFAHREN

**Anzahl der Versuchstiere und Dosierungen**

17. Mindestens vier Tiere pro Dosisgruppe mit jeweils mindestens drei Konzentrationen der Prüfsubstanz werden benötigt; zusätzlich braucht man eine Negativkontrollgruppe, die nur mit dem Vehikel für die Prüfsubstanz behandelt wird, sowie eine Positivkontrolle (gleichzeitig oder jüngeren Datums, auf der Grundlage der Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11-15). Tests mit Mehrfachdosen der PC sollten in Erwägung gezogen werden, insbesondere wenn die Positivkontrolle intermittierend getestet wird. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

18. Die Auswahl von Dosierung und Vehikel sollte auf den Empfehlungen in den Referenzen 2 und 19 beruhen. Für aufeinanderfolgende Dosierungen werden normalerweise geeignete abgestufte Konzentrationen gewählt, wie z. B. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % usw. Die Auswahl der Konzentrationsfolge sollte angemessen wissenschaftlich begründet werden. Alle vorhandenen toxikologischen Angaben (*z. B.* über die akute Toxizität und Hautreizung) sowie strukturelle und physiochemische Angaben zu der jeweiligen Prüfsubstanz (und/oder strukturverwandten Substanzen) sollten bei der Festlegung von drei aufeinander folgenden Konzentrationen berücksichtigt werden, so dass bei der Höchstkonzentration einerseits die Exposition maximiert und andererseits eine systemische Toxizität und/oder eine übermäßige lokale Hautreizung ausgeschlossen werden (19) (20 und Kapitel B.4 dieses Anhangs). Mangels solcher Informationen kann ein anfänglicher Dosisfindungstest erforderlich sein (siehe Absätze 21-24).

19. Das Vehikel sollte das Testergebnis nicht beeinflussen oder beeinträchtigen und sollte so gewählt werden, dass die Löslichkeit zur Erzielung einer möglichst hohen Konzentration maximiert und gleichzeitig eine für das Applizieren der Prüfsubstanz geeignete Lösung/Suspension hergestellt werden kann. Empfohlene Vehikel sind Aceton: Olivenöl (4:1, v/v), *N,N*-Dimethylformamid, Methylethylketon, Propylenglykol und Dimethylsulphoxid (6), wobei mit hinreichender wissenschaftlicher Begründung auch andere Vehikel verwendet werden können. Unter bestimmten Umständen muss ein klinisch relevantes Lösungsmittel oder die handelsübliche Zubereitung, in der die Prüfsubstanz vermarktet wird, als zusätzliche Kontrolle genutzt werden. Besondere Sorgfalt sollte darauf verwendet werden, zu gewährleisten, dass in das Vehikelsystem durch die Verwendung geeigneter Lösungsvermittler (*z. B.* 1 % Pluronic® L92) hydrophile Stoffe eingearbeitet werden, die die Haut befeuchten und nicht sofort ablaufen. Folglich sind vollständig wässrige Vehikel zu vermeiden.

▼M3

20. Die Arbeit an Lymphknoten einzelner Mäuse ermöglicht die Bewertung der Variabilität von Tieren sowie einen statistischen Vergleich zwischen der Prüfsubstanz und Messungen an der Vehikelkontrollgruppe (siehe Absatz 33). Die Möglichkeit, die Anzahl der Mäuse in der Positivkontrollgruppe zu verringern, ist nur realistisch, wenn Einzeltierdaten erhoben werden (17). Außerdem verlangen einige Regulierungsbehörden die Erhebung von Daten einzelner Tiere. Die regelmäßige Erhebung von Einzeltierdaten stellt im Hinblick auf den Tierschutz einen Vorteil dar, indem Doppeltests vermieden werden. Diese wären notwendig, wenn die ursprünglich gemeinsam gesammelten Ergebnisse für die Prüfsubstanz (*z. B.* über gepoolte Daten) später von Regulierungsbehörden mit anderen Vorschriften (*z. B.* Einzeltierdaten) geprüft würden.

**Dosisfindungstest**

21. Wenn über die höchst mögliche Dosierung keine Informationen vorliegen (siehe Absatz 18), sollte ein Dosisfindungstest durchgeführt werden, um die geeignete Dosierung für den LLNA: BrdU-ELISA festzulegen. Der Dosisfindungstest soll eine Orientierung bei der Auswahl der höchst möglichen Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA: BrdU-ELISA geben, wenn keine Informationen darüber vorliegen, welche Konzentration systemische Toxizität (siehe Absatz 24) und/oder übermäßige lokale Hautreizung (siehe Absatz 23) verursacht. Die höchste geprüfte Dosisstufe sollte eine Konzentration von 100 % der Prüfsubstanz bei Flüssigkeiten bzw. die höchst mögliche Konzentration bei Feststoffen oder Suspensionen sein.

22. Der Dosisfindungstest wird unter Bedingungen durchgeführt, die denen der Hauptstudie des LLNA: BrdU-ELISA genau entsprechen. Allerdings gibt es hier keine Bewertung der Lymphknotenproliferation und es können weniger Tiere pro Dosisgruppe eingesetzt werden. Es werden ein oder zwei Tiere pro Dosisgruppe empfohlen. Alle Mäuse werden täglich auf klinische Zeichen für systemische Toxizität oder lokale Reizungen an der Applikationsstelle untersucht. Das Körpergewicht wird vor dem Test und vor dem Abschluss (Tag 6) protokolliert. Beide Ohren jeder Maus werden auf Anzeichen für Erytheme untersucht und mit Hilfe von Tabelle 1 (20 und Kapitel B.4 dieses Anhangs) bewertet. Die Ohrdicke wird mit Hilfe eines Ohrdickenmessgeräts (*z. B.* digitaler Mikrometer oder Peacock Dickenmessuhr) an Tag 1 vor der Dosierung, Tag 3 (ca. 48 Stunden nach der ersten Dosis) und Tag 6 bestimmt. Zusätzlich kann an Tag 6 die Ohrdicke durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben ermittelt werden. Dies sollte nach der tierschutzgerechten Tötung der Tiere erfolgen. Eine übermäßige lokale Hautreizung wird durch eine Erythem-Punktzahl von ≥ 3 und/oder eine Zunahme der Ohrdicke ≥ 25 % an jedem beliebigen Messtag angezeigt (21) (22). Als höchste Dosis für die Hauptuntersuchung des LLNA: BrdU-ELISA wird die nächst niedrigere Dosis in der Konzentrationsreihe des Dosisfindungstests gewählt (siehe Absatz 18), die keine systemische Toxizität und/oder übermäßige lokale Hautreizung verursacht.

*Tabelle 1*

**Erythem-Klassifizierung**

| Beobachtung | Punktzahl |
|---|---|
| Kein Erythem | 0 |
| Sehr leichtes Erythem (kaum wahrnehmbar) | 1 |
| Klar abgegrenztes Erythem | 2 |

▼M3

| Beobachtung | Punktzahl |
|---|---|
| Mäßiges bis ausgeprägtes Erythem | 3 |
| Schweres Erythem (dunkelrot) bis hin zur Schorfbildung, so dass eine Bewertung nicht möglich ist | 4 |

23. Zusätzlich zu einer Zunahme der Ohrdicke um 25 % (21) (22) wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der Ohrdicke bei den behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen zugrundelegt, um Reizstoffe in dem LLNA zu identifizieren (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Obwohl ein statistisch signifikanter Anstieg auch bei einer Ohrdicke von weniger als 25 % auftreten kann, konnte kein spezifischer Zusammenhang mit einer übermäßigen Hautreizung festgestellt werden (25) (26) (27) (28) (29).

24. Die folgenden klinischen Beobachtungen können, sofern sie Bestandteil einer Gesamtbewertung sind, auf systemische Toxizität hinweisen (30) und somit die höchst mögliche Dosisstufe für die Hauptuntersuchung des LLNA: BrdU-ELISA anzeigen: Änderungen der Funktionen des Nervensystems (*z. B.* Piloerektion, Ataxie, Tremor und Krämpfe); Verhaltensänderungen (*z. B.* Aggressivität, Änderungen bei der Fellpflege, auffallende Änderung des Aktivitätsniveaus); Änderungen des Atemmusters (*d. h.* Änderung der Häufigkeit und Intensität des Atmens wie Dyspnoe, Keuchen, rasselnder Atem) sowie Änderungen der Futter- und Wasseraufnahme. Zusätzlich sollten Anzeichen von Lethargie und/oder Teilnahmslosigkeit sowie alle klinischen Anzeichen für mehr als leichte oder momentane Schmerzen und Qual, eine Gewichtsreduktion von > 5 % zwischen Tag 1 und Tag 6 und die Sterblichkeit in der Bewertung berücksichtigt werden. Moribunde Tiere oder Tiere, die Anzeichen starker und andauernder Qualen zeigen, sollten tierschutzgerecht getötet werden (31).

**Versuchsplan der Hauptuntersuchung**

25. Der Versuchsplan des Tests ist wie folgt:

— *Tag 1:* Jedes Tier wird einzeln gekennzeichnet und das Gewicht sowie jede klinische Beobachtung protokolliert. Es werden 25 µL der Prüfsubstanz in der jeweiligen Verdünnung, des Vehikels allein oder der Positivkontrolle (gleichzeitig oder jüngeren Datums) gemäß den Laborvorschriften in den relevanten Abschnitten 11-15) auf die Rückseite jedes Ohrs appliziert.

— *Tage 2 und 3:* Die am Tag 1 durchgeführte Applikationsprozedur wird wiederholt.

— *Tag 4:* Keine Behandlung.

— *Tag 5:* Es werden 0,5 mL (5 mg/Maus) BrdU-Lösung (10 mg/mL) in die Bauchhöhle gespritzt.

— *Tag 6:* Das Gewicht jedes Tiers sowie jede klinische Beobachtung werden protokolliert. Ca. 24 Stunden (24 h) nach der BrdU-Injektion werden die Tiere tierschutzgerecht getötet. Die drainierenden aurikulären Lymphknoten jedes Mäuseohrs werden entfernt und separat (für jedes Tier einzeln) in phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) gegeben. Einzelheiten und Diagramme der Lymphknotenidentifikation und -entfernung sind unter Referenz (17) aufgeführt. Zur weiteren Kontrolle der lokalen Hautreaktion in der Hauptuntersuchung können zusätzliche Parameter wie die Auswertung des Ohr-Erythems oder Ohrdickemessungen (mittels eines Dickenmessgeräts oder durch die Gewichtsbestimmung von Ohrstanzproben bei der Nekropsie) in das Untersuchungsprotokoll aufgenommen werden.

▼M3

**Vorbereitung der Zellsuspensionen**

26. Für jede Maus wird aus den paarweise entnommenen Lymphknotenzellen (LNC) durch vorsichtigen mechanischen Aufschluss in einem Edelstahlfilter mit einer Maschenweite von 200 Mikron oder mittels einer anderen geeigneten Technik (*z. B.* Verwendung eines wegwerfbaren Kunststoff-Stößels zum Zerkleinern der Lymphknoten, die anschließend durch ein #70 Nylon-Gewebe passiert werden) eine Einzelzellsuspension hergestellt. Das Verfahren zur Zubereitung der Lymphknotensuspension ist für diesen Test von entscheidender Bedeutung. Deshalb sollte jeder Prüfer diese Technik im Voraus gut beherrschen erlernen. Die Lymphknoten bei Tieren der Negativkontrollgruppe sind klein; daher ist Vorsicht geboten, um eine ungewollte Beeinflussung der SI-Werte zu vermeiden. In jedem Fall sollte das Zielvolumen der LNC-Lösung an ein vorgegebenes Optimalvolumen (ca. 15 mL) angepasst werden. Das Optimalvolumen beruht auf der Erzielung eines mittleren Absorptionsmaßes der Negativkontrollgruppe zwischen 0,1 und 0,2.

**Bestimmung der Zellproliferation (Messung des BrdU-Gehalts in der DNA der Lymphozyten)**

27. Die Messung des BrdU erfolgt im ELISA mit einem im Handel erhältlichen Mess-Kit (*z. B.* Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland, Katalog-Nr. 11 647 229 001). Darauf werden kurz 100 µL der Lymphknoten-Suspension in die Vertiefungen einer flachgrundigen Mikroplatte in dreifacher Ausfertigung gegeben. Nach der Fixierung und Denaturierung der Lymphknoten-Suspension werden in jede Vertiefung Anti-BrdU-Antikörper gegeben und zur Reaktion gebracht. Die Anti-BrdU-Antikörper werden anschließend durch Spülen entfernt. Die Substratlösung wird hinzugefügt und kann Chromogen erzeugen. Anschließend wird das Absorptionsmaß bei 370 nm mit einer Referenzwellenlänge von 492 nm gemessen. In allen Fällen sollten die Prüfbedingungen des Tests optimiert werden (siehe Absatz 26).

BEOBACHTUNGEN

**Klinische Beobachtungen**

28. Jede Maus sollte mindestens einmal täglich sorgfältig auf klinische Zeichen, d. h. lokale Reizung an der Applikationsstelle, oder auf systemische Toxizität untersucht werden. Alle Beobachtungen werden systematisch in Einzelprotokollen dokumentiert, die für jedes Tier geführt werden. Die Überwachungspläne sollten Kriterien beinhalten, anhand derer Mäuse mit systemischer Toxizität, übermäßiger lokaler Hautreizung oder Hautätzung schnell zu Zwecken der schmerzlosen Tötung identifiziert werden können (31).

**Körpergewicht**

29. In Abschnitt 25 wurde bereits ausgeführt, dass das Körpergewicht der einzelnen Tiere zu Versuchsbeginn und zum Zeitpunkt der tierschutzgerechten Tötung der Tiere laut Versuchsplan festgestellt werden soll.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

30. Die Ergebnisse für jede Behandlungsgruppe werden als mittlerer Stimulationsindex (SI) angegeben. Den SI erhält man durch Teilen des mittleren BrdU-Markierungsindex pro Maus innerhalb jeder Prüfgruppe und der Positivkontrollgruppe durch den mittleren BrdU-Markierungsindex pro Maus für die Lösungsmittel/Vehikelkontrollgruppe. Der durchschnittliche SI beträgt demnach für die mit Vehikel behandelten Kontrollen 1.

Der BrdU-Markierungsindex ist definiert als:

BrdU-Markierungsindex = ($ABS_{em}$ — ABS $blank_{em}$) — ($ABS_{ref}$ — ABS $blank_{ref}$)

Dabei gilt: em = Emissionswellenlänge und ref = Referenzwellenlänge.

▼M3

31. In dem Entscheidungsprozess gilt ein Ergebnis als positiv, wenn SI ≥ 1,6 ist (10). Die Stärke der Dosis-Wirkung, die statistische Signifikanz und die gleichbleibende Qualität der Lösungsmittel-/Vehikel-Reaktion sowie der Reaktion der Positivkontrolle können aber auch benutzt werden, um festzulegen, ob ein Grenzergebnis (*d. h.* SI-Wert zwischen 1,6 und 1,9) als positiv bezeichnet werden soll (3) (6) (32).

32. Bei einer positiven Grenzwertreaktion mit einem SI zwischen 1,6 und 1,9 können Anwender zusätzliche Informationen berücksichtigen, wie z. B. die Dosis-Wirkungs-Beziehung, das Vorliegen einer systemischen Toxizität oder übermäßigen Hautreizung, sowie gegebenenfalls die statistische Signifikanz zusammen mit den SI-Werten, um zu bestätigen, dass die Ergebnisse positiv sind (10). Zu beachten sind ferner die verschiedenen Eigenschaften der Prüfsubstanz, wobei es unter anderem zu klären gilt, ob ein struktureller Zusammenhang mit bekannten Hautsensibilisatoren besteht, ob sie eine übermäßige lokale Hautreizung bei der Maus hervorruft und wie die festgestellte Art der Dosis-Wirkungs-Beziehung ist. Diese und weitere Aspekte werden an anderer Stelle ausführlich erörtert (4).

33. Werden die Daten für jede einzelne Maus erhoben, kann eine statistische Analyse zu Vorhandensein und Grad des Dosis-Wirkungs-Verhältnisses in den Daten durchgeführt werden. Jede statistische Auswertung könnte eine Bewertung der Dosis-Wirkungs-Beziehung sowie geeignete Testgruppen-Vergleiche beinhalten (*z. B.* Gruppe mit paarweiser Dosierung vs. gleichzeitige Lösungsmittel-/Vehikelkontrollgruppen). Die statistischen Analysen könnten z. B. die lineare Regression, den Williams-Test zur Bewertung von Dosis-Wirkungs-Trends oder den Dunnett-Test für paarweise Vergleiche beinhalten. Bei der Auswahl einer geeigneten Methode für die statistische Analyse sollte sich der Prüfer möglicher ungleicher Varianzen und anderer damit zusammenhängender Probleme stets bewusst sein, denn diese erfordern unter Umständen eine Datentransformation oder ein nicht-parametrisches statistisches Verfahren. Auf jeden Fall muss der Prüfer unter Umständen SI-Berechnungen und statistische Analysen mit und ohne bestimmte Datenpunkte (manchmal als „Ausreißer“ bezeichnet) vornehmen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Daten**

34. Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Sie sollten die BrdU-Index-Werte pro Tier, den mittleren BrdU-Markierungsindex pro Tier für jede Gruppe, die damit verbundene Fehlervariable (*z. B.* SD, SEM) und den mittleren SI für jede Dosisgruppe, verglichen mit der gleichzeitigen Lösungsmittel-/Vehikelkontrollgruppe angeben.

**Prüfbericht**

35. Der Testbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Prüf- und Kontrollsubstanzen:

— Angaben zur Identität (*z. B.* CAS-Nummer und EG-Nummer, falls vorhanden; Bezugsquelle; Reinheit; bekannte Verunreinigungen; Chargennummer);

— physikalische Beschaffenheit und physikalisch-chemische Eigenschaften (*z. B.* Flüchtigkeit, Stabilität, Löslichkeit);

— bei Mischungen Zusammensetzung und relative Anteile der Bestandteile in Prozent;

Lösungsmittel/Vehikel:

— Angaben zur Identität (Reinheit, Konzentration, gegebenenfalls verwendete Mengen);

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

▼**M3**

Versuchstiere:

— Herkunft der CBA-Mäuse;

— mikrobiologischer Status der Tiere, soweit bekannt;

— Anzahl und Alter der Tiere;

— Herkunft der Tiere, Haltungsbedingungen, Futter usw.;

Prüfbedingungen:

— Herkunft, Chargennummer und Angaben des Herstellers zu Qualitätssicherung/Qualitätskontrolle (Antikörperempfindlichkeit und -spezifizität sowie Nachweisgrenze) für das ELISA-Kit;

— Angaben zur Vorbereitung und Applikation der Prüfsubstanz;

— Begründung der gewählten Dosierung (mit Ergebnissen des eventuell durchgeführten Dosisfindungstests);

— verwendete Konzentrationen des Vehikels und der Prüfsubstanz sowie Gesamtmenge der applizierten Prüfsubstanz;

— Angaben über Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Wasserquelle);

— nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;

— Methoden zur Bestimmung der Toxizität;

— Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv oder negativ;

— Einzelheiten zu eventuellen Protokollabweichungen und eine Erklärung dazu, wie sich diese Abweichung auf Prüfdesign und Ergebnisse auswirkt.

Überprüfung der Zuverlässigkeit:

— Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der letzten Überprüfung der Zuverlässigkeit mit Angaben zu verwendeten Prüfsubstanzen, Konzentration und Vehikel;

— gleichzeitige und/oder historische PC und gleichzeitige Daten der Negativkontrolle (Lösungsmittel/Vehikel) für das Prüflabor;

— wenn keine gleichzeitige PC eingeschlossen war, Datum und Laborbericht über die jüngste periodische PC sowie ein Bericht mit ausführlichen Angaben über die historischen positiven Kontrolldaten des Labors mit Angabe der Gründe, warum keine gleichzeitige PC durchgeführt wurde;

Ergebnisse:

— Gewicht der einzelnen Tiere bei Beginn der Prüfung und zum Zeitpunkt der tierschutzgerechten Tötung laut Versuchsplan, sowie mittlere und zugehörige Fehlervariable (*z. B.* SD, SEM) für jede Behandlungsgruppe;

— Beginn und zeitlicher Verlauf der toxischen Erscheinungen für jedes Tier, einschließlich gegebenenfalls Hautreizungen an der Stelle der Verabreichung;

— Tabelle der BrdU-Markierungsindizes für jede Maus und der SI-Werte für jede Dosis-Behandlungsgruppe;

— mittlere zugehörige Fehlervariable (*z. B.* SD, SEM) für den BrdU-Markierungsindex/Maus für jede Behandlungsgruppe sowie die Ergebnisse der Ausreißer-Analyse für jede Behandlungsgruppe;

▼M3

— berechneter SI und geeignete Messung der Variabilität, welche die Variabilität der Tiere sowohl in der Behandlungsgruppe als auch in der Kontrollgruppe berücksichtigt;

— Dosis-Wirkungs-Beziehung;

— gegebenenfalls statistische Analysen.

Diskussion der Ergebnisse:

— Kurze Kommentierung der Ergebnisse, der Dosis-Wirkungs-Beziehung und gegebenenfalls der statistischen Analysen mit Schlussfolgerungen zur Frage, ob die Prüfsubstanz als Hautsensibilisator eingestuft werden soll.

LITERATUR

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Abrufbar unter: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

*Anlage 1*

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

*Genauigkeit:* Der Grad an Übereinstimmung zwischen Testergebnissen und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung der Prüfmethode und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse einer Prüfmethode (33).

*Vergleichssubstanz:* Eine sensibilisierende oder nicht sensibilisierende Substanz, die als Standard zu Vergleichszwecken für eine Prüfsubstanz verwendet wird. Geeignete Vergleichssubstanzen sollten die folgenden Eigenschaften haben: (i) gleichbleibende und verlässliche Quelle(n); (ii) strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit der Klasse der zu prüfenden Stoffe; (iii) bekannte physikalisch-chemische Eigenschaften; (iv) unterstützende Daten zu bekannten Effekten und (v) bekannte Wirksamkeit im Bereich der erwünschten Reaktion.

*Falsch negativ:* Eine Prüfsubstanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als negativ oder nicht wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit positiv bzw. wirksam ist (33).

*Falsch positiv:* Eine Prüfsubstanz, die durch eine Prüfmethode fälschlich als positiv oder wirksam charakterisiert wird, obwohl sie in Wirklichkeit negativ bzw. nicht wirksam ist (33).

*Gefahr:* Potenzial eines schädlichen Effekts für Gesundheit oder Umwelt. Die schädliche Wirkung manifestiert sich nur, wenn es zu einem ausreichenden Expositionsniveau kommt.

*Inter-Labor-Reproduzierbarkeit:* Das Ausmaß, in dem unterschiedliche qualifizierte Laboratorien, die dasselbe Protokoll verwenden und dieselben Prüfsubstanz testen, qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen können. Die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wird während der Prävalidierungs- und Validierungsverfahren ermittelt und zeigt das Maß an, in dem ein Test erfolgreich zwischen Laboratorien übertragen werden kann. Im englischen Sprachgebrauch spricht man in diesem Zusammenhang auch von „Between-laboratory reproducibility“ (33).

*Intra-Labor-Reproduzierbarkeit:* Das Ausmaß, in dem qualifizierte Personen innerhalb desselben Labors, die dasselbe spezifische Protokoll zu unterschiedlichen Zeiten verwenden, erfolgreich dieselben Ergebnisse replizieren können. In diesem Zusammenhang spricht man auch von laborinterner Reproduzierbarkeit (33).

*Ausreißer:* Ein Ausreißer ist ein Messwert, der sich beträchtlich von anderen Werten in einem zufällig ausgewählten Muster in einer Population unterscheidet.

*Qualitätssicherung:* Ein Managementprozess, mittels dessen die Einhaltung von Laborprüfnormen, Anforderungen und Aufzeichnungsverfahren, sowie die Genauigkeit des Datentransfers durch Individuen bewertet wird, die von den testenden Personen unabhängig sind.

*Zuverlässigkeit:* Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit der Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Interlabor-Reproduzierbarkeit bewertet (33).

*Hautsensibilisierung:* Ein immunologischer Prozess, der auftritt, wenn ein empfindliches Individuum oberflächlich einem induzierenden chemischen Allergen ausgesetzt ist, das eine kutane Immunreaktion auslöst, die zur Entwicklung einer Kontaktsensibilisierung führen kann.

*Stimulationsindex (SI):* Ein Wert, der zur Bewertung des Hautsensibilisierungspotenzials einer Prüfsubstanz berechnet wird. Der SI ist das Verhältnis der Proliferation in behandelten Gruppen zu dem der gleichzeitigen Vehikelkontrollgruppe.

*Prüfsubstanz (auch Prüfchemikalie):* Jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

▼M4

B.52 **AKUTE INHALATIONSTOXIZITÄT — AKUT-TOXISCHE KLASSENMETHODE**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 436 (2009). Die erste Methode zur Prüfung auf akute Inhalationstoxizität TG 403 wurde 1981 angenommen und seitdem überarbeitet (siehe Kapitel B.2 dieses Anhangs (1)). Nach der Annahme der überarbeiteten akut-toxischen Klassenmethode (ATK) mit oraler Verabreichung (Kapitel B.1 tris dieses Anhangs) (5) wurde es für angebracht gehalten, eine akut-toxische Klassenmethode mit Inhalation (2) (3) (4) zu entwickeln. Eine retrospektive Leistungsbewertung der ATK-Methode zur Prüfung auf akute Inhalationstoxizität hat gezeigt, dass die Methode für Zwecke der Einstufung und Kennzeichnung geeignet ist (6). Bei der ATK-Inhalationsprüfmethode kann die Toxizität der Prüfsubstanz mithilfe aufeinander folgender Stufen festgelegter Zielkonzentrationen eingestuft werden. Der wichtigste Endpunkt ist Letalität, aber Tiere, bei denen starke Schmerzen oder schweres Leiden festgestellt werden, oder Tiere, deren Tod bevorsteht, sollten zur Minimierung ihres Leidens tierschutzgerecht getötet werden. Hinweise zu humanen Endpunkten sind im OECD Guidance Document No. 19 (7) zu finden.

2. Das Guidance Document No. 39 on Acute Inhalation Toxicity Testing (GD 39 (8)) enthält Hinweise zur Durchführung und Auswertung dieser Prüfmethode.

3. Die im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode verwendeten Begriffe werden in Anlage 1 und im GD 39 (8) definiert.

4. Die Prüfmethode gibt Aufschluss über die gefährlichen Eigenschaften der Prüfsubstanz und ermöglicht ihre Einstufung gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 zur Einstufung chemischer Stoffe mit akut toxischer Wirkung (9). Falls Punktschätzungen von $LC_{50}$-Werten oder Analysen der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung erforderlich sind, ist Kapitel B.2 dieses Anhangs (1) die geeignete Prüfmethode. Weitere Hinweise zur Wahl der Prüfmethode sind im GD 39 (8) zu finden. Diese Prüfmethode ist nicht speziell für die Prüfung von Spezialmaterialien wie schwer löslichen isometrischen oder Fasermaterialien oder hergestellten Nanomaterialien bestimmt.

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

5. Bevor Versuche nach dieser Prüfmethode in Betracht gezogen werden, sollte das Prüflabor alle verfügbaren Informationen über die Prüfsubstanz, einschließlich bereits vorliegender Studien, deren Ergebnisse darauf hindeuten, dass auf weitere Versuche verzichtet werden kann, auswerten, damit möglichst wenig Tiere verwendet werden. Für die Auswahl der in Bezug auf Art, Stamm und Geschlecht am besten geeigneten Tiere sowie der geeigneten Expositionsart und Prüfkonzentrationen sollten u. a. Informationen wie die Identität, die chemische Struktur und die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, Ergebnisse jeglicher *In-vitro*- oder *In-vivo*-Toxizitätsprüfungen, vorgesehene Verwendungen und die Möglichkeit der Exposition des Menschen, (Q)SAR-Daten und toxikologische Daten über strukturverwandte Substanzen herangezogen werden. Konzentrationen, die wegen ätzender ([1]) oder stark reizender Wirkungen voraussichtlich starke Schmerzen und Qualen verursachen, sollten mit dieser Prüfmethode nicht geprüft werden [siehe GD 39 (8)].

([1]) Die Bewertung der Ätzwirkung könnte auf dem Urteil von Experten beispielsweise anhand folgender Belege beruhen: Erfahrungswerte bei Mensch und Tier, vorliegende (In-vitro-)Daten, z. B. Kapitel B.40 (10), B.40.bis (11) dieses Anhangs oder OECD TG 435 (12), pH-Werte sowie Informationen über ähnliche Substanzen und andere sachdienliche Daten.

▼M4

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

6. Das Prinzip der Prüfung besteht darin, in einem schrittweisen Verfahren genügend Informationen über die akute Toxizität der Prüfsubstanz nach Inhalation über einen Expositionszeitraum von 4 Stunden zu gewinnen, damit sie eingestuft werden kann. Für spezifische Regulierungszwecke sind andere Expositionszeiten möglich. Bei jeder der festgelegten Konzentrationsstufen werden je drei Tiere beider Geschlechter geprüft. Je nach Mortalität und/oder moribundem Zustand der Tiere können zwei Stufen ausreichen, um eine Beurteilung der akuten Toxizität der Prüfsubstanz zu ermöglichen. Gibt es Anhaltspunkte dafür, dass ein Geschlecht empfindlicher reagiert als das andere, kann die Prüfung mit dem empfindlicheren Geschlecht allein fortgesetzt werden. Das Ergebnis einer Stufe bestimmt die jeweils folgende Stufe:

   a) keine weitere Prüfung erforderlich,

   b) Prüfung von drei Tieren je Geschlecht oder

   c) Prüfung von sechs Tieren des empfindlicheren Geschlechts, d. h. die Schätzungen der Untergrenze der Toxizitätsklasse sollte unabhängig vom Geschlecht auf sechs Tieren je Prüfkonzentrationsgruppe basieren.

7. Moribunde Tiere oder Tiere, die offensichtlich unter Schmerzen leiden oder Anzeichen von schwerem und anhaltendem Leiden zeigen, sollten auf tierschutzgerechte Weise getötet werden und sind bei der Auswertung der Testergebnisse auf die gleiche Weise zu werten wie während des Tests gestorbene Tiere. Kriterien für die Entscheidung, moribunde oder schwer leidende Tiere zu töten, sowie Hinweise zur Erkennung des absehbaren oder bevorstehenden Todes sind Gegenstand des OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints (7).

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Auswahl von Versuchstierarten**

8. Es sollten junge, gesunde, adulte Tiere aus üblicherweise eingesetzten Laborstämmen verwendet werden. Bevorzugtes Versuchstier ist die Ratte; werden andere Tierarten eingesetzt, ist dies zu begründen.

**Vorbereitung der Tiere**

9. Die weiblichen Tiere dürfen weder bereits geworfen haben noch momentan trächtig sein. Am Tag der Exposition sollten die jungen, adulten Tiere 8 bis 12 Wochen alt sein; ihr Körpergewicht sollte innerhalb von ± 20 % des mittleren Gewichts für jedes Geschlecht aller zuvor exponierten Tiere desselben Alters liegen. Die Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zur individuellen Identifizierung markiert und vor Beginn der Prüfung für einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen gewöhnt. Die Tiere sollten auch für einen kurzen Zeitraum vor der Prüfung an die Versuchsapparatur gewöhnt werden, da dies den Stress durch die Umsetzung in eine neue Umgebung verringert.

**Tierhaltung**

10. Die Temperatur in dem Raum, in dem die Versuchstiere gehalten werden, sollte 22 ± 3 °C betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte im Idealfall im Bereich zwischen 30 und 70 % liegen; bei Verwendung von Wasser als Vehikel könnte dies jedoch unmöglich sein. Die Tiere sollten vor und nach den Expositionen im Allgemeinen nach Geschlecht und Konzentration in Käfigen gruppiert werden, wobei aber die Anzahl der Tiere pro Käfig noch eine genaue Beobachtung der einzelnen Tiere ermöglichen muss und Verluste aufgrund von Kannibalismus oder Kämpfen minimiert werden sollten. Wenn die Tiere der Prüfsubstanz nur mit der Nase ausgesetzt werden sollen, müssen sie möglicherweise an die Restrainer gewöhnt werden. Die Restrainer sollten die Tiere weder körperlich noch in Bezug auf Wärme oder Fixierung übermäßig beeinträchtigen. Die Fixierung kann physiologische

▼M4

Endpunkte wie Körpertemperatur (Hyperthermie) und/oder das Atemminutenvolumen beeinflussen. Wenn generische Daten zeigen, dass keine derartigen Veränderungen in nennenswertem Ausmaß vorkommen, ist eine Eingewöhnung an die Restrainer nicht erforderlich. Bei der Ganzkörperexposition gegen ein Aerosol sollten die Tiere während der Exposition einzeln untergebracht sein, damit sie die Prüfsubstanz nicht durch das Fell ihrer Käfiggenossen filtriert einatmen. Außer während der Exposition kann herkömmliches und zertifiziertes Labortierfutter verwendet werden bei uneingeschränkter Versorgung mit Trinkwasser. Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln.

**Inhalationskammern**

11. Bei der Auswahl einer Inhalationskammer sind die Art der Prüfsubstanz und das Ziel der Prüfung zu berücksichtigen. Das bevorzugte Verfahren ist die „Nose-only"-Exposition (dieser Begriff umfasst „nur Kopf", „nur Nase" oder „nur Schnauze"). Für die Untersuchung von Flüssigkeits- oder Feststoffaerosolen und für Dämpfe, die zu Aerosolen kondensieren können, wird im Allgemeinen die „Nose-only"-Exposition bevorzugt. Besondere Ziele der Untersuchung können möglicherweise mit einer Ganzkörperexposition besser erreicht werden, doch dies sollte im Prüfbericht begründet werden. Um bei Verwendung einer Ganzkörperkammer die Stabilität der Atmosphäre sicherzustellen, sollte das Gesamtvolumen der Versuchstiere 5 % des Volumens der Kammer nicht übersteigen. Die Grundzüge der „Nose-only"- und der Ganzkörperexposition sowie ihre jeweiligen Vor- und Nachteile sind im GD 39 (8) beschrieben.

EXPOSITIONSBEDINGUNGEN

**Verabreichung der Konzentrationen**

12. Es wird eine feste Expositionsdauer von 4 Stunden — ohne die zur Erreichung des Gleichgewicht erforderliche Zeit — empfohlen. Um spezifische Erfordernisse zu erfüllen, sind auch andere Expositionszeiten möglich; diese sind jedoch im Prüfbericht zu begründen [siehe GD 39 (8)]. Bei Ganzkörperexpositionen sollten die Tiere einzeln untergebracht sein, um eine Aufnahme der Prüfsubstanz durch das Putzen von Käfiggenossen zu verhindern. Während der Exposition sollte kein Futter verabreicht werden. Wasser kann während einer Ganzkörperexposition jederzeit angeboten werden.

13. Die Tiere werden der Prüfsubstanz in Form von Gas, Dampf, Aerosol oder einer Kombination dieser Formen ausgesetzt. Der zu prüfende Aggregatzustand hängt von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, der gewählten Konzentration und/oder der physikalischen Form ab, in der die Prüfsubstanz bei der Handhabung und Verwendung am wahrscheinlichsten vorliegt. Hygroskopische und chemisch reaktive Prüfsubstanzen sollten bei geringer Luftfeuchtigkeit geprüft werden. Dabei ist darauf zu achten, dass keine explosionsfähigen Konzentrationen erzeugt werden.

**Partikelgrößenverteilung**

14. Bei allen Aerosolen und bei Dämpfen, die zu Aerosolen kondensieren können, sollte die Partikelgröße bestimmt werden. Damit alle relevanten Regionen der Atemwege der Prüfsubstanz ausgesetzt werden, werden mittlere aerodynamische Massendurchmesser (Mass Median Aerodynamic Diameter — MMAD) von 1 bis 4 μm mit einer geometrischen Standardabweichung ($\sigma_g$) von 1,5 bis 3,0 empfohlen (8) (13) (14). Wenngleich nach Möglichkeit versucht werden sollte, diese Werte zu erreichen, ist Fachwissen erforderlich, falls sie nicht erzielt werden können. Metalldämpfe können z. B. unter diesen Werten liegen, und geladene Partikel, Fasern und hygroskopische Stoffe (die sich in der feuchten Umgebung der Atemwege ausdehnen) können diese Werte überschreiten.

▼M4

**Vorbereitung der Prüfsubstanz in einem Vehikel**

15. Um die gewünschte Konzentration und Partikelgröße der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen, kann ein Vehikel verwendet werden. Hierbei ist in der Regel Wasser zu bevorzugen. Partikel können durch mechanische Prozesse auf die erforderliche Größenverteilung gebracht werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Prüfsubstanz nicht zersetzt oder verändert wird. Wenn angenommen wird, dass die Zusammensetzung der Prüfsubstanz durch mechanische Prozesse verändert wurde (z. B. hohe Temperatur aufgrund von Reibung durch übermäßiges Mahlen), sollte die Zusammensetzung der Prüfsubstanz analytisch überprüft werden. Es ist darauf zu achten, dass die Prüfsubstanz nicht kontaminiert wird. Nicht brüchige Granulate, die speziell so formuliert sind, dass sie nicht eingeatmet werden können, brauchen nicht geprüft zu werden. Mit einem Abriebtest sollte nachgewiesen werden, dass beim Umgang mit dem Granulat keine lungengängigen Partikel entstehen. Entstehen bei einem Abriebtest lungengängige Partikel, so sollte eine Inhalationstoxizitätsprüfung durchgeführt werden.

**Kontrolltiere**

16. Eine negative Kontrollgruppe (Luft) ist nicht erforderlich. Wenn zur Erzeugung der Prüfatmosphäre ein anderes Vehikel als Wasser verwendet wird, sollte nur dann eine Vehikelkontrollgruppe verwendet werden, wenn keine historischen Daten über Inhalationstoxizität vorliegen. Ergibt eine Toxizitätsstudie einer in einem Vehikel formulierten Prüfsubstanz, dass keine Toxizität vorliegt, ist das Vehikel folglich in der geprüften Konzentration nicht toxisch. Daher ist keine Vehikelkontrolle erforderlich.

ÜBERWACHUNG DER EXPOSITIONSBEDINGUNGEN

**Luftstrom in der Inhalationskammer**

17. Der Luftstrom durch die Kammer sollte während jeder Exposition sorgfältig geregelt, kontinuierlich überwacht und mindestens stündlich protokolliert werden. Die Überwachung der Konzentration (oder Stabilität) der Prüfatmosphäre ist eine integrale Messung aller dynamischen Parameter und gibt indirekt die Möglichkeit, alle relevanten dynamischen Parameter der Erzeugung der Prüfatmosphäre zu messen. Es sollte besonders darauf geachtet werden, das erneute Einatmen in „Nose-only"-Expositionskammern zu vermeiden, wenn die Luftströmung durch das Expositionssystem nicht ausreicht, um eine dynamische Strömung der Prüfsubstanzatmosphäre zu erreichen. Es gibt festgelegte Methoden, mit denen nachgewiesen werden kann, dass es unter den gewählten Bedingungen nicht zu erneutem Einatmen kommt (8) (15). Die Sauerstoffkonzentration sollte mindestens 19 % betragen, und die Kohlendioxidkonzentration sollte 1 % nicht überschreiten. Gibt es Grund zu der Annahme, dass diese Werte nicht eingehalten werden können, sind die Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen zu messen.

**Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit in der Inhalationskammer**

18. Die Temperatur in der Inhalationskammer sollte 22 ± 3 °C betragen. Sowohl bei der „Nose-only"- als auch bei der Ganzkörperexposition sollte die relative Luftfeuchtigkeit im Atembereich der Tiere mindestens dreimal für Zeiträume von bis zu 4 Stunden und für kürzere Zeiträume stündlich überwacht und dokumentiert werden. Die relative Luftfeuchtigkeit sollte im Idealfall zwischen 30 und 70 % liegen, was jedoch möglicherweise nicht erreichbar ist (z. B. bei der Prüfung von wasserbasierten Mischungen) oder wegen chemischer Interferenz mit der Prüfmethode nicht gemessen werden kann.

▼M4

**Prüfsubstanz: nominale Konzentration**

19. Die nominale Konzentration in der Expositionskammer sollte möglichst berechnet und protokolliert werden. Die nominale Konzentration ist die Masse der erzeugten Prüfsubstanz dividiert durch das Gesamtvolumen der durch das Kammersystem geleiteten Luft. Sie wird nicht zur Beschreibung der Exposition der Tiere verwendet; vielmehr gibt ein Vergleich der nominalen Konzentration und der tatsächlichen Konzentration Aufschluss über die Effizienz des Prüfsystems bei der Erzeugung der Prüfkonzentration, und kann daher für die Aufdeckung von Problemen bei dieser Erzeugung verwendet werden.

**Prüfsubstanz: tatsächliche Konzentration**

20. Die tatsächliche Konzentration ist die Konzentration der Prüfsubstanz im Atembereich der Tiere in einer Inhalationskammer. Die tatsächlichen Konzentrationen können entweder durch spezifische Methoden (z. B. direkte Probenahme, adsorptive Methoden oder chemische Reaktionsverfahren mit anschließender analytischer Charakterisierung) oder durch unspezifische Methoden wie Gravimetrie bestimmt werden. Die gravimetrische Methode ist lediglich für Aerosole mit nur einem Bestandteil in Pulverform oder Aerosole von Flüssigkeiten mit geringer Flüchtigkeit akzeptabel und sollte sich auf geeignete, vor der Studie zu erstellende und für die Prüfsubstanz spezifische Beschreibungen stützen. Die Konzentration von Aerosolen mit mehreren Bestandteilen in Pulverform kann ebenfalls gravimetrisch bestimmt werden. Hierzu muss jedoch mit Analysedaten belegt werden, dass die Schwebstoffe eine ähnliche Zusammensetzung haben wie das Ausgangsmaterial. Liegen diese Angaben nicht vor, muss die Prüfsubstanz (im Idealfall im Schwebezustand) möglicherweise im Verlauf der Studie in regelmäßigen Abständen neu analysiert werden. Bei aerosolisierten Agenzien, die verdunsten oder sublimieren können, sollte gezeigt werden, dass alle Phasen von der gewählten Methode erfasst wurden. Im Prüfbericht sollten die Zielkonzentration sowie die nominale und die tatsächliche Konzentration angegeben werden, aber nur die tatsächlichen Konzentrationen werden für statistische Analysen zur Berechnung letaler Konzentrationswerte verwendet.

21. Es sollte möglichst eine Partie der Prüfsubstanz verwendet werden; die Probe sollte unter Bedingungen aufbewahrt werden, die ihre Reinheit, Homogenität und Stabilität gewährleisten. Die Prüfsubstanz sollte vor Beginn der Studie mit Angaben zur Reinheit und, falls technisch machbar, zur Identität sowie zu Mengen identifizierter Schadstoffe und Verunreinigungen beschrieben werden. Hierzu können unter anderem die folgenden Daten verwendet werden: Retentionszeit und relative Peakfläche, durch Massenspektrometrie oder Gaschromatographie bestimmtes Molekulargewicht oder andere Werte. Das Prüflabor ist zwar nicht für die Identität der Probe verantwortlich, doch es kann ratsam sein, dass es die Beschreibung des Auftraggebers zumindest in gewissen Grenzen (z. B. Farbe, physikalische Beschaffenheit usw.) überprüft.

22. Die Expositionsatmosphäre ist so konstant wie möglich zu halten und je nach Analysemethode kontinuierlich und/oder intermittierend zu überwachen. Bei der intermittierenden Probenahme sollten in einer vierstündigen Studie mindestens zweimal Proben der Atmosphäre in der Kammer genommen werden. Ist dies wegen begrenzter Luftdurchflussraten oder niedriger Konzentrationen nicht möglich, kann während der gesamten Expositionszeit eine einzige Probe genommen werden. Weichen die einzelnen Proben stark voneinander ab, sollten bei den nächsten geprüften Konzentrationen vier Proben je Exposition gezogen werden. Die einzelnen Proben der Konzentration in der Kammer sollten bei Gasen und Dämpfen nicht mehr als ± 10 % und bei Flüssig- oder Feststoffaerosolen nicht mehr als ± 20 % von der mittleren Kammerkonzentration abweichen. Die Zeit bis zum Erreichen eines Gleichgewichts in der Kammer ($t_{95}$) ist zu berechnen und zu dokumentieren. Die Expositionsdauer erstreckt sich über den Zeitraum, in dem die Prüfsubstanz erzeugt wird; dazu gehört die zur Erreichung von $t_{95}$ erforderliche Zeit. GD 39 (8) enthält Hinweise zur Einschätzung von $t_{95}$.

▼M4

23. Bei sehr komplexen Mischungen aus Dämpfen/Gasen und Aerosolen (z. B. Verbrennungsatmosphären und Prüfsubstanzen, die aus hierzu bestimmten Endverbraucherprodukten/-geräten gesprüht werden) kann sich jede Phase in einer Inhalationskammer anders verhalten, so dass mindestens eine Indikatorsubstanz (Analyt), normalerweise der wichtigste Wirkstoff in der Mischung, von jeder Phase (Dampf/Gas und Aerosol) ausgewählt werden sollte. Wenn die Prüfsubstanz eine Mischung ist, sollte die Analysekonzentration für die gesamte Mischung und nicht nur für den Wirkstoff oder den Bestandteil (Analyt) dokumentiert werden. Weitere Informationen zu tatsächlichen Konzentrationen sind im GD 39 (8) zu finden.

**Prüfsubstanz: Partikelgrößenverteilung**

24. Die Partikelgrößenverteilung von Aerosolen sollte während jeder 4-stündigen Exposition mindestens zweimal mit einem Kaskaden-Impaktor oder einem anderen Messgerät wie einem APS bestimmt werden. Kann nachgewiesen werden, dass die mit einem Kaskaden-Impaktor und einem alternativen Messgerät erzielten Ergebnisse gleichwertig sind, so kann das alternative Instrument während der gesamten Studie verwendet werden. Parallel zum Hauptinstrument ist ein zweites Gerät wie ein Gravimetriefilter oder eine Gaswaschflasche zu verwenden, um den Abscheidegrad des Hauptinstruments zu bestätigen. Die durch die Partikelgrößenanalyse bestimmte Massenkonzentration sollte innerhalb vertretbarer Grenzen um die durch die Filteranalyse bestimmte Massenkonzentration liegen [siehe DG 39 (8)]. Wenn die Gleichwertigkeit zu Beginn der Studie nachgewiesen werden kann, kann auf weitere bestätigende Messungen verzichtet werden. Aus Tierschutzgründen sollten Vorkehrungen getroffen werden, um unklare Daten zu minimieren, die dazu führen könnten, dass eine Exposition wiederholt werden muss. Wenn die Möglichkeit besteht, dass Dampfkondensation zur Bildung eines Aerosols führen kann, oder wenn in einer Dampfatmosphäre mit dem Potenzial für gemischte Phasen Partikel nachgewiesen werden, sollte eine Partikelgrößenbestimmung für Dämpfe vorgenommen werden (siehe Nummer 14).

VERFAHREN

**Hauptversuch**

25. Für jede Stufe werden drei Tiere je Geschlecht oder sechs Tiere des empfindlicheren Geschlechts verwendet. Wenn für eine „Nose-only"-Exposition andere Nagetierarten als Ratten verwendet werden, kann die maximale Expositionsdauer angepasst werden, um artenspezifisches Leiden zu minimieren. Die als Startdosis zu verwendende Konzentrationsstufe wird aus vier festen Dosiswerten gewählt; dabei sollte die Stufe gewählt werden, bei der die Wahrscheinlichkeit, dass sie bei einigen der behandelten Tiere Toxizität hervorruft, am größten ist. Die Prüfschemata für Gase, Dämpfe und Aerosole (Anlagen 2, 3 und 4) veranschaulichen die Prüfung mit den Berücksichtigungsgrenzwerten der GHS-Kategorien 1-4 (9) für Gase (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 Std.) (Anlage 2), für Dämpfe (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 Std.) (Anlage 3) und für Aerosole (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 Std.) (Anlage 4). Kategorie 5, die in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (9) nicht umgesetzt ist, bezieht sich auf Konzentrationen über den jeweiligen Grenzkonzentrationen. Für jede Startkonzentration gilt das entsprechende Prüfschema. Der Verlauf des Prüfverfahrens folgt je nach Anzahl der tierschutzgerecht getöteten oder gestorbenen Versuchstiere den angegebenen Pfeilen, bis eine Einstufung vorgenommen werden kann.

26. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Expositionsgruppen richtet sich nach dem Einsetzen, der Dauer und dem Schweregrad der toxischen Zeichen. Die Tiere sollten erst dann der nächsten Konzentrationsstufe ausgesetzt werden, wenn mit angemessener Gewissheit vom Überleben der zuvor getesteten Tiere ausgegangen werden kann. Es wird empfohlen, zwischen den Versuchen mit den einzelnen Konzentrationsstufen einen Abstand von drei bis vier Tagen einzuhalten, damit eine verzögerte Toxizität festgestellt werden kann. Dieser Zeitabstand kann nach Bedarf angepasst werden, wenn z. B. die beobachteten Reaktionen keine Schlussfolgerungen zulassen.

▼M4

**Limit-Test**

27. Der Limit-Test wird verwendet, wenn bekannt oder zu erwarten ist, dass die Prüfsubstanz praktisch nicht toxisch ist, d. h. nur über der regulatorisch festgelegten Grenzkonzentration eine toxische Wirkung hervorruft. Informationen über die Toxizität der Prüfsubstanz können aus Kenntnissen über ähnliche geprüfte Stoffe oder ähnliche Mischungen gewonnen werden, wobei Art und prozentualer Anteil der Komponenten zu berücksichtigen sind, deren toxikologische Relevanz bekannt ist. In den Fällen, in denen nur wenige oder keine Informationen über die Toxizität der Prüfsubstanz vorliegen oder in denen von einer Toxizität der Prüfsubstanz ausgegangen wird, sollte der Hauptversuch durchgeführt werden [weitere Hinweise sind GD 39 (8) zu entnehmen].

28. Bei der normalen Vorgehensweise werden je drei Tiere beider Geschlechter oder sechs Tiere des empfindlicheren Geschlechts Konzentrationen von 20 000 ppm im Fall von Gasen, 20 mg/l im Fall von Dämpfen und 5 mg/l im Fall von Stäuben/Nebel ausgesetzt. Wenn diese Konzentrationen erreicht werden, dienen sie als Limit-Test für diese Prüfmethode. Bei der Prüfung von Aerosolen sollte das Hauptziel darin bestehen, eine lungengängige Partikelgröße (d. h. ein MMAD von 1-4 μm) zu erreichen. Dies ist bei den meisten Prüfsubstanzen bei einer Konzentration von 2 mg/l der Fall. Aerosole sollten nur dann bei mehr als 2 mg/l geprüft werden, wenn eine lungengängige Partikelgröße erreicht werden kann [siehe GD 39 (8)]. In Übereinstimmung mit dem GHS (16) wird aus Tierschutzgründen von Prüfungen über einer Grenzkonzentration abgeraten. Prüfungen in der GHS-Kategorie 5 (16), die in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (9) nicht umgesetzt ist, sollten nur dann in Betracht gezogen werden, wenn es sehr wahrscheinlich ist, dass die Ergebnisse einer solchen Prüfung von unmittelbarer Relevanz für den Schutz der menschlichen Gesundheit sind. Im Studienbericht ist eine Begründung anzugeben. Bei potenziell explosiven Prüfsubstanzen ist darauf zu achten, dass keine explosionsfördernden Bedingungen geschaffen werden. Um eine unnötige Verwendung von Versuchstieren zu vermeiden und sicherzustellen, dass die Kammerbedingungen für einen Limit-Test erreicht werden können, sollte vor dem Limit-Test ein Probedurchlauf ohne Tiere vorgenommen werden.

BEOBACHTUNGEN

29. Die Tiere sollten während der Exposition häufig auf klinische Zeichen beobachtet werden. Nach der Exposition sollten klinische Beobachtungen mindestens zweimal am Tag der Exposition oder, falls es aufgrund der Reaktion der Tiere auf die Behandlung angezeigt erscheint, häufiger und danach für einen Zeitraum von insgesamt 14 Tagen mindestens einmal täglich vorgenommen werden. Die Länge des Beobachtungszeitraums ist nicht festgelegt; sie sollte nach Art und Zeitpunkt des Einsetzens klinischer Zeichen und der Länge der Erholungsphase bestimmt werden. Der Zeitpunkt, zu dem die Toxizitätszeichen auftreten und wieder abklingen, ist von Bedeutung, insbesondere dann, wenn Anzeichen für ein verzögertes Auftreten von Toxizitätszeichen erkennbar sind. Sämtliche Beobachtungen werden systematisch in Einzelprotokollen dokumentiert, die für jedes Tier geführt werden. Tiere, bei denen ein moribunder Zustand festgestellt wird, sowie Tiere, die starke Schmerzen haben oder anhaltende Anzeichen von schwerem Leiden zeigen, sollten aus Tierschutzgründen getötet werden. Bei den Untersuchungen auf klinische Toxizitätszeichen ist darauf zu achten, dass ein anfänglich schlechtes Aussehen und vorübergehende Atemveränderungen, die auf das Expositionsverfahren zurückzuführen sind, nicht mit behandlungsbedingten Wirkungen verwechselt werden. Die im Humane Endpoints Guidance Document (7) zusammengefassten Prinzipien und Kriterien sind zu berücksichtigen. Wenn Tiere aus Tierschutzgründen getötet werden oder ihr Tod festgestellt wird, sollte der Todeszeitpunkt so genau wie möglich registriert werden.

▼M4

30. Bei den Beobachtungen ist auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen und Schleimhäuten sowie Atmung, Kreislauf, autonomes und zentrales Nervensystem, Somatomotorik und Verhaltensmuster zu achten. Soweit möglich, ist auf Differenzierungen zwischen lokalen und systemischen Wirkungen zu achten. Besonderes Augenmerk ist auf Tremor, Konvulsionen, Salivation, Diarrhö, Lethargie, Schlaf und Koma zu richten. Die Messung der Rektaltemperatur kann zusätzliche Belege für mit der Behandlung oder Unterbringung zusammenhängende Reflex-Bradypnoe oder Hypo-/Hyperthermie liefern.

**Körpergewicht**

31. Das Körpergewicht der einzelnen Tiere sollte einmal während der Eingewöhnungszeit, am Tag der Exposition vor der Exposition (Tag 0) und mindestens an den Tagen 1, 3 und 7 (und danach wöchentlich) sowie zum Zeitpunkt des Todes oder der Tötung, falls später als Tag 1, dokumentiert werden. Das Körpergewicht gilt als kritischer Indikator für Toxizität; Tiere, die gegenüber ihrem Gewicht vor der Prüfung eine dauerhafte Abnahme um ≥ 20 % aufweisen, sollten sorgfältig überwacht werden. Die überlebenden Tiere werden gewogen und am Ende der Post-Expositionsphase auf tierschutzgerechte Weise getötet.

**Pathologie**

32. Alle Versuchstiere (einschließlich der Tiere, die während des Tests sterben oder aus Tierschutzgründen getötet und aus der Studie genommen werden) sind auf makroskopische Veränderungen zu untersuchen. Kann die Nekropsie nicht unmittelbar nach Auffinden eines toten Tieres erfolgen, sollte der Körper auf eine Temperatur gekühlt (nicht eingefroren) werden, die tief genug ist, um die Autolyse zu minimieren. Die Nekropsie ist baldmöglichst, in der Regel innerhalb von einem oder zwei Tagen durchzuführen. Alle makroskopischen Veränderungen sollten für jedes Tier protokolliert werden, wobei besonders auf Veränderungen der Atemwege zu achten ist.

33. Es kann in Betracht gezogen werden, von vorneherein zusätzliche Untersuchungen in die Studienauslegung aufzunehmen, die die Aussagekraft der Studie erhöhen, z. B. die Messung des Lungengewichts überlebender Ratten und/oder den Nachweis einer Reizwirkung durch mikroskopische Untersuchung der Atemwege. Untersucht werden können auch diejenigen Organe, die bei 24 Stunden oder länger überlebenden Tieren makroskopische Befunde aufweisen, sowie Organe, die bekanntermaßen oder vermutlich betroffen sind. Eine mikroskopische Untersuchung des gesamten Atemtrakts kann nützliche Informationen über Prüfsubstanzen liefern, die mit Wasser reagieren, z. B. Säuren und hygroskopische Prüfsubstanzen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Daten**

34. Das Körpergewicht der einzelnen Tiere und Sektionsbefunde sollten angegeben werden. Die Daten der klinischen Beobachtung sollten in tabellarischer Form zusammengefasst werden. Daraus müssen für jede Prüfgruppe die Anzahl der verwendeten Tiere, die Anzahl der Tiere mit spezifischen Toxizitätszeichen, die Anzahl der Tiere, die während der Prüfung tot aufgefunden oder vorzeitig getötet wurden, der Todeszeitpunkt der einzelnen Tiere, eine Beschreibung und der zeitliche Verlauf der toxischen Wirkungen und deren Reversibilität sowie die Sektionsbefunde ersichtlich sein.

▼M4

**Prüfbericht**

35. Der Prüfbericht sollte, soweit zutreffend, die folgenden Informationen enthalten:

*Versuchstiere und Tierhaltung*

— Beschreibung der Haltungsbedingungen mit Angaben zu Anzahl (oder Veränderung der Anzahl) der Tiere je Käfig, Einstreu, Umgebungstemperatur und relativer Luftfeuchtigkeit, Photoperiode und Futter,

— Art/Stamm und Begründung für die Verwendung einer anderen Art als der Ratte,

— Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere,

— Randomisierungsmethode,

— Angaben über Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Wasserquelle),

— Beschreibung etwaiger Vorbereitung vor der Prüfung, einschließlich Ernährung, Quarantäne und Behandlung von Krankheiten.

*Prüfsubstanz*

— physikalische Beschaffenheit, Reinheit und, wenn maßgeblich, physikalisch-chemische Eigenschaften (einschließlich Isomerisierung),

— Angaben zur Identifikation und CAS-Nummer (Chemical Abstract Services), falls bekannt.

*Vehikel*

— Begründung für die Verwendung eines Vehikels sowie für die Wahl des Vehikels (falls nicht Wasser),

— historische oder parallel erzeugte Daten, die belegen, dass das Vehikel keinen Einfluss auf das Ergebnis der Studie hat.

*Inhalationskammer*

— Beschreibung der Inhalationskammer mit Angabe von Abmessungen und Volumen,

— Herkunft und Beschreibung der für die Exposition der Tiere sowie für die Erzeugung der Atmosphäre verwendeten Ausrüstung,

— Ausrüstung für die Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Partikelgröße und tatsächlicher Konzentration,

— Herkunft der Luft, Behandlung der eingeleiteten/entzogenen Luft sowie Klimatisierungssystem,

— für die Kalibrierung der Ausrüstung verwendete Methoden, um eine homogene Prüfatmosphäre sicherzustellen,

— Druckunterschied (positiv oder negativ),

— Expositions-Öffnungen je Kammer („Nose-only"-Exposition); Anordnung der Tiere im System (Ganzkörper),

— zeitliche Homogenität/Stabilität der Prüfatmosphäre,

— Lage von Temperatur- und Feuchtigkeitssensoren und Ort der Probenahme der Prüfatmosphäre in der Kammer,

— Luftdurchflussraten, Luftdurchflussrate/Expositions-Öffnung („Nose-only"-Exposition) oder Anzahl der Tiere je Kammer (Ganzkörperexposition),

— Angaben zur Ausrüstung für die Messung des Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalts, falls zutreffend,

▼M4

— bis zum Erreichen des Gleichgewichts in der Inhalationskammer benötigte Zeit ($t_{95}$),

— Zahl der Volumenänderungen pro Stunde,

— Messgeräte (falls zutreffend).

*Expositionsdaten*

— Begründung für die Wahl der Zielkonzentration in der Hauptstudie,

— nominale Konzentrationen (Gesamtmasse der in die Inhalationskammer eingeleiteten Prüfsubstanz dividiert durch das Volumen der durch die Kammer geleiteten Luft),

— im Atembereich der Tiere ermittelte tatsächliche Konzentrationen der Prüfsubstanz; bei Prüfgemischen mit heterogenen physikalischen Formen (Gase, Dämpfe, Aerosole) kann jede Form getrennt analysiert werden,

— alle Luftkonzentrationen sollten in Masseneinheiten angegeben werden (z. B. mg/l, $mg/m^3$ usw.), Volumeneinheiten können in Klammern ebenfalls angegeben werden (z. B. ppm, ppb),

— Partikelgrößenverteilung, mittlerer aerodynamischer Massendurchmesser (MMAD) und geometrische Standardabweichung (σg), einschließlich der Berechnungsmethoden. Einzelne Partikelgrößenanalysen sind zu protokollieren.

*Prüfbedingungen*

— Angaben zur Vorbereitung der Prüfsubstanz, einschließlich Angaben zu den Verfahren zur Reduzierung der Partikelgröße von Feststoffen oder zur Herstellung von Lösungen der Prüfsubstanz. Wenn die Zusammensetzung der Prüfsubstanz durch mechanische Prozesse verändert worden sein kann, sind die Ergebnisse der Analysen zur Überprüfung der Zusammensetzung der Prüfsubstanz beizufügen.

— Eine Beschreibung (möglichst mit Diagramm) der Ausrüstung, die zur Erzeugung der Prüfatmosphäre und zur Exposition der Tiere gegen die Prüfatmosphäre verwendet wurde.

— Angaben zur verwendeten chemischen Analysemethode und zur Validierung der Methode (einschließlich der Effizienz der Wiederfindung der Prüfsubstanz im Medium).

— Begründung für die Wahl der Prüfkonzentrationen.

*Ergebnisse*

— tabellarische Darstellung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftstrom in der Kammer,

— tabellarische Darstellung von Daten zur nominalen und tatsächlichen Konzentration in der Kammer,

— tabellarische Darstellung der Partikelgrößendaten einschließlich Daten zur analytischen Probenahme, Partikelgrößenverteilung und Berechnung des MMAD und der $\sigma_g$,

— tabellarische Erfassung der erhobenen Daten und der Konzentration für jedes einzelne Tier (d. h. Tiere, die Anzeichen für Toxizität zeigen, einschließlich Mortalität sowie Art, Schweregrad und Dauer der Wirkungen),

— Körpergewicht der einzelnen Tiere, erfasst an Prüfungstagen, Datum und Zeitpunkt des Todes, falls vor geplanter Tötung, zeitlicher Verlauf des Einsetzens von Toxizitätsanzeichen sowie Angabe, ob diese reversibel waren, für jedes einzelne Tier,

▼M4

— Sektionsbefunde und histopathologische Ergebnisse für jedes einzelne Tier, falls vorhanden,

— GHS-Kategorieeinstufung und $LC_{50}$-Berücksichtigungsgrenzwert.

*Diskussion und Auswertung der Ergebnisse*

— Besondere Aufmerksamkeit sollte der Beschreibung der Methoden gelten, die verwendet wurden, um die Kriterien dieser Prüfmethode zu erfüllen, z. B. die Grenzkonzentration oder die Partikelgröße.

— Die Lungengängigkeit von Partikeln vor dem Hintergrund der Gesamtbefunde sollte behandelt werden, insbesondere, wenn die Partikelgrößenkriterien nicht erfüllt werden konnten.

— Die Kohärenz der Methoden zur Bestimmung der nominalen und der tatsächlichen Konzentration sowie die Beziehung der tatsächlichen Konzentration zur nominalen Konzentration sind in die Gesamtbewertung der Studie aufzunehmen.

— Die wahrscheinliche Todesursache und die vorherrschende Wirkungsweise (systemisch oder lokal) sollten behandelt werden.

— Falls Tiere, die unter Schmerzen litten oder Zeichen für schweres und anhaltendes Leiden aufwiesen, auf tierschutzgerechte Weise getötet werden mussten, ist eine Erklärung auf der Grundlage der Kriterien im OECD Guidance Document on Humane Endpoints (7) zu geben.

*LITERATUR:*

1. Kapitel B.2 dieses Anhangs, Akute Inhalationstoxizität.

2. Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.

3. Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

4. Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to $LD/LC_{50}$ Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

5. Kapitel B.1.tris dieses Anhangs, Akute orale Toxizität — Akut toxische Klassenmethode.

6. OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

7. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

9. Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (ABl. L 353 vom 31.12.2008, S. 1).

▼**M4**

10. Kapitel B.40 dieses Anhangs, *In-vitro*-Prüfung auf hautätzende Wirkung: TER-Test (transcutaneous electrical resistance test).

11. Kapitel B.40.bis dieses Anhangs, *In-vitro*-Prüfung auf hautätzende Wirkung: Test mit menschlichem Hautmodell.

12. OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Abrufbar unter: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

13. Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

14. SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.

15. Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

16. UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Abrufbar unter: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

*Anlage 1*

DEFINITION

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

▼M4

*Anlage 2*

**Verfahrensweise für jede Startkonzentration von Gasen (ppm/4 Std.)**

Allgemeine Hinweise [1]

Die Prüfschemata in dieser Anlage geben für jede Startkonzentration die jeweils zu beachtende Vorgehensweise an.

Anlage 2a: Startkonzentration 100 ppm

Anlage 2b: Startkonzentration 500 ppm

Anlage 2c: Startkonzentration 2 500 ppm

Anlage 2d: Startkonzentration 20 000 ppm

Der Testverlauf folgt je nach Anzahl der tierschutzgerecht getöteten oder gestorbenen Versuchstiere den angegebenen Pfeilen.

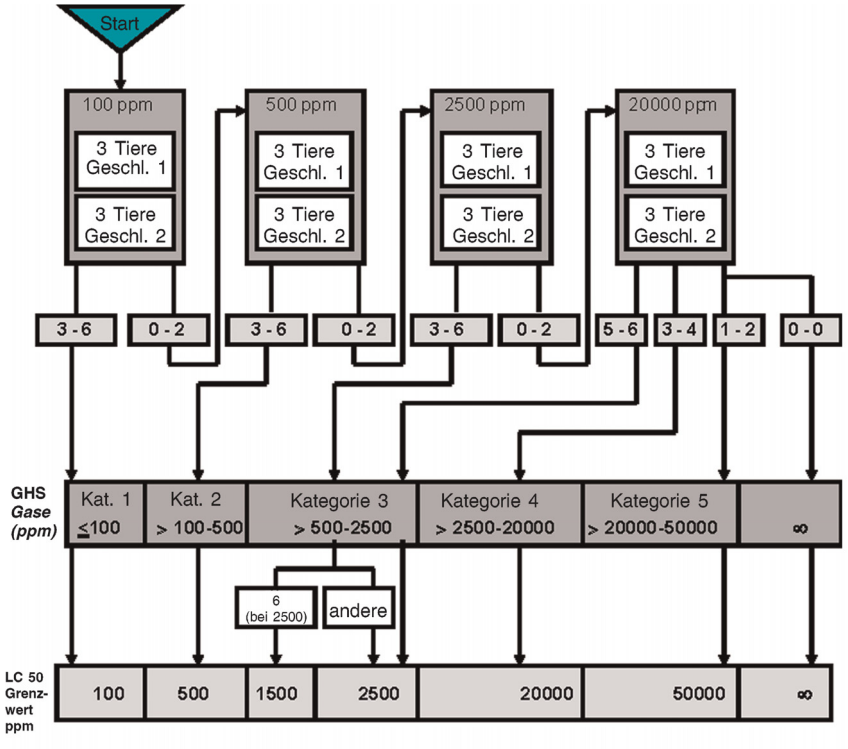
[1] In den folgenden Tabellen wird auf das GHS (Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien verwiesen. Die entsprechende Rechtsvorschrift in der EU ist die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008. Im Fall der akuten Inhalationstoxizität wird die Kategorie 5 in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (9) nicht umgesetzt.

▼M4

*Anlage 2a*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit einer Ausgangskonzentration von 100 ppm/4 Std. für Gase**




— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe

— 0-6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration

— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

— ∞: nicht eingestuft

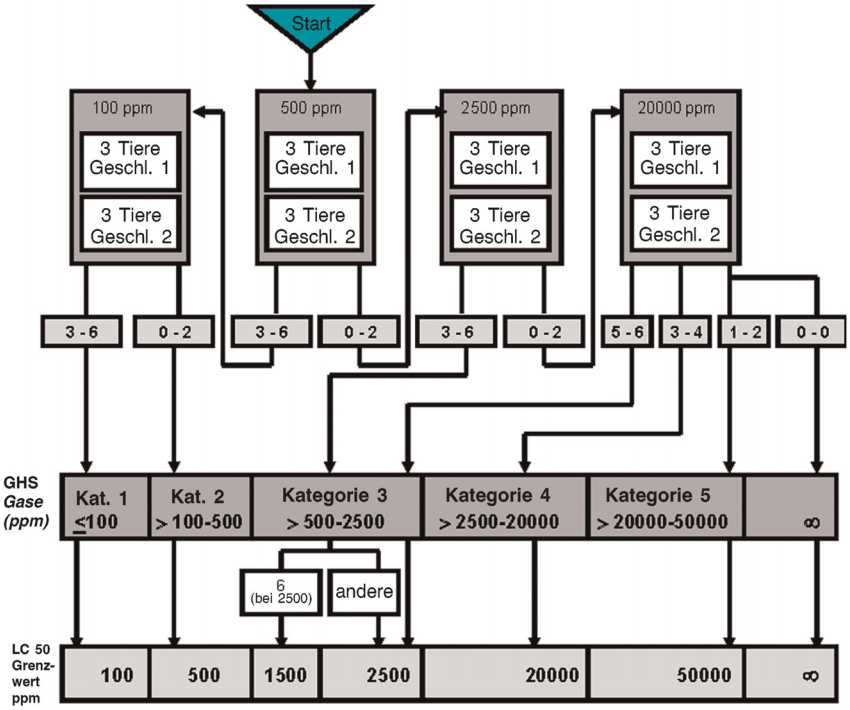
— Prüfung bei ≥ 20000 ppm/4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Anlage 2b*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit einer Ausgangskonzentration von 500 ppm/4 Std. für Gase**




— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe

— 0-6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration

— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

— ∞: nicht eingestuft

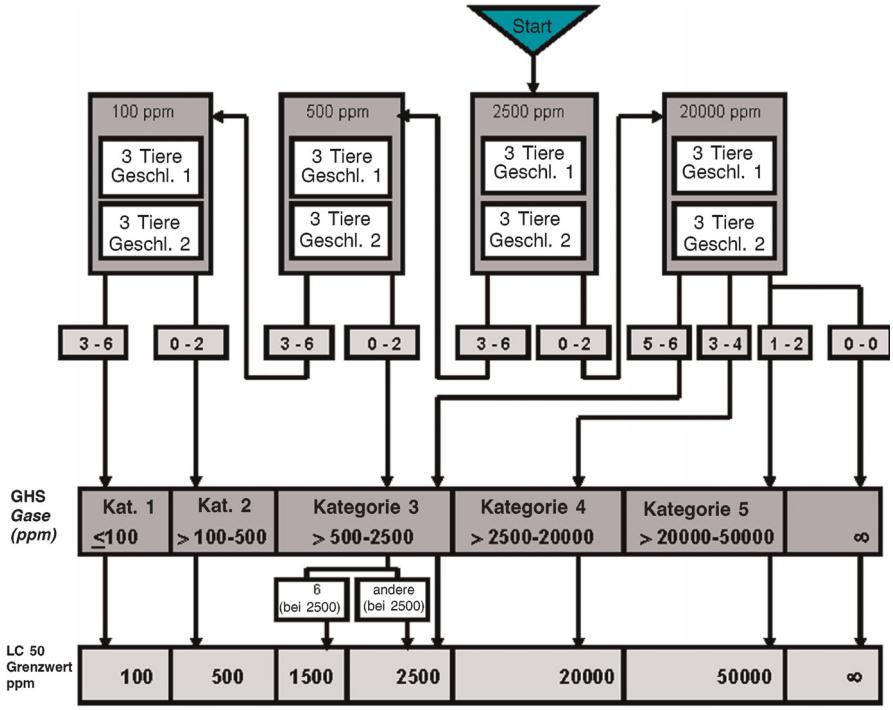
— Prüfung bei ≥ 20000 ppm/4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Anlage 2c*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit einer Ausgangskonzentration von 2 500 ppm/4 Std. für Gase**




— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe

— 0–6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration

— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

— ∞: nicht eingestuft

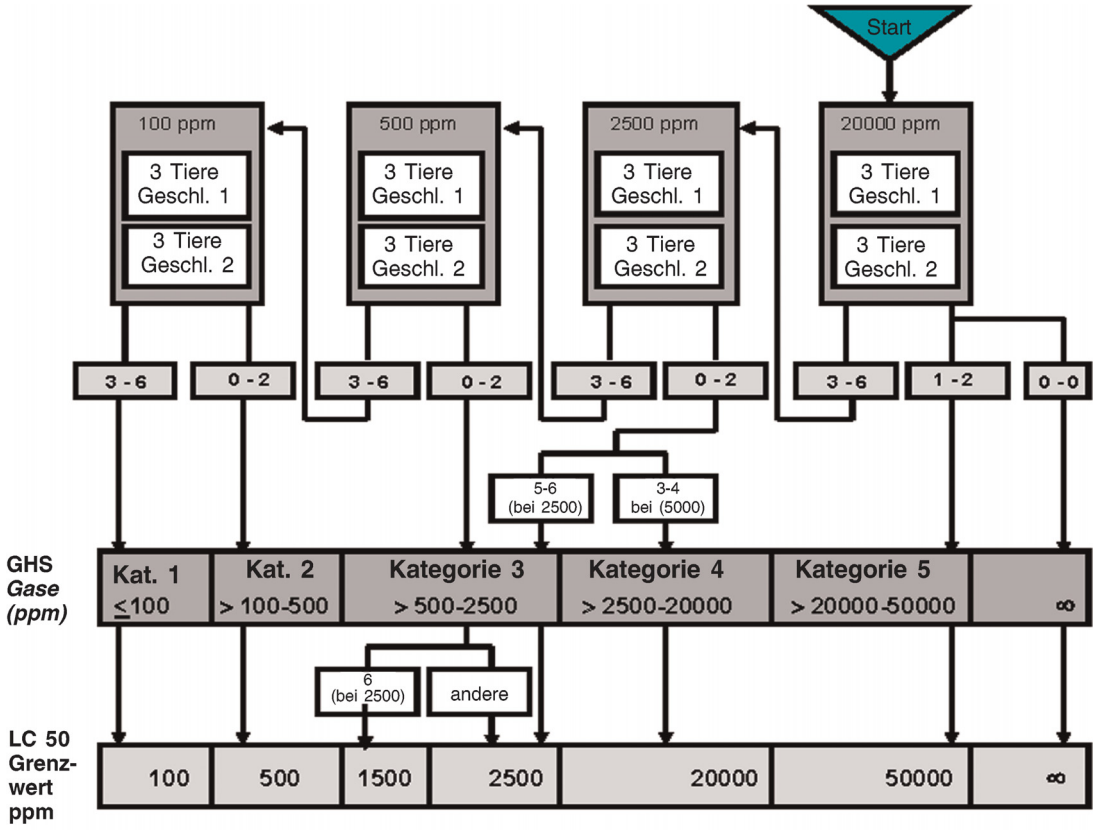
— Prüfung bei ≥ 20000 ppm/4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Anlage 2d*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit einer Ausgangskonzentration von 20 000 ppm/4 Std. für Gase**




— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe

— 0-6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration

— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

— ∞: nicht eingestuft

— Prüfung bei ≥ 20000 ppm/4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Anlage 3*

**Verfahrensweise für jede Startkonzentration von Dämpfen (mg/l/4 Std.)**

Allgemeine Hinweise ([1])

Die Prüfschemata in dieser Anlage geben für jede Startkonzentration die jeweils zu beachtende Vorgehensweise an.

Anlage 3a: Startkonzentration 0,5 mg/l

Anlage 3b: Startkonzentration 2,0 mg/l

Anlage 3c: Startkonzentration 10 mg/l

Anlage 3d: Startkonzentration 20 mg/l

Der Testverlauf folgt je nach Anzahl der tierschutzgerecht getöteten oder gestorbenen Versuchstiere den angegebenen Pfeilen.

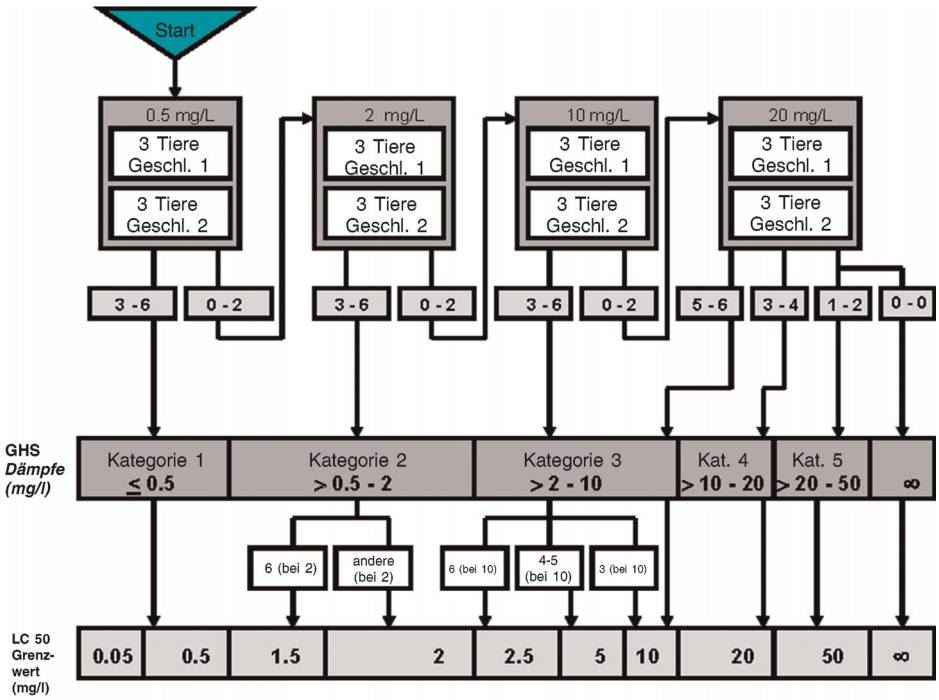
([1]) In den folgenden Tabellen wird auf das GHS (Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien verwiesen. Die entsprechende Rechtsvorschrift in der EU ist die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008. Im Fall der akuten Inhalationstoxizität wird die Kategorie 5 in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (9) nicht umgesetzt.

▼M4

*Anlage 3a*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit einer Ausgangskonzentration von 0,5 mg/l/4 Std. für Dämpfe**




— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe

— 0-6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration

— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

— ∞: nicht eingestuft

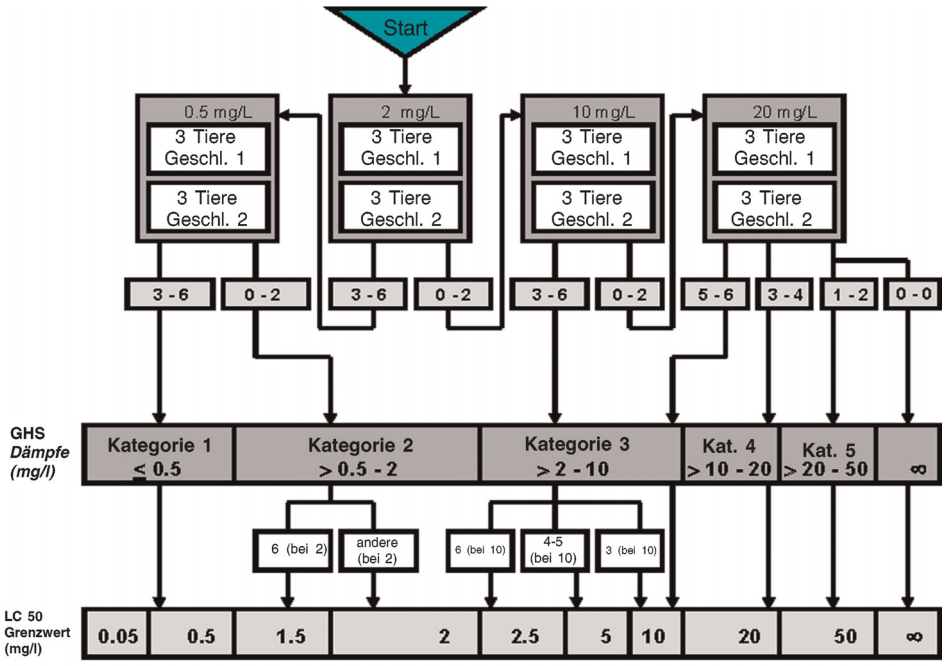
— Prüfung bei 50 mg/L/4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Anhang 3b*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit einer Ausgangskonzentration von 2 mg/l/4 Std. für Dämpfe**




— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe

— 0–6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration

— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

— ∞: nicht eingestuft

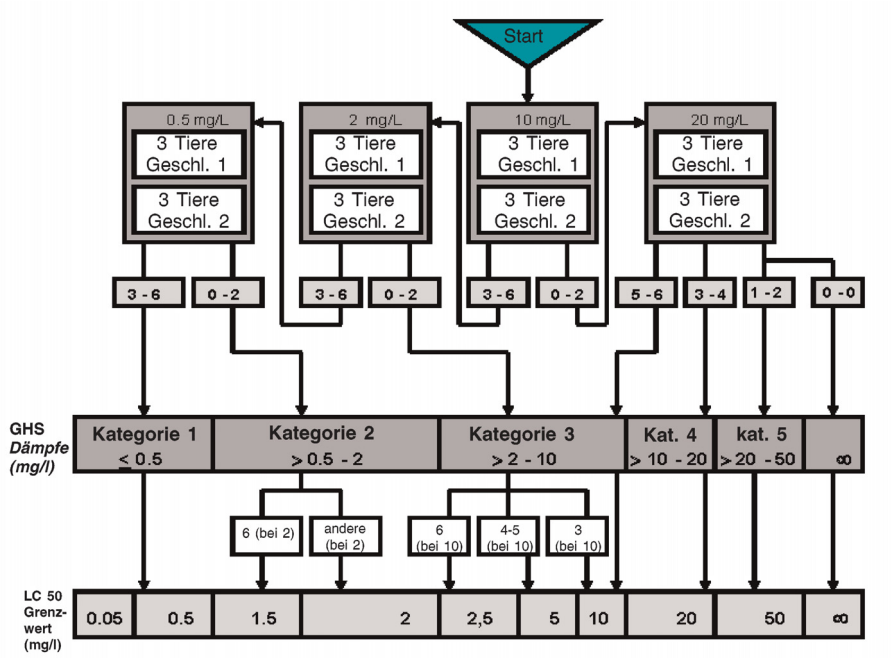
— Prüfung bei 50 mg/L/4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Anlage 3c*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit e iner Ausgangskonzentration von 10 mg/l/4 Std. für Dämpfe**




— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe

— 0–6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration

— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

— ∞: nicht eingestuft

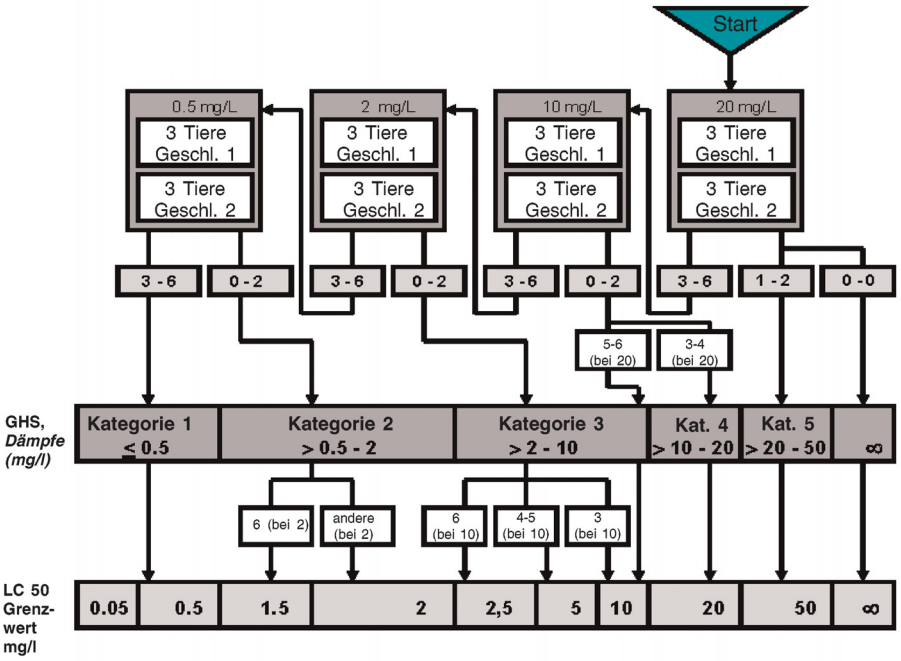
— Prüfung bei 50 mg/L/4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Anlage 3d*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit einer Ausgangskonzentration von 20 mg/l/4 Std. für Dämpfe**




— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe

— 0-6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration

— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

— ∞: nicht eingestuft

— Prüfung bei 50 mg/L4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Anlage 4*

**Verfahrensweise für jede Startkonzentration von Aerosolen (mg/l/4 Std.)**

Allgemeine Hinweise ([1])

Die Prüfschemata in dieser Anlage geben für jede Startkonzentration die jeweils zu beachtende Vorgehensweise an.

Anlage 4a: Startkonzentration 0,05 mg/l

Anlage 4b: Startkonzentration 0,5 mg/l

Anlage 4c: Startkonzentration 1 mg/l

Anlage 4d: Startkonzentration 5 mg/l

Der Testverlauf folgt je nach Anzahl der tierschutzgerecht getöteten oder gestorbenen Versuchstiere den angegebenen Pfeilen.

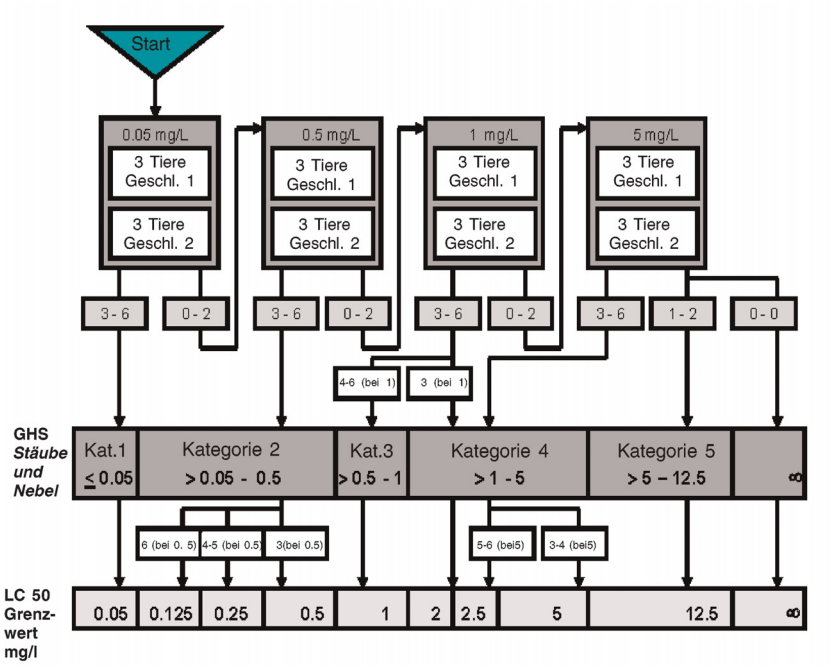
([1]) In den folgenden Tabellen wird auf das GHS (Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien verwiesen. Die entsprechende Rechtsvorschrift in der EU ist die Verordnung (EG) Nr. 1272/2008. Im Fall der akuten Inhalationstoxizität wird die Kategorie 5 in der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (9) nicht umgesetzt.

▼M4

*Anlage 4a*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit einer Ausgangskonzentration von 0.05 mg/l/4 Std. für Dämpfe**




— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe

— 0-6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration

— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

— ∞: nicht eingestuft

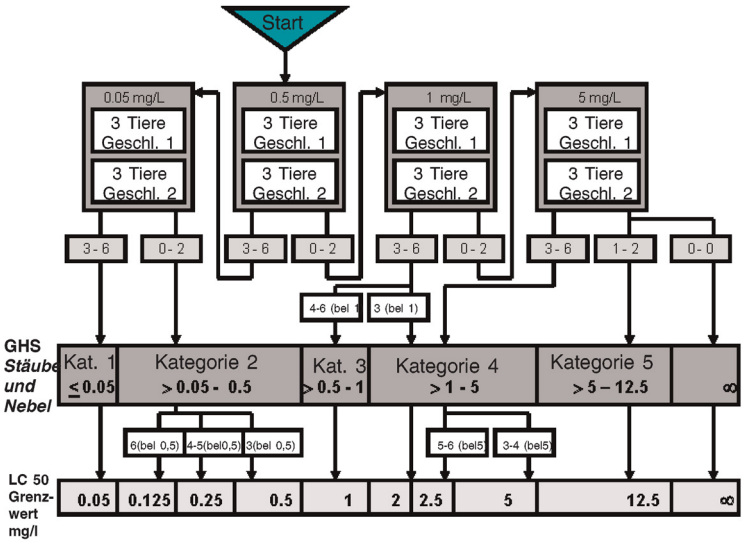
— Prüfung bei 12,5 mg/L/4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Anlage 4b*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit einer Ausgangskonzentration von 0,5 mg/l/4Std. für Aerosole**




— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe

— 0-6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration

— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

— ∞: nicht eingestuft

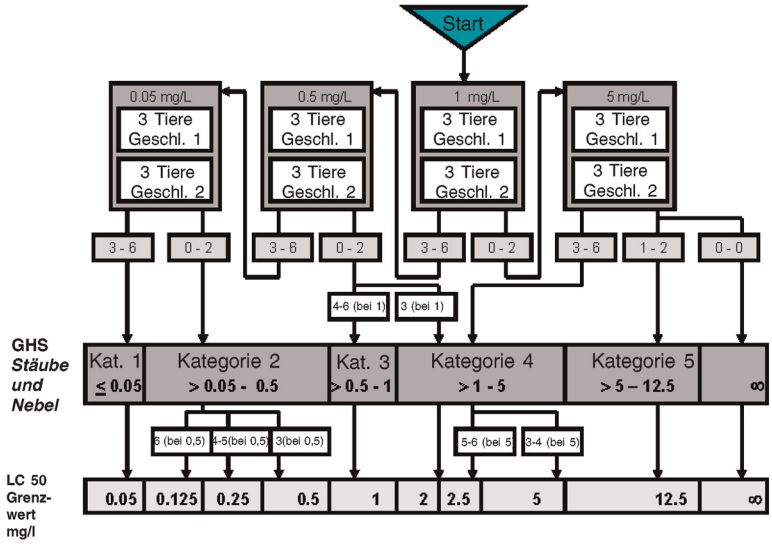
— Prüfung bei 12,5 mg/L/4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Anlage 4c*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit einer Ausgangskonzentration von 1 mg/l/4 Std. für Aerosole**



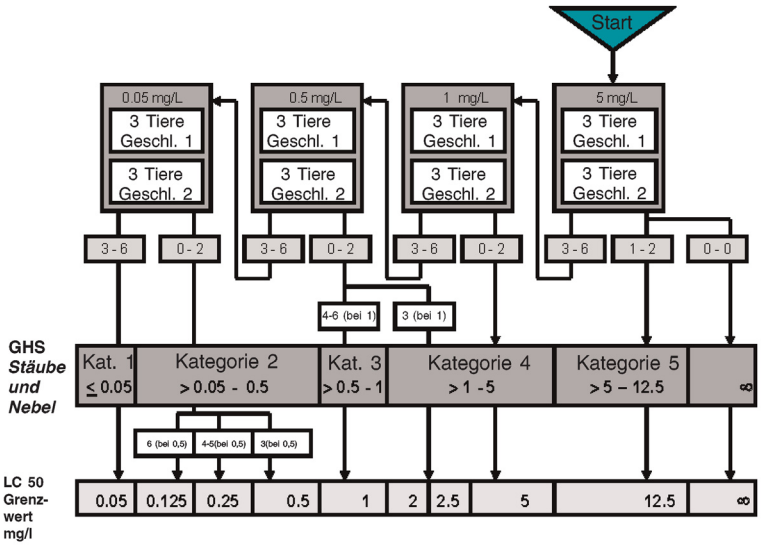

— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe
— 0-6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration
— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
— ∞: nicht eingestuft
— Prüfung bei 12,5 mg/l/4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Anlage 4d*

**Akute Inhalationstoxizität:**

**Prüfverfahren mit einer Ausgangskonzentration von 5 mg/l/4 Std. für Aerosole**




— 3 ♂ + 3 ♀ oder 6 Tiere des empfindlicheren Geschlechts je Stufe
— 0-6: Anzahl moribunde oder tote Tiere/geprüfte Konzentration
— GHS: Global Harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
— ∞: nicht eingestuft
— Prüfung bei 12,5 mg/l/4 Std.: siehe Guidance Document 39 (8)“

▼B

## TEIL C: METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER ÖKOTOXIZITÄT

INHALTSVERZEICHNIS


| | |
|---|---|
| C.1. | AKUTE TOXIZITÄT FÜR FISCHE |
| C.2. | *DAPHNIA*-SP.-TEST AUF AKUTE SCHWIMMUNFÄHIGKEIT |
| C.3. | SÜSSWASSERALGEN UND CYANOBAKTERIEN: WACHSTUMSINHIBITIONSTEST |
| C.4. | BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — BESTIMMUNG DER „LEICHTEN“ BIOLOGISCHEN ABBAUBARKEIT |
| TEIL I. | ALLGEMEINES |
| TEIL II. | DOC-DIE-AWAY–TEST — ABNAHME VON GELÖSTEM ORGANISCHEM KOHLENSTOFF (DOC) (Methode C.4-A) |
| TEIL III. | MODIFIZIERTER OECD-SCREENING-TEST (Methode C.4-B) |
| TEIL IV. | $CO_2$-ENTWICKLUNGSTEST (Methode C.4-C) |
| TEIL V. | MANOMETRISCHER RESPIRATIONSTEST (Methode C.4-D) |
| TEIL VI. | GESCHLOSSENER FLASCHENTEST (Methode C.4-E) |
| TEIL VII. | MITI-TEST (Methode C.4-F) |
| C.5. | ABBAUBARKEIT — BIOCHEMISCHER SAUERSTOFFBEDARF |
| C.6. | ABBAUBARKEIT — CHEMISCHER SAUERSTOFFBEDARF |
| C.7. | ABBAUBARKEIT — ABIOTISCHER ABBAU: HYDROLYSE IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT |
| C.8. | TOXIZITÄT FÜR REGENWÜRMER |
| C.9. | BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — ZAHN-WELLENS-TEST |
| C.10. | SIMULATION DER AEROBEN ABWASSERBEHANDLUNG: C.10-A: BELEBTSCHLAMM — C.10-B: BIOFILME |
| C.11. | BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — BELEBTSCHLAMM: PRÜFUNG DER ATMUNGSHEMMUNG |
| C.12. | BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — MODIFIZIERTER SCAS-TEST |
| C.13. | BIOKONZENTRATION: DURCHFLUSS-FISCHTEST |
| C.14. | WACHSTUMSTEST AN JUNGFISCHEN |
| C.15. | FISCHE, KURZFRISTIGE TOXIZITÄTSPRÜFUNG AN EMBRYONEN UND JUNGFISCHEN MIT DOTTERSACK |
| C.16. | HONIGBIENEN — AKUTE ORALE TOXIZITÄTSPRÜFUNG |
| C.17. | HONIGBIENEN — AKUTE KONTAKTTOXIZITÄTSPRÜFUNG |
| C.18. | ADSORPTION/DESORPTION NACH EINER SCHÜTTELMETHODE |

▼**B**

C.19. SCHÄTZUNG DES ADSORPTIONSKOEFFIZIENTEN ($K_{oc}$) IM BODEN UND IN KLÄRSCHLAMM MITTELS DER HOCHDRUCK- FLÜSSIGCHROMATOGRAFIE (HPLC)

C.20. *DAPHNIA-MAGNA*-REPRODUKTIONSTEST

C.21. BODENMIKROORGANISMEN: STICKSTOFFTRANSFORMATIONSTEST

C.22. BODENMIKROORGANISMEN: KOHLENSTOFFTRANSFORMATIONSTEST

C.23. AEROBE UND ANAEROBE TRANSFORMATION IM BODEN

C.24. AEROBE UND ANAEROBE TRANSFORMATION IN WASSER-SEDIMENT-SYSTEMEN

C.25. AEROBE MINERALISATION IN OBERFLÄCHENWASSER — SIMULATIONSTEST ZUR BIOLOGISCHEN ABBAUBARKEIT

C.26. *LEMNA* SP. — WACHSTUMSINHIBITIONSTEST

▼**M4**

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

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

C.29. LEICHTE BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — BESTIMMUNG VON $CO_2$ IN GESCHLOSSENEN FLASCHEN (HEADSPACE-TEST)

C.30. BIOAKKUMULATION IN TERRESTRISCHEN OLIGOCHAETEN

▼B

## C.1. AKUTE TOXIZITÄT FÜR FISCHE

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Mit diesem Test soll die akute letale Toxizität einer Substanz für Fische in Süßwasser bestimmt werden. So weit wie möglich sollten Angaben über die Wasserlöslichkeit, den Dampfdruck, die chemische Stabilität, die Dissoziationskonstanten und die biologische Abbaubarkeit der Substanz vorhanden sein, um die Auswahl der am besten geeigneten Prüfmethode (statisch, semistatisch oder im Durchfluss) zur Sicherstellung ausreichend konstanter Konzentrationen der Prüfsubstanz während des gesamten Prüfzeitraums zu erleichtern.

Weitere Angaben (z. B. Strukturformel, Reinheitsgrad, Art und Prozentanteil signifikanter Verunreinigungen, Vorhandensein und Menge von Zusätzen, sowie der n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient) sind sowohl bei der Planung der Prüfung als auch bei der Interpretation der Prüfergebnisse zu berücksichtigen.

#### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Unter akuter Toxizität wird die deutlich erkennbare schädigende Wirkung verstanden, die in einem Organismus innerhalb kurzer Zeit (Tage) durch Einwirkung (Exposition) eines Stoffes hervorgerufen wird. In der vorliegenden Prüfung wird die akute Toxizität als die mittlere letale Konzentration ($LC_{50}$) ausgedrückt; das ist die Konzentration im Wasser, die 50 % einer Prüfgruppe von Fischen innerhalb einer anzugebenden ununterbrochenen Einwirkungsdauer tötet.

Alle Konzentrationen der Prüfsubstanz sind in Gewicht/Volumen (mg/l) anzugeben. Sie können auch als Gewichtsanteile (mg/kg) angegeben werden.

#### 1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Eine Referenzsubstanz kann geprüft werden, um nachzuweisen, dass sich die Reaktion des Prüfsystems unter den Bedingungen der Prüfeinrichtung nicht wesentlich geändert hat.

Referenzsubstanzen sind für diesen Test noch nicht festgelegt.

#### 1.4. PRINZIP DER METHODE

Es kann ein Limit-Test mit 100 $mg.l^{-1}$ durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass die $LC_{50}$ über dieser Konzentration liegt.

Die Fische werden der dem Wasser zugesetzten Prüfsubstanz für einen Zeitraum von 96 Stunden verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt. Die Mortalitäten werden mindestens alle 24 Stunden erfasst; soweit möglich, werden bei jeder Beobachtung auch die Konzentrationen berechnet, die 50 % der Fische töten ($LC_{50}$).

#### 1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Die Qualitätskriterien gelten für den Limit-Test wie auch für das vollständige Prüfverfahren.

Die Mortalität darf bei den Kontroll-Prüfsystemen am Ende der Prüfung 10 % (bzw. einen Fisch, wenn weniger als 10 verwendet werden) nicht überschreiten.

Die Sauerstoffkonzentration muss über die gesamte Prüfdauer mehr als 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen:

▼B

Die Konzentrationen der Prüfsubstanz sollen über den gesamten Prüfzeitraum bei bis zu 80 % der Anfangskonzentrationen gehalten werden.

Bei Substanzen, die im Prüfmedium leicht löslich sind und stabile Lösungen ergeben, d. h. Lösungen, die sich nicht in signifikantem Maße verflüchtigen oder nicht in einem solchen Maße abgebaut, hydrolisiert oder adsorbiert werden, kann die Anfangskonzentration als der nominalen Konzentration gleichwertig angesehen werden. Es ist nachzuweisen, dass die Konzentrationen über den gesamten Prüfzeitraum aufrechterhalten und die Qualitätskriterien erfüllt worden sind.

Bei Substanzen, die

i) im Prüfmedium schwer löslich sind oder

ii) stabile Emulsionen oder Dispersionen bilden können oder

iii) in wässrigen Lösungen nicht stabil sind,

soll die Anfangskonzentration diejenige Konzentration sein, die bei Prüfbeginn in der Lösung (oder, wenn dies aus technischen Gründen nicht möglich ist, in der Wassersäule) gemessen worden ist. Die Konzentration soll nach einer Zeit der Äquilibrierung, jedoch vor Einbringen der Prüforganismen, bestimmt werden.

In all diesen Fällen müssen weitere Messungen im Verlauf der Prüfung durchgeführt werden, um zu bestätigen, dass die Expositionskonzentrationen tatsächlich erreicht und die Qualitätskriterien erfüllt worden sind.

Der pH-Wert darf nicht um mehr als eine Einheit schwanken.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

Für die Durchführung der Prüfung aufgrund der vorliegenden Methode sind drei Verfahren möglich:

*Statisches Verfahren*

Toxizitätsprüfung, wobei das Prüfmedium während der Prüfdauer nicht erneuert wird.

*Semistatisches Verfahren*

Das Prüfmedium wird regelmäßig nach einem längeren Zeitraum (z. B. 24 Stunden) vollständig ausgewechselt.

*Durchflussverfahren*

Das Prüfmedium wird ständig erneuert, wobei die Prüfsubstanz mit dem Wasser für die Erneuerung des Prüfmediums eingebracht wird.

1.6.1. **Reagenzien**

1.6.1.1. *Lösungen der Prüfsubstanzen*

Die Stammansätze in den erforderlichen Konzentrationen werden durch Lösung der Prüfsubstanz in deionisiertem Wasser oder Wasser entsprechend 1.6.1.2 hergestellt.

Die gewählten Prüfkonzentrationen werden durch Verdünnung des Stammansatzes zubereitet. Bei hohen Konzentrationen kann die Prüfsubstanz unmittelbar im Verdünnungswasser gelöst werden.

▼B

Die Substanzen sollen im Allgemeinen nur bis zur Löslichkeitsgrenze geprüft werden. Bei einigen Substanzen (z. B. bei solchen mit geringer Wasserlöslichkeit oder hohem $P_{ow}$ oder solchen, die im Wasser eher eine stabile Dispersion als eine echte Lösung bilden), kann es angezeigt sein, eine Prüfkonzentration zu verwenden, die oberhalb der Löslichkeitsgrenze der Substanz liegt, um sicherzustellen, dass die höchste lösliche/stabile Konzentration erreicht worden ist. Wichtig ist jedoch, dass diese Konzentration das Prüfsystem nicht auf sonstige Weise stört (z. B. durch Bildung eines Substanzfilms auf der Wasseroberfläche, durch den die Anreicherung des Wassers mit Sauerstoff verhindert wird).

Durch Ultraschalldispersion, Verwendung organischer Lösungsmittel und emulgierender oder dispergierender Mittel können Stammansätze von Prüfsubstanzen mit geringer Wasserlöslichkeit hergestellt oder deren Dispersion im Prüfmedium gefördert werden. Werden derartige Hilfsstoffe verwendet, müssen alle Prüfkonzentrationen die gleiche Menge des Hilfsstoffes enthalten, und zusätzliche Kontroll-Fische müssen derselben Konzentration an Hilfsstoffen ausgesetzt werden, wie sie in der Prüfreihe verwendet wurde. Die Konzentration derartiger Hilfsstoffe sollte niedrig gehalten werden, in keinem Fall jedoch 100 $mg.l^{-1}$ im Prüfmedium überschreiten.

Die Prüfung ist ohne eine Einstellung des pH-Wertes durchzuführen. Gibt es Anzeichen für eine deutliche Änderung des pH-Wertes, wird empfohlen, die Prüfung mit einer pH-Wert-Einstellung zu wiederholen und die Ergebnisse entsprechend zu protokollieren. In diesem Fall ist der pH-Wert des Stammansatzes auf den pH-Wert des Verdünnungswassers einzustellen, falls nicht bestimmte Gründe dagegen sprechen. Hierzu sind möglichst HCl und NaOH zu verwenden. Die pH-Wert-Einstellung muss so erfolgen, dass sich die Konzentration der Prüfsubstanz im Stammansatz nicht wesentlich ändert. Sollte sich durch die Einstellung eine chemische Reaktion oder eine physikalische Ausfüllung der Prüfsubstanz ergeben, so muss diese Beobachtung im Prüfbericht protokolliert werden.

1.6.1.2. *Hälterungs- und Verdünnungswasser*

Verwendet werden kann Leitungswasser (Trinkwasser) (nicht verunreinigt durch potenziell schädliche Konzentrationen an Chlor, Schwermetallen oder anderen Substanzen), einwandfreies natürliches Wasser oder zubereitetes Wasser (siehe Anlage 1). Am besten geeignet sind Wasserqualitäten mit einer Gesamthärte zwischen 10 und 250 $mg.l^{-1}$ (bezogen auf $CaCO_3$) und einem pH-Wert zwischen 6,0 und 8,5.

1.6.2. **Geräte**

Alle Geräte müssen aus chemisch inertem Material bestehen:

— Einrichtungen zur automatischen Verdünnung (für das Durchfluss-Verfahren),

— Sauerstoffmessgerät,

— Gerät zur Bestimmung der Wasserhärte,

— geeignetes Gerät zur Temperaturmessung,

— pH-Messgerät.

1.6.3. **Prüforganismen**

Die Fische müssen in guter gesundheitlicher Verfassung sein und dürfen keine offensichtlichen Missbildungen aufweisen.

▼B

Es wird empfohlen, die verwendeten Arten nach so wichtigen praktischen Kriterien wie ihrer Verfügbarkeit im ganzen Jahr, ihrer problemlosen Hälterung, ihrer Eignung für Prüfzwecke, ihrer relativen Empfindlichkeit gegenüber Chemikalien sowie anderen ökonomisch, biologisch oder ökologisch bedeutsamen Faktoren auszuwählen. Außerdem sollten bei der Auswahl der Fischarten die Notwendigkeit der Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten und die bestehende internationale Harmonisierung (vgl. (1)) berücksichtigt werden.

Eine Liste der für die Prüfung empfohlenen Fischarten ist in Anlage 2 enthalten; bevorzugt verwendet werden Zebrabärblinge und Regenbogenforelle.

1.6.3.1. *Hälterung*

Die Fische sollten möglichst aus einer einzigen Charge bei etwa gleicher Länge und gleichem Alter stammen. Sie müssen mindestens 12 Tage unter folgenden Bedingungen gehältert werden:

*Besatz*

Entsprechend dem Verfahren (Umwälzanlage oder Durchfluss) und der Fischart.

*Wasser*

Siehe 1.6.1.2.

*Beleuchtung*

12 bis 16 Stunden Beleuchtungsdauer täglich.

*Konzentration an gelöstem Sauerstoff*

Mindestens 80 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts.

*Fütterung*

Dreimal wöchentlich oder täglich, Aussetzung der Fütterung 24 Stunden vor Beginn der Fütterung.

1.6.3.2. *Mortalität*

Nach einer Eingewöhnungszeit von 48 Stunden wird die Mortalität unter Anwendung folgender Kriterien erfasst:

— bei mehr als 10 % der Population in sieben Tagen:

Die Charge ist nicht verwendbar für den Test;

— zwischen 5 und 10 % der Population:

Die Hälterungszeit ist weitere sieben Tage fortzusetzen.

Treten keine weiteren Sterbefälle auf, ist die Charge für die Prüfung verwendbar, ansonsten nicht;

— bei 5 % und weniger der Population:

Die Charge ist für die Prüfung verwendbar.

1.6.4. **Anpassung**

Alle Fische sind für eine Mindestdauer von sieben Tagen vor ihrem Einsatz in der Prüfung in Wasser derselben Qualität und bei der gleichen Temperatur einzusetzen, wie es in der Prüfung verwendet wird.

▼B

1.6.5. **Durchführung der Prüfung**

Ein Vorversuch kann der eigentlichen Prüfung vorangehen. Dieser Vorversuch liefert Informationen über den in der eigentlichen Prüfung zu verwendenden Konzentrationsbereich.

Zusätzlich zu den Konzentrationen der Prüfsubstanz sind eine Kontrolle ohne die Prüfsubstanz und ggf. eine Kontrolle mit dem Hilfsstoff einzusetzen.

In Abhängigkeit von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz ist zur Erfüllung der Qualitätskriterien eine Prüfung in einem statischen, semistatischen oder Durchfluss-Verfahren auszuwählen.

Die Fische werden der Prüfsubstanz, wie im Folgenden beschrieben, ausgesetzt:

— Dauer: 96 Stunden;

— Anzahl der Tiere: mindestens 7 je Konzentration;

— Behälter: geeignetes Fassungsvermögen im Verhältnis zum empfohlenen Besatz;

— Besatz: Als Höchstbesatz werden im statischen und semistatischen Verfahren 1,0 $g.l^{-1}$ empfohlen; im Durchfluss-Verfahren ist ein höherer Besatz möglich;

— Prüfkonzentration: mindestens fünf Konzentrationen, die sich durch einen konstanten Faktor unterscheiden, der 2,2 nicht überschreiten darf, und die den Bereich von 0 % bis 100 % Mortalität so weit wie möglich umfassen;

— Wasser: siehe 1.6.1.2;

— Beleuchtung: 12 bis 16 Stunden Beleuchtungsdauer täglich;

— Temperatur: entsprechend der Fischart (Anlage 2), jedoch innerhalb ± 1 °C bei jeder einzelnen Prüfung;

— Konzentration an gelöstem Sauerstoff: nicht unter 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts bei der gewählten Temperatur;

— Fütterung: keine.

Die Fische werden nach den ersten 2 bis 4 Stunden und mindestens alle 24 Stunden beobachtet. Ein Fisch gilt als tot, wenn bei Berührung des Schwanzansatzes keine Reaktion erfolgt und wenn keine Atembewegungen erkennbar sind. Tote Fische sind, sobald sie bemerkt werden, zu entfernen und entsprechend zu protokollieren. Für den Prüfbericht sind außerdem weitere sichtbare Veränderungen zu erfassen (z. B. Gleichgewichtsverlust, Änderungen des Schwimmverhaltens, der Atmung, der Pigmentierung usw.).

Messungen des pH-Wertes, des Gehalts an gelöstem Sauerstoff und der Temperatur müssen täglich erfolgen.

*Limit-Test*

Unter Verwendung der bei diesem Prüfverfahren beschriebenen Methoden kann ein Limit-Test mit 100 $mg.l^{-1}$ durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass die $LC_{50}$ über dieser Konzentration liegt.

Wenn die Substanz so beschaffen ist, dass eine Konzentration von 100 mg/l im Prüfwasser nicht erreicht werden kann, ist der Limit-Test mit einer Konzentration durchzuführen, die der Löslichkeit der Substanz (oder der höchsten Konzentration, die eine stabile Dispersion bildet) im verwendeten Medium entspricht (vgl. auch Abschnitt 1.6.1.1).

▼B

Im Limit-Test sollten 7 bis 10 Fische untersucht und die gleiche Anzahl als Kontrollen verwendet werden. (Nach dem Binomischen Lehrsatz liegt bei Verwendung von 10 Fischen mit Null-Mortalität die Wahrscheinlichkeit bei 99,9 %, dass die $LC_{50}$ höher ist als die im Limit-Test verwendete Konzentration. Bei 7, 8 oder 9 Fischen ergibt eine Null-Mortalität eine Wahrscheinlichkeit von mindestens 99 %, dass die $LC_{50}$ höher ist als die verwendete Konzentration.)

Bei Vorliegen von Sterbefällen ist das vollständige Verfahren anzuwenden. Wenn subletale Wirkungen beobachtet werden, sind diese zu protokollieren.

2. **DATEN UND AUSWERTUNG**

Die Mortalität wird für jeden Zeitraum, in dem Beobachtungen protokolliert wurden (24, 48, 72 und 96 Stunden), für jede empfohlene Expositionsdauer auf Wahrscheinlichkeits-(Probit-)papier (mit logarithmischer Einteilung) gegen die Konzentration aufgetragen.

Soweit möglich, sollten die $LC_{50}$ und der jeweilige Vertrauensbereich ($p = 0,05$) für jeden Beobachtungszeitraum nach Standardverfahren ermittelt werden. Diese Werte sind auf eine oder höchstens zwei signifikante Stelle(n) zu runden (Beispiele für das Runden auf zwei Stellen: 170 für 173,5; 0,13 für 0,127; 1,2 für 1,21).

Sollte der Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für eine Berechnung der $LC_{50}$ zu steil sein, so reicht eine grafische Abschätzung dieses Wertes.

Ergeben zwei unmittelbar aufeinander folgende Konzentrationen, die sich durch den Faktor 2,2 unterscheiden, nur 0 % und 100 % Mortalität, so werden diese beiden Werte zur Angabe des Bereichs, in den die $LC_{50}$ fällt, herangezogen.

Wird beobachtet, dass die Stabilität oder Homogenität der Prüfsubstanz nicht aufrechterhalten werden kann, so ist dies im Prüfbericht mitzuteilen und bei der Interpretation der Ergebnisse entsprechend zu berücksichtigen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— Angaben über die verwendeten Fische (wissenschaftlicher Name, Stamm, Züchter oder Bezugsquelle, Vorbehandlungen, Größe und Anzahl der einzelnen Prüfkonzentrationen);

— Herkunft des Verdünnungswassers und wichtige chemische Eigenschaften (pH-Wert, Härte, Temperatur);

— Bei Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit: Angabe der Methode zur Herstellung des Stammansatzes und der Prüflösungen;

— Konzentration aller Hilfsstoffe;

— Liste der verwendeten Konzentrationen sowie alle vorhandenen Informationen über die Stabilität der Prüfsubstanz in der Prüflösung bei den verwendeten Konzentrationen;

— bei Durchführung chemischer Analysen: Angabe der verwendeten Methoden und der Ergebnisse;

— ggf. Ergebnisse des Limit-Tests;

— Gründe für die Auswahl und Einzelheiten der Durchführung der Prüfung (z. B. statisch, semistatisch, Dosierungsrate, Durchflussrate, ob belüftet, Fischbesatz usw.);

▼B

— Beschreibung der Prüfgeräte;

— Beleuchtungsverhältnisse;

— Konzentrationen des gelösten Sauerstoffs, pH-Werte, Temperaturen in den Prüflösungen alle 24 Stunden;

— Nachweis, dass die Qualitätskriterien erfüllt sind;

— Tabelle der kumulativen Mortalität bei jeder Konzentration und bei der Kontrolle (ggf. auch bei der Kontrolle mit dem Hilfsstoff) zu den empfohlenen Beobachtungszeitpunkten;

— grafische Darstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve am Ende der Prüfung;

— wenn möglich, die $LC_{50}$-Werte für jeden empfohlenen Beobachtungszeitpunkt (möglichst mit 95 % Vertrauensbereich);

— verwendete statistische Verfahren zur Bestimmung der $LC_{50}$-Werte;

— bei Verwendung einer Referenzsubstanz: Angabe der Ergebnisse;

— höchste eingesetzte Prüfkonzentrationen ohne Mortalität im Prüfzeitraum;

— niedrigste eingesetzte Prüfkonzentration mit 100 % Mortalität im Prüfzeitraum.

4. **LITERATUR**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and Updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7364/1,/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae*). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN-Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Commitee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R., Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Lichtfield, J, T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Phare, Exp. Therap., 1949, vol. 96,99.

(16) Finney, D. J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U. K., 1978.

(17) Sprague, J. B. Measurement of pullutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3,793-821.

(18) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C. E. Methods for calculating an $LC4_{50}$. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelinck). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634,1977, 65-84.

(20) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A Computer program for calculating an $LC_{50}$. US EPA.

▼B

*Anlage 1*

**Zubereitetes Wasser**

*Beispiel für ein geeignetes Verdünnungswasser*

Alle Chemikalien müssen analysenrein sein.

Das Wasser muss einwandfreies destilliertes oder deionisiertes Wasser mit einer Leitfähigkeit von weniger als 5 $\mu Scm^{-1}$ sein.

Die für die Destillation von Wasser verwendete Apparatur darf keine Kupferteile enthalten.

*Stammlösungen*

| | |
|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Calciumchlorid-Dihydrat) | 11,76 g |
| in Wasser lösen und mit Wasser auf 1 Liter auffüllen | |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Magnesiumsulfat-Heptahydrat) | 4,93 g |
| in Wasser lösen und mit Wasser auf 1 Liter auffüllen | |
| $NaHCO_3$ (Natriumhydrogencarbonat) | 2,59 g |
| in Wasser lösen und mit Wasser auf 1 Liter auffüllen | |
| KCl (Kaliumchlorid) | 0,23 g |
| in Wasser lösen und mit Wasser auf 1 Liter auffüllen | |

*Zubereitetes Verdünnungswasser*

Je 25 ml der vier Stammlösungen mischen und mit Wasser auf 1 Liter auffüllen.

So lange belüften, bis die Konzentration an gelöstem Sauerstoff dem Luftsauerstoff-Sättigungswert entspricht.

Der pH-Wert muss 7,8 ± 0,2 betragen.

Falls erforderlich, ist der pH-Wert mit NaOH (Natronlauge) oder HCl (Salzsäure) einzustellen.

Dieses Verdünnungswasser lässt man 12 Stunden stehen; eine weitere Belüftung ist nicht erforderlich.

Die Summe der Ca- und Mg-Ionen in dieser Lösung beträgt 2,5 $mmol.l^{-1}$. Das Verhältnis der Ca- zu den Mg-Ionen beträgt 4:1 und das der Na- zu den K-Ionen 10:1. Die Gesamtalkalinität dieser Lösung liegt bei 0,8 $mmol.l^{-1}$.

Eine abweichende Zubereitung des Verdünnungswassers darf die Zusammensetzung oder die Eigenschaften des Wassers nicht verändern.

▼B

*Anlage 2*

**Für die Prüfung empfohlene Fischarten**

| Empfohlene Art | Empfohlener Bereich der Prüftemperatur ( °C) | Empfohlene Gesamtlänge der Fische (cm) |
|---|---|---|
| *Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae)* (Hamilton-Buchanan) Zebrabärbling | 20 bis 24 | 3,0 ± 0,5 |
| *Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae*) (Rafinesque) Amerikanische Elnitze | 20 bis 24 | 5,0 ± 2,0 |
| *Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae*) (Linnaeus 1758) Karpfen | 20 bis 24 | 6,0 ± 2,0 |
| *Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae) Cyprinodontidae* (Tomminck et Schlegel 1850) Japanischer Reisfisch | 20 bis 24 | 3,0 ± 1,0 |
| *Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae*) (Peters 1859) Guppy | 20 bis 24 | 3,0 ± 1,0 |
| *Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae*) (Rafinesque Linnaeus 1758) Blauer Sonnenbarsch | 20 bis 24 | 5,0 ± 2,0 |
| *Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae*) (Walbaum 1988) Regenbogenforelle | 12 bis 17 | 6,0 ± 2,0 |
| *Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae*) (Linnaeus 1758) Goldorfe | 20 bis 24 | 6,0 ± 2,0 |

**Beschaffung**

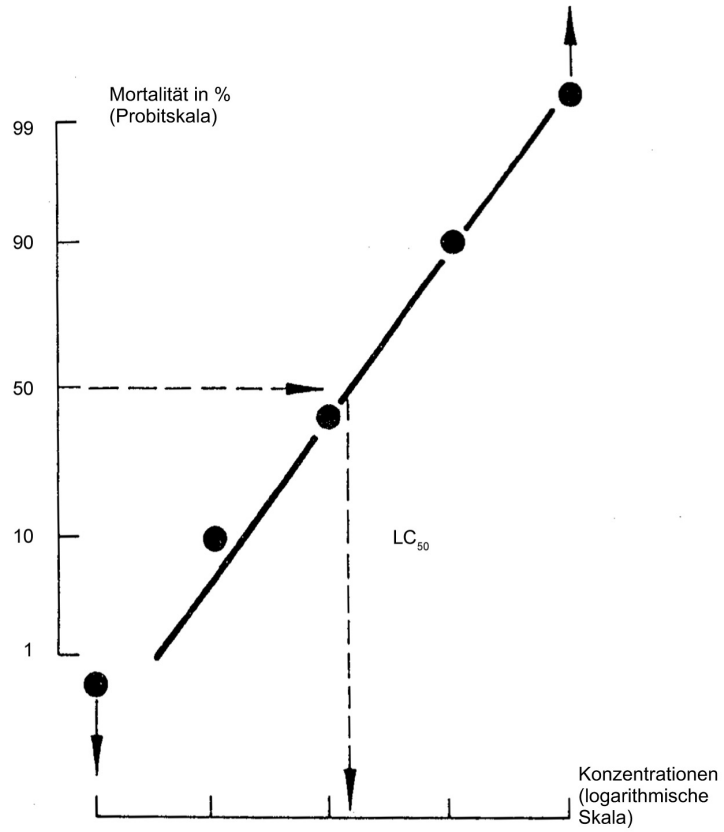
Die oben aufgeführten Fischarten lassen sich leicht züchten und/oder sind das ganze Jahr über weitgehend verfügbar. Sie lassen sich in Fischzuchtbetrieben oder in Prüfeinrichtungen unter Bedingungen züchten und aufziehen, die eine Kontrolle über Krankheiten und Parasiten erlauben, so dass sie für eine Prüfung gesund und von bekannter Herkunft sind. Diese Fischarten sind in vielen Teilen der Welt erhältlich.

▼B

*Anlage 3*

**Beispiel für eine Konzentrations-Mortalitätskurve**

Beispiel für die Bestimmung der $LC_{50}$ auf Wahrscheinlichkeitspapier



▼B

## C.2. *DAPHNIA*-Sp.-TEST AUF AKUTE SCHWIMMUNFÄHIGKEIT

### 1. METHODE

Diese Methode für die Untersuchung auf akute Schwimmunfähigkeit entspricht OECD TG 202 (2004).

### 1.1. EINLEITUNG

Durch diese Methode wird ein akuter Toxizitätstest beschrieben, mit dem die Wirkung von Chemikalien auf Daphnien bewertet wird. Soweit möglich, wurden bestehende Testmethoden herangezogen (1) (2) (3).

### 1.2. DEFINITIONEN

Im Rahmen der vorliegenden Testmethode werden folgende Definitionen verwendet:

**$EC_{50}$**: die geschätzte Konzentration, bei der 50 % der Daphnien innerhalb einer festgelegten Expositionszeit schwimmunfähig werden. Wird eine abweichende Definition verwendet, ist dies zusammen mit der Quelle im Bericht anzugeben.

**Schwimmunfähigkeit:** Tiere, die nicht innerhalb von 15 Sekunden nach vorsichtigem Umrühren des Testgefäßes schwimmen können, gelten als schwimmunfähig (auch wenn sie noch ihre Antennen bewegen können).

### 1.3. PRINZIP DER TESTMETHODE

Junge Daphnien, die zu Beginn des Tests weniger als 24 Stunden alt sind, werden 48 Stunden lang der Testsubstanz bei unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt. Die Schwimmunfähigkeit wird nach 24 Stunden und 48 Stunden aufgezeichnet und mit Kontrollwerten verglichen. Die Ergebnisse werden zur Berechnung der nach 48 Stunden herrschenden $EC_{50}$ analysiert (siehe Definition in 1.2). Die Ermittlung der $EC_{50}$ nach 24 Stunden ist freigestellt.

### 1.4. INFORMATIONEN ZUR TESTSUBSTANZ

Wasserlöslichkeit und Dampfdruck der Testsubstanz müssen bekannt sein, und es muss eine zuverlässige Analysenmethode zur Quantifizierung der Substanz in den Testlösungen zur Verfügung stehen, mit der der festgestellte Rückgewinnungsgrad und die Bestimmungsgrenze angegeben werden können. Zu den zweckmäßigen Angaben zählen Strukturformel, Reinheit der Substanz, Stabilität in Wasser oder Licht, $P_{ow}$ und die Ergebnisse eines Tests auf leichte biologische Abbaubarkeit (siehe Methode C.4).

*Hinweis*: Richtlinien für Tests an Substanzen, deren Test aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften schwierig ist, sind in (4) enthalten.

### 1.5. REFERENZSUBSTANZEN

Die Referenzsubstanz kann auf $EC_{50}$ getestet werden, um auf diese Weise die Zuverlässigkeit der Testbedingungen zu gewährleisten. Hierfür wird die Verwendung von Giftstoffen empfohlen, die in internationalen Ringtests (1) (5) verwendet werden [1]. Test(s) mit einer Referenzsubstanz sind möglichst monatlich, mindestens aber zweimal jährlich durchzuführen.

[1] Nach den Ergebnissen dieser laborübergreifenden Tests und einem technischen Korrigendum zu ISO 6341 liegt der $EC_{50}$ — 24 h von Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) in einem Bereich zwischen 0,6 mg/l und 1,7 mg/l.

▼B

1.6. QUALITÄTSKRITERIEN

Die Tests sind gültig, wenn die folgenden Durchführungskriterien eingehalten werden:

— In den Kontrollen — einschließlich der Kontrolle, die das Lösemittel enthält — dürfen nicht mehr als 10 % der Daphnien schwimmunfähig geworden sein;

— die Konzentration des gelösten Sauerstoffs muss in den Kontroll- und Testgefäßen bei Testende > 3 mg/l sein.

*Hinweis*: Beim ersten Kriterium dürfen nicht mehr als 10 % der dem Kontrolltest unterzogenen Daphnien Schwimmunfähigkeit oder sonstige Anzeichen von Erkrankungen oder Stress zeigen, z. B. Verfärbungen oder ungewöhnliches Verhalten wie Einschluss an der Wasseroberfläche.

1.7. BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.7.1. **Geräte**

Die Testgefäße und sonstigen Geräte, die mit den Testlösungen in Kontakt kommen, müssen vollständig aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Material bestehen. Als Testgefäße werden normalerweise Reagenzgläser oder Bechergläser verwendet; diese müssen vor jeder Verwendung nach den üblichen Laborverfahren gereinigt werden. Die Testgefäße sind locker abzudecken, um Wasserverlust durch Verdunstung zu verringern und Staubeintritt in die Lösungen zu verhindern. Flüchtige Substanzen sind in vollständig gefüllten, geschlossenen Behältern zu testen, die ausreichend groß sein müssen, so dass verhindert wird, dass durch Sauerstoffmangel eine drosselnde Wirkung eintritt oder der Sauerstoffgehalt zu gering wird (siehe Abschnitt 1.6 und ersten Absatz von Abschnitt 1.8.3).

Zusätzlich werden einige oder alle der folgenden Geräte verwendet: Sauerstoffmessgerät (mit Mikroelektrode oder anderen geeigneten Vorrichtungen für die Messung von gelöstem Sauerstoff in Proben mit geringem Probengehalt), pH-Messgerät, geeignete Geräte für die Temperaturregelung, Geräte für die Ermittlung des Gesamtgehalts an organischen Kohlenstoffverbindungen (TOC), Geräte für die Ermittlung des chemischen Sauerstoffbedarfs (COD) und Geräte für die Härtebestimmung usw.

1.7.2. **Testorganismen**

*Daphnia magna* Straus ist die vorzugsweise verwendete Art; allerdings können auch andere Arten der *Daphnia* für diese Tests verwendet werden (z. B. *Daphnia pulex).* Zu Beginn des Tests müssen die Tiere weniger als 24 Stunden alt sein; zur Begrenzung von Variabilitäten wird dringend empfohlen, keine Daphnien aus der ersten Nachkommenschaft einer Brut zu verwenden. Die Tiere müssen aus einem gesunden Bestand stammen (d. h., sie dürfen keine Anzeichen von Stress aufweisen, z. B. hohe Mortalität, Vorhandensein von männlichen Tieren und Ephippien, verzögerte Produktion der ersten Brut, Verfärbungen an den Tieren usw.). Alle für einen bestimmten Test verwendeten Organismen müssen aus Kulturen stammen, die aus dem gleichen Daphnienbestand entnommen wurden. Die Elterntiere müssen unter Kulturbedingungen (Licht, Temperatur, Medium) gehalten werden, die den Testbedingungen ähneln. Wird für den Test der Daphnien ein anderes Kulturmedium verwendet als bei den routinemäßigen Daphnienkulturen, sollte dem Test eine Eingewöhnungsphase als Vortest vorausgehen. Hierzu sind die Zuchtdaphnien vor Testbeginn mindestens 48 Stunden lang bei Testtemperatur in Verdünnungswasser zu halten.

▼B

1.7.3. **Halte- und Verdünnungswasser**

Natürliches Wasser (Oberflächen- oder Grundwasser), zubereitetes Wasser oder entchlortes Leitungswasser sind als Halte- und Verdünnungswasser zulässig, wenn die Daphnien hierin während der Zucht-, Akklimatisations- und Testphase ohne Stressanzeichen überleben. Alle Wassersorten, die den chemischen Eigenschaften von zugelassenem Verdünnungswasser gemäß Anlage 1 entsprechen, sind als Testwasser geeignet. Das Wasser muss während der gesamten Testdauer eine gleich bleibende Qualität aufweisen. Zubereitetes Wasser kann durch Zugabe bestimmter Mengen von analysenreinen Reagenzien zu entionisiertem oder destilliertem Wasser hergestellt werden. Beispiele für zubereitetes Wasser sind in (1), (6) und in Anlage 2 enthalten. Dabei ist zu beachten, dass Medien, die bekannte Chelatbildner enthalten, z. B. die Medien M4 und M7 aus Anlage 2, für Tests an metallhaltigen Substanzen zu vermeiden sind. Der pH-Wert muss sich in einem Bereich zwischen 6 und 9 bewegen. Eine Härte zwischen 140 und 250 mg/l (wie $CaCO_3$) wird für *Daphnia Magna* empfohlen, für andere *Daphnia*-Arten ist ggf. auch eine geringere Härte geeignet. Das Verdünnungswasser kann vor Verwendung für den Test belüftet werden, bis die Konzentration an gelöstem Sauerstoff die Sättigungsgrenze erreicht hat.

Wird natürliches Wasser verwendet, sind die Qualitätsparameter mindestens zweimal jährlich bzw. immer dann zu messen, wenn der Verdacht besteht, dass sich diese Eigenschaften erheblich verändert haben (siehe vorigen Abschnitt und Anlage 1). Außerdem ist eine Messung auf Schwermetalle (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) durchzuführen. Wird entchlortes Leitungswasser verwendet, empfiehlt sich eine tägliche Chloranalyse. Wird Verdünnungswasser aus einer Oberflächenwasser- oder Grundwasserquelle verwendet, sind Leitfähigkeit und der Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffverbindungen (TOC) oder der chemische Sauerstoffbedarf (COD) zu messen.

1.7.4. **Testlösungen**

Die Testlösungen in der festgelegten Konzentration werden normalerweise durch Verdünnung des Stammansatzes hergestellt. Der Stammansatz ist vorzugsweise durch Lösung der Testsubstanz im Verdünnungswasser herzustellen. Die Verwendung von Lösemitteln, Emulgatoren oder Dispergiermitteln sollte möglichst vermieden werden. Allerdings sind derartige Verbindungen in bestimmten Fällen zur Herstellung eines ausreichend konzentrierten Stammansatzes erforderlich. Richtlinien für geeignete Lösemittel, Emulgatoren und Dispergiermittel sind in (4) nachzulesen. Grundsätzlich darf die Testsubstanz in den Testlösungen die Löslichkeitsgrenze im Verdünnungswasser nicht überschreiten.

Der Test ist ohne Korrektur des pH-Werts durchzuführen. Bleibt der pH-Wert nicht im Bereich zwischen 6 und 9, ist ein zweiter Test durchzuführen, bei dem der pH-Wert des Stammansatzes auf den pH-Wert des Verdünnungswassers vor Zugabe der Testsubstanz korrigiert wird. Die pH-Korrektur muss so erfolgen, dass sich die Konzentration des Stammansatzes nicht nennenswert verändert und keine chemische Reaktion oder Ausfällung der Testsubstanz eintritt. Vorzugsweise sollten HCl und NaOH verwendet werden.

▼B

1.8. DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1.8.1. **Expositionsbedingungen**

1.8.1.1. *Testgruppen und Kontrollen*

Die Testgefäße werden mit Verdünnungswasser und Lösungen der Testsubstanz in geeigneten Volumenanteilen gefüllt. Das Luft-Wasser-Volumenverhältnis im Gefäß muss bei den Test- und Kontrollgruppen identisch sein. Anschließend werden die Daphnien in die Testgefäße eingelegt. Für jede Testkonzentration und für die Kontrollen sind mindestens 20 Tiere zu verwenden, die vorzugsweise in vier Gruppen mit je fünf Tieren aufgeteilt werden sollten. Je Tier sind mindestens 2 ml der Testlösung bereitzustellen (d. h. ein Volumen von 10 ml für fünf Daphnien je Testgefäß). Der Test ist mit einem semistatischen Erneuerungs- oder Durchflusssystem durchzuführen, wenn die Konzentration der Testsubstanz nicht stabil ist.

Zusätzlich zu den Behandlungsreihen sind eine Kontrollreihe mit Verdünnungswasser sowie — sofern relevant — eine Kontrollreihe, die das Solubilisierungsmittel enthält, durchzuführen.

1.8.1.2. *Testkonzentrationen*

Zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs für den endgültigen Test kann ein Vortest durchgeführt werden, sofern nicht Angaben zur Toxizität der Testsubstanz vorliegen. Hierzu werden die Daphnien einer Reihe von weit auseinander liegenden Konzentrationen der Testsubstanz ausgesetzt. Jeder Testkonzentration werden fünf Daphnien über einen Zeitraum von 48 Stunden oder weniger ausgesetzt; wiederholte Gleichtests sind nicht notwendig. Die Expositionsdauer kann verkürzt werden (z. B. auf 24 Stunden oder weniger), wenn über eine kürzere Zeitdauer geeignete Daten für den Vortest ermittelt werden können.

Es sind mindestens fünf Testkonzentrationen zu verwenden. Sie sind in einer geometrischen Reihe mit einem Separierungsfaktor anzuordnen, der einen Wert von 2,2 möglichst nicht überschreiten sollte. Werden weniger als fünf Konzentrationen verwendet, ist eine Begründung vorzulegen. Die höchste getestete Konzentration sollte vorzugsweise eine 100 %ige Schwimmunfähigkeit ergeben, die niedrigste getestete Konzentration sollte vorzugsweise keine wahrnehmbare Wirkung zeigen.

1.8.1.3. *Inkubationsbedingungen*

Die Temperatur muss im Bereich zwischen 18 °C und 22 °C liegen; für jeden Einzeltest ist die Temperatur auf ± 1 °C konstant zu halten. Es wird ein Zyklus mit 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelphase empfohlen. Völlige Dunkelheit ist ebenfalls zulässig, vor allem bei unter Lichteinwirkung instabilen Testsubstanzen.

Die Testgefäße dürfen während des Tests nicht belüftet werden. Der Test wird ohne pH-Korrektur durchgeführt. Die Daphnien dürfen während des Tests nicht gefüttert werden.

1.8.1.4. *Testdauer*

Die Testdauer beträgt 48 Stunden.

1.8.2. **Beobachtungen**

Jedes Testgefäß ist 24 und 48 Stunden nach Testbeginn auf schwimmunfähige Daphnien zu kontrollieren (siehe Definitionen in 1.2). Neben der festgestellten Schwimmunfähigkeit sind etwaige Verhaltensauffälligkeiten oder äußerliche Veränderungen im Bericht anzugeben.

▼B

1.8.3. **Analysemessungen**

Der gelöste Sauerstoff und der pH-Wert sind zu Beginn und Ende des Tests in den Kontrollen und in der höchsten Konzentration der Testsubstanz zu messen. Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs in den Kontrollen muss dem Validitätskriterium entsprechen (siehe 1.6). Der pH-Wert darf in einem einzigen Test normalerweise nicht um mehr als 1,5 Einheiten variieren. Die Temperatur wird normalerweise in Kontrollgefäßen oder in Umgebungsluft gemessen und ist vorzugsweise durchgehend während des gesamten Tests bzw. zumindest zu Anfang und Ende des Tests aufzuzeichnen.

Die Konzentration der Testsubstanz ist mindestens bei der höchsten und niedrigsten Testkonzentration und zu Beginn und Ende des Tests zu messen (4). Es wird empfohlen, bei den Ergebnissen die gemessenen Konzentrationen zugrunde zu legen. Lässt sich aber nachweisen, dass die Konzentration der Testsubstanz während des gesamten Tests in zufriedenstellender Weise innerhalb von ± 20 % der nominellen oder gemessenen Anfangskonzentration gehalten wurde, können bei den Ergebnissen die nominellen oder gemessenen Anfangswerte zugrunde gelegt werden.

1.9. LIMIT-TEST

Anhand der in dieser Testmethode beschriebenen Verfahren kann ein Limit-Test mit 100 mg/l der Testsubstanz oder bis zum Erreichen der Löslichkeitsgrenze (je nachdem, welcher Wert niedriger ist) durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass die $EC_{50}$ über dieser Konzentration liegt. Der Limit-Test ist an 20 Daphnien (die vorzugsweise in vier Gruppen zu je fünf Tieren aufgeteilt werden sollten) und einer gleichen Anzahl Tiere in den Kontrollgruppen durchzuführen. Wird eine Schwimmunfähigkeit festgestellt, ist eine umfassende Untersuchung durchzuführen. Etwaige beobachtete anormale Verhaltensweisen sind aufzuzeichnen.

2. **DATEN**

Die Daten sind in Tabellenform zusammenzufassen, wobei für jede der Behandlung unterzogenen Gruppe und Kontrollgruppe die Zahl der verwendeten Daphnien und die bei jeder Beobachtung festgestellte Schwimmunfähigkeit angegeben werden. Der prozentuale Anteil der nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden schwimmunfähig gewordenen Tiere wird anhand der Testkonzentrationen grafisch dargestellt. Die Daten werden durch geeignete statistische Verfahren (z. B. Probitanalyse) analysiert, mit denen die Steigung der Kurven und die $EC_{50}$ mit einer Vertrauensgrenze von 95 % berechnet werden kann ($p = 0,05$) (7) (8).

Können die Standardmethoden für die Berechnung der $EC_{50}$ nicht auf die ermittelten Daten angewandt werden, sind die höchste Konzentration, bei der keine Schwimmunfähigkeit eintritt, und die niedrigste Konzentration, die zu 100 %iger Schwimmunfähigkeit führt, als Näherungswerte für die $EC_{50}$ (die das geometrische Mittel dieser beiden Konzentrationen ausdrückt) zugrunde zu legen.

3. **BERICHTER ATTUNG**

3.1. TESTBERICHT

Der Testbericht muss folgende Angaben enthalten:

Testsubstanz

— physikalische Beschaffenheit und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften,

▼B

— chemische Kenndaten (einschließlich Angabe der Reinheit).

Getestete Art

— Herkunft und Art der *Daphnia,* Züchter (sofern bekannt) und Kulturbedingungen (einschließlich Herkunft, Art und Menge der Nahrung, Häufigkeit der Fütterung).

Testbedingungen

— Beschreibung der Testgefäße: Art der Gefäße, Volumen der Lösung, Zahl der Daphnien je Testgefäß, Zahl der Testgefäße (wiederholte Gleichtests) je Konzentration,

— Verfahren zur Herstellung des Stammansatzes und der Testlösungen einschließlich der verwendeten Lösemittel oder Dispergiermittel, verwendete Konzentrationen,

— Details zum Verdünnungswasser: Herkunft und Kenndaten für die Wasserqualität (pH-Wert, Härte, Ca/Mg-Verhältnis, Na/K-Verhältnis, Alkalinität, Leitfähigkeit usw.), Zusammensetzung des zubereiteten Wassers (sofern diese Wassersorte verwendet wird),

— Inkubationsbedingungen: Temperatur, Lichtstärke und -dauer, gelöster Sauerstoff, pH-Wert usw.

Ergebnisse

— Zahl und prozentualer Anteil der Daphnien, die schwimmunfähig wurden oder anderweitige negative Wirkungen zeigen (einschließlich Verhaltensauffälligkeiten), in den Kontrollen sowie in den einzelnen behandelten Gruppen zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten; ferner eine Beschreibung der Art der beobachteten Wirkungen,

— Ergebnisse und Datum des mit der Referenzsubstanz (sofern vorhanden) durchgeführten Tests,

— nominale Testkonzentrationen und Ergebnis sämtlicher Analysen für die Ermittlung der Konzentration der Testsubstanz in den Testgefäßen; der Rückgewinnungsgrad der Methode und die Bestimmungsgrenze sind ebenfalls im Bericht anzugeben,

— sämtliche während des Tests durchgeführten physikalisch-chemischen Messungen von Temperatur, pH-Wert und gelöstem Sauerstoff,

— Schwimmunfähigkeitswert $EC_{50}$ nach 48 h mit Vertrauensintervallen und grafischen Darstellungen des für die Berechnung verwendeten Modells, Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurven und des Standardfehlers, statistische Verfahren zur Ermittlung von $EC_{50}$ (diese Größen sind, sofern sie gemessen wurden, auch für die Schwimmunfähigkeit nach 24 h anzugeben),

— Erläuterung etwaiger Abweichungen von der Testmethode sowie der Angabe, ob die Abweichung sich auf die Testergebnisse ausgewirkt hat.

4. **LITERATURHINWEISE**

(1) ISO 6341 (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test (Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der Wirkung von Wasserinhaltsstoffen auf die Bewegungsfähigkeit von *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Akuter Toxizitätstest). Third edition, 1996.

(2) EPA OPPTS 850.1010 (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater daphnids.

▼B

(3) Environment Canada (1996). Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

(5) Kommission der Europäischen Gemeinschaften. Study D8369 (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia* (Laborübergreifendes Testprogramm zur Untersuchung der Ökotoxizität einer chemischen Substanz für *Daphnia)*.

(6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

(7) Stephan, C.E (1977). Methods for calculating an $LC_{50}$. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials, 65-84.

(8) Finney, D.J (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin/Weycombe, UK.

▼B

*Anlage 1*

**CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINER GEEIGNETEN ZUSAMMENSETZUNG VON VERDÜNNUNGSWASSER**

| Substanz | Konzentration |
|---|---|
| Partikel | < 20 mg/l |
| Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffen | < 2 mg/l |
| Nicht ionisierter Ammoniak | < 1 µg/l |
| Chlorüberschuss | < 10 µg/l |
| Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden | < 50 ng/l |
| Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen | < 50 ng/l |
| Gesamtgehalt an organischem Chlor | < 25 ng/l |

▼B

*Anlage 2*

## BEISPIELE FÜR GEEIGNETES ZUBEREITETES TESTWASSER

### ISO-Testwasser (1)

| Stammansatz (Einzelsubstanz) | | Zur Herstellung von zubereitetem Wasser werden auf 1 Liter Wasser folgende Mengen des Stammansatzes zugesetzt (*) |
|---|---|---|
| Substanz | 1 Liter Wasser zugesetzte Menge (*) | |
| Kalziumchlorid $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 11,76 g | 25 ml |
| Magnesiumsulfat $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 4,93 g | 25 ml |
| Natriumbicarbonat $NaHCO_3$ | 2,59 g | 25 ml |
| Kaliumchlorid KCl | 0,23 g | 25 ml |

(*) Wasser in der erforderlichen Reinheit, d. h. entionisiert, destilliert oder einer Umkehrosmose unterzogen, Leitfähigkeit möglichst nicht über 10 $\mu S/cm^{-1}$.

### Elendt M7- und M4-Medium

**Gewöhnung an die Medien Elendt M4 und M7**

In verschiedenen Labors sind Schwierigkeiten bei der direkten Umsetzung von Daphnien in die Medien M4 und M7 aufgetreten. Als erfolgreich erwies sich jedoch eine schrittweise Eingewöhnung, d. h. beim Wechsel aus dem eigenen Medium in 30 %iges Elendt-Medium, dann in 60 %iges Elendt-Medium und schließlich in ein 100 %iges Elendt-Medium. Die erforderliche Eingewöhnungszeit kann bis zu einem Monat betragen.

**Herstellung**

*Spurenelemente*

Gesonderte Stammansätze (I) einzelner Spurenelemente werden zuerst in Wasser geeigneter Reinheit (d. h. entionisiert, destilliert oder aus Umkehrosmose) hergestellt. Aus diesen unterschiedlichen Stammansätzen (I) wird ein zweiter alleiniger Stammansatz (II) hergestellt, der sämtliche Spurenelemente (kombinierte Lösung) enthält, d. h.:

| Stammansatz/Stammansätze I (Einzelsubstanz) | In Wasser zugesetzte Menge (mg/l) | Konzentration (im Verhältnis zu M4) | Zur Herstellung des kombinierten Stammansatzes II ist die folgende Menge Stammansatz I zu Wasser zuzusetzen (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ | 57 190 | 20 000-fach | 1,0 | 0,25 |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 7 210 | 20 000-fach | 1,0 | 0,25 |
| LiCl | 6 120 | 20 000-fach | 1,0 | 0,25 |

▼B

| Stammansatz/Stammansätze I (Einzelsubstanz) | In Wasser zugesetzte Menge (mg/l) | Konzentration (im Verhältnis zu M4) | Zur Herstellung des kombinierten Stammansatzes II ist die folgende Menge Stammansatz I zu Wasser zuzusetzen (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| RbCl | 1 420 | 20 000-fach | 1,0 | 0,25 |
| $SrCl_2 \cdot 6H_2O$ | 3 040 | 20 000-fach | 1,0 | 0,25 |
| NaBr | 320 | 20 000-fach | 1,0 | 0,25 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 1 230 | 20 000-fach | 1,0 | 0,25 |
| $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | 335 | 20 000-fach | 1,0 | 0,25 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 20 000-fach | 1,0 | 1,0 |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 200 | 20 000-fach | 1,0 | 1,0 |
| KI | 65 | 20 000-fach | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2SeO_3$ | 43,8 | 20 000-fach | 1,0 | 1,0 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 20 000-fach | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 5 000 | 2 000-fach | — | — |
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1 991 | 2 000-fach | — | — |

$Na_2$-EDTA- und $FeSO_4$-Lösungen werden einzeln hergestellt, zusammengegossen und sofort im Autoklav behandelt.

Dies ergibt:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2 l Fe-EDTA-Lösung | | 1 000-fach | 20,0 | 5,0 |

*Medien M4 und M7*

Die Medien M4 und M7 werden unter Verwendung des Stammansatzes II und der folgenden Makronährstoffe und Vitamine hergestellt:

| | Dem Wasser zugesetzte Menge (mg/l) | Konzentration (bezogen auf Medium M4) | Menge an Stammansatz II, die für die Zubereitung des Mediums zugesetzt wird (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| Stammansatz II (kombinierte Spurenelemente) | | 20-fach | 50 | 50 |
| Makronährstoff-Stammansätze (Einzelsubstanz) | | | | |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 293 800 | 1 000-fach | 1,0 | 1,0 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 246 600 | 2 000-fach | 0,5 | 0,5 |
| KCl | 58 000 | 10 000-fach | 0,1 | 0,1 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1 000-fach | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ | 50 000 | 5 000-fach | 0,2 | 0,2 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 10 000-fach | 0,1 | 0,1 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 10 000-fach | 0,1 | 0,1 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 10 000-fach | 0,1 | 0,1 |

▼B

| | Dem Wasser zugesetzte Menge (mg/l) | Konzentration (bezogen auf Medium M4) | Menge an Stammansatz II, die für die Zubereitung des Mediums zugesetzt wird (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| Kombinierter Vitaminstamm | — | 10 000-fach | 0,1 | 0,1 |

Der kombinierte Vitamin-Stammansatz wird durch Zugabe der 3 Vitamine gemäß untenstehender Übersicht zu 1 Liter Wasser hergestellt:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Thiaminhydrochlorid | 750 | 10 000-fach | | |
| Cyanocobalamin ($B_{12}$) | 10 | 10 000-fach | | |
| Biotin | 7,5 | 10 000-fach | | |

Der kombinierte Vitamin-Stammansatz wird in kleinen Portionen tiefgefroren aufbewahrt. Die Vitamine werden den Medien kurz vor der Verwendung zugesetzt.

*Hinweis*: Um ein Ausfällen der Salze bei der Herstellung der vollständigen Medien zu vermeiden, sind die Portionen der Stammansätze zu ca. 500 bis 800 ml entionisiertem Wasser zuzugeben und anschließend auf 1 Liter aufzufüllen.

*Hinweis*: Die erste Veröffentlichung zum Medium M4 ist zu finden bei Elendt, B. P (1990): Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M1

## C.3. SÜSSWASSERALGEN UND CYANOBAKTERIEN: WACHSTUMSINHIBITIONSTEST

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der Prüfrichtlinie OECD TG 201 (2006) (1).

### 1.1. EINLEITUNG

Die Prüfmethoden werden regelmäßig unter Berücksichtigung des wissenschaftlichen Fortschritts überarbeitet und aktualisiert. Prüfmethode C.3 musste unter Einbeziehung weiterer Arten und unter Berücksichtigung der Anforderungen an die Risikobewertung und Klassifizierung chemischer Stoffe überarbeitet werden. Die Überarbeitung wurde auf der Grundlage umfassender praktischer Erfahrungen sowie des wissenschaftlichen Fortschritts im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Algentoxizität und der weit reichenden Anwendung entsprechender Rechtsvorschriften seit Annahme der ursprünglichen Fassung vorgenommen.

### 1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode werden die folgenden Begriffsbestimmungen zugrunde gelegt und folgende Abkürzungen verwendet:

**Biomasse**: Trockengewicht lebenden Materials einer Population bezogen auf ein vorgegebenes Volumen (z. B. mg Algen/Liter Testlösung); gewöhnlich wird „Biomasse“ definiert als Masse; in Verbindung mit dieser Prüfung wird der Begriff allerdings zur Bezeichnung einer Masse pro Volumen verwendet. Typischerweise werden Surrogate für die betreffende Biomasse (z. B. Zellgehalt oder Fluoreszenz) gemessen; entsprechend bezieht sich der Begriff „Biomasse“ auch auf diese Surrogatparameter.

**Variationskoeffizient**: ein dimensionsloses Maß für die Veränderlichkeit eines Parameters; definiert als Verhältnis der Standardabweichung vom Mittelwert; der Variationskoeffizient kann auch als Prozentwert ausgedrückt werden. Der mittlere Variationskoeffizient der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate sollte bei Wiederholungs-Kontrollkulturen wie folgt berechnet werden:

1. Der Variationskoeffizient in Prozent (VK %) der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate ist aus den täglichen bzw. abschnittsbezogenen Wachstumsraten der entsprechenden Wiederholungen zu beziehen.

2. Aufgrund des Mittelwertes aller in Punkt 1 berechneten Werte ist der mittlere Variationskoeffizient der täglichen/abschnittsbezogenen Wachstumsraten der Kulturen in den Wiederholungen zu bestimmen.

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

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

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

▼M1

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

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

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

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

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

1.3. ANWENDBARKEIT DER PRÜFMETHODE

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

1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Mit dieser Prüfung sollen die Auswirkungen einer Substanz auf das Wachstum von Süßwassermikroalgen und/oder Cyanobakterien bestimmt werden. Exponentiell wachsende Testorganismen werden über einen Zeitraum von im Allgemeinen 72 Stunden in Batch-Kulturen der Prüfsubstanz ausgesetzt. Trotz der verhältnismäßig kurzen Testdauer können die Auswirkungen über mehrere Generationen beurteilt werden.

Die Systemreaktion besteht in der Verringerung des Wachstums einer Reihe von Algenkulturen (Versuchseinheiten), die einer Prüfsubstanz in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt wurden. Diese Reaktion wird dann in Abhängigkeit von der Expositionskonzentration gegenüber dem durchschnittlichen Wachstum in zur Wiederholung verwendeten Kontrollkulturen bewertet, die der betreffenden Substanz nicht ausgesetzt waren. Um die Systemreaktion auf toxische Auswirkungen (optimale Empfindlichkeit) umfassend beschreiben zu können, wird ein unbegrenztes exponentielles Wachstum der Kulturen bei hinreichender Ernährung und kontinuierlicher Beleuchtung über einen ausreichenden Zeitraum ermöglicht, damit anschließend die Verringerung der spezifischen Wachstumsrate gemessen werden kann.

▼M1

Wachstum und Wachstumshemmung werden durch zeitabhängige Messung der Biomasse der Algen bestimmt. Die Biomasse der Algen wird als Trockengewicht pro Volumen ausgedrückt (z. B. in mg Algen/Liter Testlösung). Das Trockengewicht ist jedoch schwer zu messen; daher werden Surrogatparameter verwendet. Häufigster Surrogatparameter ist der Zellgehalt. Weitere Surrogatparameter sind das Zellvolumen, die Fluoreszenz, die optische Dichte usw. Ein Faktor für die Umrechnung zwischen dem gemessenen Surrogatparameter und der Biomasse sollte bekannt sein.

Der Endpunkt des Tests ist die Wachstumshemmung, ausgedrückt als logarithmische Zunahme der Biomasse (durchschnittliche spezifische Wachstumsrate) während der Expositionsdauer. Aus den in einer Reihe von Testlösungen erfassten durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten wird die Konzentration bestimmt, bei der sich eine spezifizierte Hemmung der Wachstumsrate von x % (z. B. 50 %) ergibt; diese Konzentration wird als $E_rC_x$ bezeichnet (z. B. $E_rC_{50}$).

Bei der Anwendung dieser Methode im Rahmen des Gemeinschaftsrechts sollte die Ergebnisberechnung aus den im nachfolgenden Abschnitt 2.2 dargelegten Gründen auf einer durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate basieren. Bei dieser Prüfmethode wird als weitere Reaktionsvariable der Zellertrag verwendet; diese Variable kann erforderlich sein, damit in manchen Ländern bestimmte maßgebliche Rechtsvorschriften erfüllt werden. Der Zellertrag wird definiert als Biomasse am Ende der Expositionsdauer abzüglich der Biomasse zu Beginn der Expositionsdauer. Aus dem in einer Reihe von Testlösungen erfassten Zellertrag wird die Konzentration berechnet, bei der sich eine spezifizierte Hemmung des Zellertrags (z. B. um 50 %) ergibt; diese Konzentration wird als $E_yC_x$ angegeben (z. B. $E_yC_{50}$).

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

1.5. INFORMATIONEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

Informationen zur Prüfsubstanz, die bei der Bestimmung der Prüfbedingungen hilfreich sein könnten, sind z. B. die Strukturformel, die Reinheit, die Lichtbeständigkeit, die Beständigkeit unter den Prüfbedingungen, das Lichtabsorptionsverhalten, pKa und die Ergebnisse von Transformationsstudien (u. a. die Ergebnisse von Studien zur biologischen Abbaubarkeit in Wasser).

Die Wasserlöslichkeit, der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ($P_{ow}$) und der Dampfdruck der Prüfsubstanz sollten bekannt sein, eine validierte Methode zur Quantifizierung der Substanz in den Testlösungen mit bekannten Wiederfindungsraten und mit bekannter Nachweisgrenze sollte verfügbar sein.

1.6. REFERENZSUBSTANZ

Um das Prüfverfahren zu testen, können Referenzsubstanzen wie z. B. das im internationalen Ringtest (4) verwendete 3,5-Dichlorphenol geprüft werden. Für Grünalgen kann auch Kaliumdichromat als Referenzsubstanz verwendet werden. Nach Möglichkeit sollten Referenzsubstanzen mindestens zweimal jährlich getestet werden.

1.7. VALIDITÄT DES TESTS

Damit ein Test als gültig gewertet werden kann, sollten die folgenden Kriterien erfüllt sein:

▼M1

— Die Biomasse der Kontrollkulturen sollte binnen der 72-stündigen-Testdauer exponentiell um einen Faktor von mindestens 16 gewachsen sein. Dieses Wachstum entspricht einer spezifischen Wachstumsrate von 0,92 $d^{-1}$. Bei den am häufigsten verwendeten Arten ist die Wachstumsrate im Allgemeinen erheblich größer (siehe Anlage 1). Dieses Kriterium wird unter Umständen nicht erfüllt, wenn Arten verwendet werden, die langsamer wachsen als die in Anlage 1 genannten Arten. In diesem Fall sollte die Testdauer so verlängert werden, dass ein mindestens 16faches Wachstum der Kontrollkulturen gewährleistet ist; dabei muss das Wachstum während der gesamten Testdauer exponentiell erfolgen. Die Testdauer kann bis auf eine Mindestdauer von 48 Stunden verkürzt werden, damit während des Tests ein unbegrenztes exponentielles Wachstum aufrechterhalten wird; Voraussetzung ist jedoch, dass ein Multiplikationsfaktor von mindestens 16 erreicht wird.

— Der mittlere Variationskoeffizient der abschnittsbezogenen spezifischen Wachstumsraten (Tage 0-1, 1-2 und 2-3 bei 72-stündigen Tests) der Kontrollkulturen (siehe Abschnitt 1.2 Absatz „Variationskoeffizient“) darf maximal 35 % betragen. Zur Berechnung der abschnittsbezogenen spezifischen Wachstumsrate sind die Hinweise in Abschnitt 2.2.1 Absatz 2 zu beachten. Dieses Kriterium gilt für den mittleren Variationskoeffizienten, der für zur Wiederholung verwendete Kontrollkulturen berechnet wurde.

— Der Variationskoeffizient der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten während der gesamten Testdauer darf bei den zur Wiederholung verwendeten Kontrollkulturen in Tests mit *Pseudokirchneriella subcapitata* und *Desmodesmus subspicatus* höchstens 7 % betragen. Bei weniger häufig in Tests verwendeten Arten sollte der Wert höchstens 10 % betragen.

1.8. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.8.1. **Apparatur**

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

Als Prüfgefäße kommen im Allgemeinen Glaskolben mit Abmessungen in Betracht, die während des Tests ein hinreichendes Kulturvolumen und einen hinreichenden $CO_2$-Transfer aus der Umgebungsluft gewährleisten (siehe Abschnitt 1.8.9 Absatz 2). Das Flüssigkeitsvolumen muss für analytische Bestimmungen hinreichend sein (siehe Abschnitt 1.8.11 Absatz 5).

Außerdem werden unter Umständen die folgenden Geräte benötigt:

— Kulturapparatur: Empfohlen werden ein Schrank oder eine Kammer, in dem bzw. in der die gewählte Inkubationstemperatur mit einer Toleranz von ± 2 °C aufrechterhalten werden kann.

— Lichtmessgeräte: Bei den Tests ist die Methode zur Messung der Lichtintensität zu protokollieren; insbesondere ist der für den Messwert maßgebliche Messkopftyp (Sensor) anzugeben. Die Messungen sollten vorzugsweise mit einem kugelförmigen (4 π)-Messkopf (der unmittelbar reagiert und Licht aus allen Winkeln über und unter der Messebene reflektiert) oder mit einem (2 π)-Messkopf gemessen werden (der auf Licht aus beliebigen Winkeln oberhalb der Geräteebene reagiert).

▼M1

— Apparatur zur Bestimmung der Biomasse der Algen: Der Zellgehalt als am häufigsten verwendeter Surrogatparameter für die Biomasse von Algen kann mit einem elektronischen Teilchenzähler, mit einem Mikroskop mit Zählkammer und mit einem Durchflusszytometer ermittelt werden. Weitere Surrogate für Biomassen können mit einem Durchflusszytometer, einem Fluorimeter, einem Spektrophotometer oder einem Farbmessgerät gemessen werden. Ein Umrechnungsfaktor, mit dem der Zellgehalt zum Trockengewicht in Beziehung gesetzt wird, kann Berechnungen erleichtern. Um mit einem Spektrophotometer verwertbare Messungen bei geringen Biomassekonzentrationen durchführen zu können, müssen unter Umständen Küvetten mit einem Strahlengang von mindestens 4 cm verwendet werden.

1.8.2. **Testorganismen**

Für die Tests können mehrere Arten frei treibender Mikroalgen und Cyanobakterien verwendet werden. Die in Anlage 1 genannten Stämme haben sich für das in dieser Prüfmethode beschriebene Testverfahren als geeignet erwiesen.

Wenn sonstige Arten verwendet werden, sollte der betreffende Stamm und/oder Ursprung angegeben werden. Außerdem ist sicherzustellen, dass das exponentielle Wachstum der ausgewählten Testalgen während der gesamten Testdauer unter den jeweiligen Bedingungen aufrechterhalten werden kann.

1.8.3. **Nährmedium**

Als Nährmedien werden wahlweise das OECD-Medium und das AAP-Medium empfohlen. Die Zusammensetzungen dieser Medien sind Anlage 2 zu entnehmen. Beide Medien haben unterschiedliche pH-Ausgangswerte und unterschiedliche Pufferkapazitäten (zur Regulierung des pH-Anstiegs). Daher können die Testergebnisse je nach verwendetem Medium unterschiedlich ausfallen; dies gilt insbesondere für die Prüfung ionisierender Substanzen.

Für bestimmte Zwecke muss unter Umständen das Nährmedium modifiziert werden (z. B. für die Prüfung von Metallen und Chelatbildnern oder für Prüfungen bei unterschiedlichen pH-Werten). Die Verwendung modifizierter Nährmedien ist im Einzelnen zu erläutern und zu begründen (3)(4).

1.8.4. **Biomasse-Ausgangskonzentration**

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

| | | |
|---|---|---|
| *Pseudokirchneriella subcapitata:* | $5 \times 10^3$-$10^4$ | Zellen/ml |
| *Desmodesmus subspicatus* | 2-5 $\times 10^3$ | Zellen/ml |
| *Navicula pelliculosa* | $10^4$ | Zellen/ml |
| *Anabaena flos-aquae* | $10^4$ | Zellen/ml |
| *Synechococcus leopoliensis* | $5 \times 10^4$-$10^5$ | Zellen/ml |

1.8.5. **Konzentrationen der Prüfsubstanz**

Der Konzentrationsbereich, in dem wahrscheinlich Auswirkungen auftreten, kann aufgrund von Tests zur Bestimmung des Konzentrationsbereichs ermittelt werden. Für den definitiven Test sollten mindestens fünf Konzentrationen in einer geometrischen Reihe mit einem Faktor von höchstens 3,2 ausgewählt werden. Bei Prüfsubstanzen mit einer flacheren Konzentrations-Reaktionskurve kann ein höherer Faktor gerechtfertigt sein. Die Konzentrationsreihen sollten vorzugsweise einen Bereich abdecken, in dem das Algenwachstum um 5-75 % gehemmt wird.

▼M1

1.8.6. **Wiederholungen und Kontrollen**

Das Prüfprotokoll sollte für jede Testkonzentration drei Wiederholungen vorsehen. Wenn die NOEC nicht bestimmt werden muss, kann das Prüfprotokoll dahingehend geändert werden, dass die Anzahl der Konzentrationen erhöht und die Anzahl der Wiederholungen verringert wird. Es müssen mindestens drei Kontrollwiederholungen durchgeführt werden, im Idealfall die doppelte Anzahl der Wiederholungen für jede Testkonzentration.

Für analytische Bestimmungen der Prüfsubstanzkonzentrationen kann eine eigene Reihe von Testlösungen hergestellt werden (siehe Abschnitt 1.8.11 Absätze 4 und 6).

Wenn zur Auflösung der Prüfsubstanz ein Lösungsmittel verwendet wird, sind in das Prüfprotokoll weitere Kontrollen mit dem Lösungsmittel in der Konzentration einzubeziehen, die auch in den Prüfkulturen verwendet wird.

1.8.7. **Herstellung der Impfkultur**

Um eine Anpassung der Testalgen an die Testbedingungen zu ermöglichen und um sicherzustellen, dass sich die Algen in der Phase des exponentiellen Wachstums befinden, wenn sie zur Impfung der Testlösungen verwendet werden, wird 2-4 Tage vor Testbeginn im Prüfmedium eine Impfkultur hergestellt. Die Algenbiomasse sollte so angepasst werden, dass ein exponentielles Wachstum der Impfkultur bis zum Testbeginn erfolgen kann. Die Impfkultur ist unter den gleichen Bedingungen wie die Prüfkulturen zu inkubieren. Die Zunahme der Biomasse der Impfkultur ist zu messen, um sicherzustellen, dass das Wachstum unter den gegebenen Kulturbedingungen für den jeweiligen Teststamm im normalen Bereich liegt. In Anlage 3 wird ein Beispiel für ein Verfahren zur Herstellung einer Algenkultur beschrieben. Um gleichzeitige Zellteilungen während des Tests zu vermeiden, kann unter Umständen ein zweiter Schritt zur Vermehrung der Impfkultur erforderlich sein.

1.8.8. **Herstellung der Testlösungen**

Alle Testlösungen müssen das Nährmedium und die Ausgangsbiomasse der Testalgen in denselben Konzentrationen enthalten. Die Testlösungen in den ausgewählten Konzentrationen werden gewöhnlich durch Mischen einer Stammlösung der Prüfsubstanz mit dem Nährmedium und der Impfkultur hergestellt. Stammlösungen werden im Allgemeinen durch Auflösung der betreffenden Substanz im Prüfmedium hergestellt.

Wenn Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit zum Prüfmedium hinzugegeben werden sollen, können Lösungsmittel (z. B. Aceton, t-Butyl-Alkohol und Dimethylformamid) als Träger verwendet werden (2)(3). Die Lösungsmittelkonzentration sollte höchstens 100 µl/l betragen, und für alle Kulturen der Testreihen (einschließlich der Kontrollkulturen) sollte die gleiche Konzentration verwendet werden.

1.8.9. **Inkubation**

Die Testgefäße sind mit luftdurchlässigen Stopfen zu versehen. Anschließend werden die Gefäße geschüttelt und in die Kulturapparatur gebracht. Während des Tests müssen die Algen suspendiert bleiben, und der $CO_2$-Transfer muss erleichtert werden. Dazu sollten die Gefäße ständig geschüttelt oder umgerührt werden. Die Temperatur der Kulturen sollte bei einer Toleranz von ± 2 °C ständig auf 21 bis 24 °C geregelt werden. Bei anderen als den in Anlage 1 genannten Arten (z. B. bei tropischen Arten) sind unter Umständen höhere Temperaturen angemessen, wenn die Validitätskriterien erfüllt sind. Es wird empfohlen, die Kolben zufällig verteilt und täglich neu in den Inkubator einzusetzen.

▼M1

Der pH-Wert des Kontrollmediums darf während des Tests höchstens um 1,5 Einheiten ansteigen. Bei Metallen und Verbindungen, die bei pH-Werten etwa im Bereich der im Test verwendeten pH-Werte teilweise ionisieren, muss die pH-Verschiebung möglicherweise begrenzt werden, um reproduzierbare und gut definierte Ergebnisse zu erhalten. Eine Verschiebung des pH-Werts um < 0,5 ist technisch möglich und kann hervorgerufen werden, um einen angemessenen $CO_2$-Transfer aus der Umgebungsluft in die Testlösung zu erzielen (z. B. durch stärkeres Schütteln). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verringerung des $CO_2$-Bedarfs durch Verringerung der Ausgangsbiomasse oder in einer Verkürzung der Testdauer.

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

1.8.10. **Testdauer**

Im Allgemeinen dauert der Test 72 Stunden. Allerdings sind auch kürzere oder längere Testzeiten möglich, sofern alle in Abschnitt 1.7 genannten Validitätskriterien eingehalten werden.

1.8.11. **Messungen und analytische Bestimmungen**

Die Algenbiomasse in den einzelnen Kolben wird während der Testdauer mindestens einmal täglich überprüft. Wenn die Messungen an kleinen Volumina vorgenommen werden, die aus der Testlösung pipettiert wurden, sollten die betreffenden Volumina nicht ersetzt werden.

Die Biomasse wird durch manuelle Zählung der Zellen unter dem Mikroskop oder mit einem elektronischen Teilchenzähler (Einstellung auf Zellgehalt und/oder Biovolumen) ermittelt. Alternative Verfahren wie z. B. die Messung mit einem Durchflusszytometer, in vitro und/oder in vivo durchgeführte Chlrorophyll-Fluoreszenzmessungen (6)(7), oder Messungen der optischen Dichte kommen in Betracht, wenn in dem für den jeweiligen Test maßgeblichen Biomassebereich eine befriedigende Korrelation mit der Biomasse nachgewiesen werden kann.

Der pH-Wert der Lösungen wird am Anfang und am Ende des Tests gemessen.

Wenn ein Analyseverfahren zur Bestimmung der Prüfsubstanz im maßgeblichen Konzentrationsbereich verfügbar ist, sollten die Testlösungen analysiert werden, um die Ausgangskonzentrationen und die Aufrechterhaltung der Expositionskonzentrationen während der Tests zu prüfen bzw. sicherzustellen.

▼M1

Die Analyse der Prüfsubstanzkonzentration am Anfang und am Ende des Tests bei einer niedrigen und einer hohen Testkonzentration sowie bei einer Konzentration im zu erwartenden $EC_{50}$-Bereich kann hinreichend sein, wenn anzunehmen ist, dass die Expositionskonzentrationen während des Tests um weniger als 20 % von den Nennwerten abweichen. Wenn die Konzentrationen eher nicht im Bereich von 80-120 % der Nennkonzentrationen bleiben werden, wird die Analyse sämtlicher Testkonzentrationen am Anfang und am Ende der Tests empfohlen. Bei flüchtigen, instabilen oder stark adsorbierenden Prüfsubstanzen werden während der Expositionsdauer weitere Probenahmen zur Durchführung von Analysen in Abständen von jeweils 24 Stunden empfohlen, um den Verlust der Prüfsubstanz besser bestimmen zu können. Bei diesen Substanzen werden zusätzliche Wiederholungen benötigt. In jedem Fall müssen die Prüfsubstanzkonzentrationen für alle Testkonzentrationen bei den Wiederholungen jeweils nur in einem Gefäß (bzw. in dem Gesamtinhalt aller Gefäße einer Wiederholung) bestimmt werden.

Ausdrücklich für die Analyse von Expositionskonzentrationen während der Testdauer hergestellte Prüfmedien sollten auf die gleiche Weise behandelt werden, wie die für die Tests verwendeten Medien, d. h. die Medien sollten mit Algen geimpft und unter identischen Bedingungen inkubiert werden. Wenn eine Analyse der gelösten Prüfsubstanz erforderlich ist, müssen die Algen unter Umständen vom Medium getrennt werden. Die Trennung sollte vorzugsweise durch Zentrifugierung mit niedriger Beschleunigungskraft erfolgen, die eben noch hinreichend für die Ausfällung der Algen ist.

Wenn nachgewiesen wird, dass die Konzentration der Prüfsubstanz während der gesamten Testdauer in befriedigender Weise im Bereich von ± 20 % der Nennkonzentration oder der gemessenen Ausgangskonzentration aufrechterhalten werden konnte, können die Ergebnisse auch ausgehend von den Nennwerten bzw. von den gemessenen Ausgangswerten analysiert werden. Wenn die Abweichung von der Nennkonzentration oder von der gemessenen Ausgangskonzentration mehr als ± 20 % beträgt, sollte bei der Analyse der Ergebnisse von der geometrischen mittleren Konzentration während der Expositionsdauer oder von Modellen ausgegangen werden, welche den Rückgang der Prüfsubstanzkonzentration beschreiben (3)(8).

Der Test zur Hemmung des Algenwachstum ist ein dynamischeres Prüfsystem als die meisten sonstigen aquatischen Toxizitätstests mit kürzerer Testdauer. Entsprechend sind die tatsächlichen Expositionskonzentrationen unter Umständen schwer zu bestimmen; dies gilt besonders für adsorbierende Substanzen, die bei niedrigen Konzentrationen getestet werden. In diesen Fällen bedeutet das Verschwinden der Substanz aus der Lösung infolge der Adsorption in die zunehmende Algenbiomasse nicht, dass das Testsystem die Substanz „verliert“. Bei der Analyse des Testergebnisses sollte geprüft werden, ob ein Rückgang der Prüfsubstanzkonzentration im Laufe des Tests mit einer Abnahme der Wachstumshemmung einhergeht. Wenn dies der Fall ist, kann der Einsatz eines geeigneten Modells zur Beschreibung des Rückgangs der Prüfsubstanzkonzentration (8) in Betracht gezogen werden. Ansonsten ist es unter Umständen nicht angemessen, bei der Analyse der Ergebnisse von den Ausgangskonzentrationen (Nennkonzentrationen oder gemessenen Konzentrationen) auszugehen.

1.8.12. **Sonstige Beobachtungen**

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

▼M1

1.8.13. **Limit-Test**

Unter gewissen Umständen, z. B. wenn ein vorläufiger Test darauf hindeutet, dass die Prüfsubstanz bei Konzentrationen bis zu 100 mg · $l^{-1}$ bzw. bis zur Löslichkeitsgrenze im Prüfmedium (maßgeblich ist die jeweils niedrigere Konzentration) keine toxische Wirkung hat, kann ein Limit-Test durchgeführt werden, in dem die Reaktionen einer Kontrollgruppe und einer Behandlungsgruppe (100 mg · $l^{-1}$ bzw. eine mit der Löslichkeitsgrenze identische Konzentration) verglichen werden. Es wird nachdrücklich empfohlen, diese Tests durch Analysen der Expositionskonzentration zu verifizieren. Alle oben beschriebenen Testbedingungen und Validitätskriterien gelten für Limit-Tests; allerdings sollten mindestens sechs Wiederholungen mit behandelten Proben durchgeführt werden. Die Reaktionsvariablen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe können mit einem statistischen Test zum Vergleich der Mittelwerte analysiert werden (z. B. mit einem Student-Test). Wenn die Varianzen der beiden Gruppen nicht übereinstimmen, sollte ein für nicht identische Varianzen angepasster t-Test (Student-Test) durchgeführt werden.

1.8.14. **Änderung für stark kolorierte Substanzen**

Die Bestrahlung (Lichtintensität) sollte im obersten Ende des bei dieser Testmethode vorgeschriebenen Bereichs liegen: 120μE $m^{-2}$ $s^{-1}$ oder höher.

Der Strahlengang sollte durch eine Verringerung des Volumens der Testlösungen (im Bereich von 5-25 ml) verkürzt werden.

Es sollte (z. B. durch mäßiges Schütteln) für ausreichende Bewegung gesorgt werden, um zu gewährleisten, dass die Algen häufig einer hohen Bestrahlung an der Oberfläche der Kultur exponiert sind.

2. **DATEN**

2.1. GRAFISCHE DARSTELLUNG DER WACHSTUMSKURVEN

Die in den Prüfgefäßen enthaltene Biomasse kann in Einheiten des für die Messung verwendeten Surrogatparameters ausgedrückt werden (z. B. als Zellgehalt oder Fluoreszenz).

Die geschätzte Biomassekonzentration der Prüfkulturen und der Kontrollkulturen ist zusammen mit den mindestens zu jeder vollen Stunde zu erfassenden Konzentrationen des Prüfmaterials und den Messzeitpunkten in Tabellen zusammenzustellen und für die Erstellung von Wachstumskurven zu verwenden. In diesem ersten Stadium können sowohl die logarithmischen Skalen als auch die linearen Skalen hilfreich sein; während der Testdauer sind jedoch die logarithmischen Skalen vorgeschrieben, die im Allgemeinen eine bessere Darstellung von Abweichungen der Wachstumsstrukturen ermöglichen. Bei exponentiellem Wachstum ergibt sich bezogen auf eine logarithmische Skala eine Gerade; die Steigung der Gerade gibt Aufschluss über die jeweilige Wachstumsrate.

Anhand der Darstellungen ist sicherzustellen, dass die Kontrollkulturen während der gesamten Testdauer tatsächlich mit der erwarteten Geschwindigkeit exponentiell wachsen. Alle Datenpunkte sowie die Darstellungen sind kritisch zu überprüfen, und Ausgangsdaten und Verfahren sind auf mögliche Fehler zu kontrollieren. Insbesondere sind alle Datenpunkte zu prüfen, die aufgrund eines systematischen Fehlers abzuweichen scheinen. Wenn Verfahrensfehler zweifelsfrei festgestellt und/oder als sehr wahrscheinlich betrachtet werden können, wird der betreffende Datenpunkt als Ausreißer gekennzeichnet und nicht in die anschließende statistische Analyse einbezogen. (Eine Algenkonzentration von null in einem der beiden bzw. der drei für die Wiederholungen verwendeten Gefäße kann darauf hindeuten, dass das Gefäß nicht ordnungsgemäß geimpft oder nicht angemessen gereinigt wurde.) Die Gründe für den Ausschluss eines als Ausreißer eingestuften Datenpunkts sind im Prüfbericht genau anzugeben. Als Begründungen werden ausschließlich (selten) Verfahrensfehler, nicht aber einfach ungenaue Messungen anerkannt. Statistische Verfahren zur Bestimmung von Ausreißern sind bei dieser Art von Problemen von begrenztem Nutzen und können die Beurteilung durch Fachleute nicht ersetzen. Ausreißer (die als solche gekennzeichnet wurden) sollten vorzugsweise in den Datenpunkten verbleiben, die später in grafischen oder tabellarischen Darstellungen verwendet werden.

▼M1

2.2. REAKTIONSVARIABLEN

Mit der Prüfung sollen die Auswirkungen der Prüfsubstanz auf das Algenwachstum bestimmt werden. Diese Prüfmethode beschreibt zwei Reaktionsvariablen, da in den Mitgliedsländern unterschiedliche Präferenzen und rechtliche Anforderungen bestehen. Damit die Testergebnisse in allen Mitgliedsländern anerkannt werden können, sollten die Auswirkungen mit Hilfe der beiden im Folgenden beschriebenen Reaktionsvariablen a) und b) beurteilt werden.

a) Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate: Diese Reaktionsvariable wird ausgehend von der täglichen logarithmischen Zunahme der Biomasse während der Testdauer berechnet.

b) Zellertrag: Diese Reaktionsvariable ergibt sich aus der Biomasse am Ende des Tests abzüglich der Biomasse bei Beginn des Tests.

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

2.2.1. **Durchschnittliche Wachstumsrate**

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

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

wobei

$\mu_{i-j}$: durchschnittliche spezifische Wachstumsrate zwischen Zeitpunkt $i$ und Zeitpunkt $j$;

$X_i$: Biomasse zum Zeitpunkt $i$;

$X_j$: Biomasse zum Zeitpunkt $j$.

▼M1

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

Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate wird über die gesamte Testdauer (im Allgemeinen Tage 0-3) berechnet; dabei ist eher als ein gemessener Ausgangswert die geimpfte Nennbiomasse als Ausgangswert anzunehmen, da mit diesem Wert gewöhnlich eine höhere Genauigkeit erzielt wird. Wenn die zur Messung der Biomasse verwendete Ausrüstung eine hinreichend genaue Bestimmung der Biomasse mit dem geringen Inokulum zulässt (z. B. ein Durchflusszytometer), kann die gemessene Konzentration der Ausgangsbiomasse angenommen werden. Außerdem ist während der gesamten Testdauer (Tage 0-1, 1-2 und 2-3) die abschnittsbezogene Wachstumsrate als tägliche spezifische Wachstumsrate zu ermitteln und zu prüfen, ob das Wachstum der Kontrollgruppe konstant bleibt (siehe Gültigkeitskriterien, Abschnitt 1.7). Eine spezifische Wachstumsrate, die an einem bestimmten Tag signifikant niedriger ist als die durchschnittliche spezifische Gesamtwachstumsrate, kann Anzeichen für eine „Lag"-Phase sein. Bei den Kontrollkulturen kann eine „Lag"-Phase minimiert und praktisch ausgeschlossen werden, wenn die Vorkultur in geeigneter Weise vermehrt wird; bei den behandelten Kulturen hingegen kann eine „Lag"-Phase Anzeichen für eine Erholung nach anfänglicher toxischer Belastung oder Anzeichen für eine geringere Belastung infolge eines Verlustes der Prüfsubstanz (u. a. durch Sorption in die Algenbiomasse) nach der anfänglichen Behandlung sein. Entsprechend kann die abschnittsbezogene Wachstumsrate bewertet werden, um die Auswirkungen der Prüfsubstanz während der Expositionsdauer zu beurteilen. Erhebliche Unterschiede zwischen der abschnittsbezogenen Wachstumsrate und der durchschnittlichen Wachstumsrate deuten auf Abweichungen vom konstanten exponentiellen Wachstum hin und erfordern eine genaue Überprüfung der Wachstumskurven.

Die prozentuale Hemmung der Wachstumsrate der einzelnen Wiederholungen mit behandelten Proben ist mit folgender Formel zu berechnen:

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

wobei

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

$\mu_C$: mittlere durchschnittliche spezifische Wachstumsrate ($\mu$) der Kontrollgruppe;

$\mu_T$: durchschnittliche spezifische Wachstumsrate der Wiederholung mit einer behandelten Probe.

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

2.2.2. **Zellertrag**

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

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼M1

wobei

$\%\ I_y$: prozentuale Hemmung des Zellertrags;

$Y_C$: mittlerer Zellertrag der Kontrollgruppe;

$Y_T$: Zellertrag der Wiederholung mit einer behandelten Probe.

2.3. GRAFISCHE DARSTELLUNG DER KONZENTRATIONS-REAKTIONSKURVE

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

— Die Daten sind nicht geeignet, durch rechnergestützte Methoden zuverlässigere Ergebnisse zu ermitteln als durch die Beurteilung von Fachleuten. In diesen Fällen werden mit manchen Computer-Programmen unter Umständen keinerlei zuverlässige Ergebnisse erzielt (Wiederholungen stimmen nicht überein usw.).

— Stimulierende Wachstumsreaktionen können mit verfügbaren Computer-Programmen nicht in angemessener Weise verarbeitet werden (siehe folgender Abschnitt).

2.4. STATISTISCHE VERFAHREN

Ziel ist die Ermittlung einer quantitativen Konzentrations-Reaktionsbeziehung durch Regressionsanalyse. Im Anschluss an eine linearisierte Transformation der Reaktionsdaten (z. B. in Einheiten nach dem Probit-, Logit- oder Weibull-Modell) (9) kann eine gewichtete lineare Regression vorgenommen werden; nicht-lineare Regressionsverfahren, mit denen die unvermeidlichen Unregelmäßigkeiten der Daten und Abweichungen von gleichförmigen Verteilungen besser verarbeitet werden können, werden jedoch bevorzugt. Gegen null bzw. gegen die vollständige Hemmung können diese Unregelmäßigkeiten durch die Transformation vergrößert werden und die Analyse beeinträchtigen (9). Es wird darauf hingewiesen, dass Standard-Analysmethoden mit Probit-, Logit- oder Weibull-Transformationen für quantitative Daten (z. B. Mortalität oder Überlebensraten) vorgesehen sind und zur Verwendung in Verbindung mit Wachstums- oder Biomassedaten entsprechend modifiziert werden müssen. Spezifische Verfahren zur Bestimmung von $EC_x$-Werten aus kontinuierlichen Daten sind den Quellen (10)(11) and (12) zu entnehmen. In Anlage 4 wird der Einsatz nicht-linearer Regressionsanalysen näher erläutert.

▼**M1**

Für jede zu analysierende Reaktionsvariable sind aufgrund der Konzentrations-Reaktionsbeziehung Punktschätzungen für die $EC_x$-Werte zu ermitteln. Nach Möglichkeit sollten für jede Schätzung die 95%-Konfidenzintervalle bestimmt werden. Die Qualität der Übereinstimmung der Reaktionsdaten mit dem Regressionsmodell sollte grafisch oder statistisch bewertet werden. Die Regressionsanalyse sollte mit den Reaktionen der einzelnen Wiederholungen (und nicht mit den Mittelwerten der Behandlungsgruppe) durchgeführt werden. Wenn eine nicht-lineare Kurvenanpassung jedoch schwierig oder wegen zu großer Streuung der Daten nicht möglich ist, kann die Regression auch bezogen auf die Mittelwerte der Gruppe vorgenommen werden, um so auf einfache Weise die Auswirkungen erwarteter Ausreißer zu reduzieren. Wenn von dieser Möglichkeit Gebrauch gemacht wird, sollte dies im Prüfbericht als Abweichung vom normalen Verfahren vermerkt und darauf hingewiesen werden, dass mit Kurvenanpassungen der einzelnen Wiederholungen kein befriedigendes Ergebnis erzielt wurde.

Schätzwerte für $EC_{50}$ und für die Konfidenzintervalle können auch durch lineare Interpolation mit einem Bootstrapping-Algorithmus (13) erzielt werden, wenn die verfügbaren Regressionsmodelle/-methoden für die betreffenden Daten nicht geeignet sind.

Um die LOEC und entsprechend die NOEC zu schätzen sowie um die Auswirkungen der Prüfsubstanzen auf die Wachstumsrate zu ermitteln, müssen die Mittelwerte der behandelten Proben mit 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 (14)(15)-(16)(17)(18). 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 (18). Geeignet sind Levene- und Bartlett-Tests. Wenn die Annahme der Varianzhomogenität nicht erfüllt ist, kann gelegentlich eine Korrektur durch logarithmische Datentransformation erfolgen. Bei außerordentlicher Varianzheterogenität, die durch Transformation nicht korrigiert werden kann, sollten Analysen durch Methoden wie z. B. Jonckheere-Trendtests (Stepdown) erwogen werden. Weitere Hinweise zur Bestimmung von NOEC-Werten sind Quelle (12) zu entnehmen.

Aufgrund neuer Forschungsergebnisse wird empfohlen, das Konzept der NOEC aufzugeben und durch Punktschätzungen von $EC_x$-Werten zu ersetzen, die durch Regression ermittelt wurden. Für diesen Algentest wurde noch kein geeigneter Wert für x definiert. Ein Bereich von 10 bis 20 % scheint geeignet (abhängig von der auswählten Reaktionsvariable); vorzugsweise sollten sowohl $EC_{10}$ als auch $EC_{20}$ protokolliert werden.

2.5. WACHSTUMSSTIMULATION

Gelegentlich wird bei niedrigen Konzentrationen eine Wachstumsstimulation (negative Hemmung) beobachtet. Diese Wachstumsstimulation kann entweder auf eine Hormesis („toxische Stimulation“) oder darauf zurückzuführen sein, dass im verwendeten Minimalmedium mit dem zu prüfenden Material zusätzliche stimulierende Wachstumsfaktoren zum Tragen kommen. Die Zugabe anorganischer Nährstoffe sollte keinerlei unmittelbare Auswirkungen haben, weil das Prüfmedium während der gesamten Testdauer ohnehin überschüssige Nährstoffe enthalten sollte. Eine Stimulation mit niedriger Dosierung kann bei Berechnungen von $EC_{50}$ gewöhnlich übergangen werden, wenn die Stimulation nicht ungewöhnlich stark ist. Bei ungewöhnlich starker Stimulation oder wenn ein $EC_x$-Wert für einen niedrigen x-Wert berechnet werden soll, sind möglicherweise jedoch besondere Verfahrensweisen erforderlich. Die Löschung von Stimulationsreaktionen aus der Datenanalyse sollte nach Möglichkeit vermieden werden, und wenn die verfügbare Software zur Kurvenanpassung nicht in der Lage ist, geringere Stimulationen zu verarbeiten, kann eine lineare Interpolation mit einem Bootstrapping-Algorithmus vorgenommen werden. Bei ungewöhnlich starker Stimulation kann der Einsatz eines Hormesis-Modells erwogen werden (19).

▼**M1**

2.6. NICHT TOXISCHE WACHSTUMSHEMMUNG

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

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfsubstanz:

— physikalische Beschaffenheit und maßgebliche physikalisch-chemische Merkmale einschließlich der Wasserlöslichkeitsgrenze;

— chemische Kenndaten einschließlich der Reinheit.

Im Test verwendete Art:

— Stamm, Lieferant oder Herkunft und Kulturbedingungen.

Prüfbedingungen:

— Datum des Testbeginns und Dauer des Tests;

— Beschreibung des Prüfprotokolls: Prüfgefäße, Kulturvolumina, Biomassedichte am Beginn des Tests;

— Zusammensetzung des Mediums;

— Testkonzentrationen und Wiederholungen (z. B. Anzahl der Wiederholungen, Anzahl der Testkonzentrationen und verwendete geometrische Progression);

— Beschreibung der Herstellung der Testlösungen, einschließlich Verwendung von Lösungsmitteln usw.;

— Kulturapparatur;

— Lichtintensität und Qualität (Herkunft, Homogenität);

— Temperatur;

— getestete Konzentrationen: nominale Testkonzentrationen sowie alle Ergebnisse der Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz in den Prüfgefäßen; außerdem sollten die mit der Methode erzielte Wiederfindungsrate und die Quantifizierungsgrenze der Testmatrix angegeben werden;

— sämtliche Abweichungen von dieser Prüfmethode;

— Methode zur Bestimmung der Biomasse und Anzeichen für eine Korrelation zwischen dem gemessenen Parameter und dem Trockengewicht;

Ergebnisse:

— pH-Werte am Beginn und am Ende des Tests bei allen Behandlungen;

— Biomasse der einzelnen Kolben an allen Messpunkten und Methode zur Messung der Biomasse;

▼**M1**

— Wachstumskurven (grafische Darstellung der Biomasse in einem bestimmten Zeitraum);

— berechnete Reaktionsvariablen für alle behandelten Wiederholungen mit Mittelwerten und dem Variationskoeffizienten für Wiederholungen;

— grafische Darstellung der Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung;

— Schätzungen der Toxizität für die Reaktionsvariablen (z. B. $EC_{50}$, $EC_{10}$, $EC_{20}$) sowie entsprechende Konfidenzintervalle; wenn berechnet, sind die LOEC und die NOEC sowie die zur jeweiligen Berechnung verwendeten statistischen Methoden anzugeben;

— bei Durchführung von Varianzanalysen (ANOVA) der Umfang der nachzuweisenden Auswirkungen (z. B. geringster signifikanter Unterschied);

— jegliche in behandelten Proben festgestellte Wachstumsstimulation;

— alle sonstigen beobachteten Auswirkungen (z. B. morphologische Änderungen der Algen);

— Diskussion der Ergebnisse einschließlich aller Auswirkungen auf das Testergebnis, die auf Abweichungen von dieser Prüfmethode zurückzuführen sind.

4. **LITERATUR**

1. OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

2. ISO 1998: Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.

3. OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

4. ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

5. ISO 1993: Water quality — Algal growth inhibition test. ISO 8692.

6. Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31, S. 2525-2531.

7. Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), S. 919-925.

8. Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, S. 2073-2079.

9. Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, S. 713-718.

▼M1

10. Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, S. 157-167.

11. Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11, S. 1485-1494.

12. OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

13. Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

14. Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50, S. 1096-1121.

15. Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

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

17. Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, S. 510-531.

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

19. Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research 29, S. 93-96.

▼M1

*Anlage 1*

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

**Grünalgen**

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

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

**Kieselalgen**

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

**Cyanobakterien**

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

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

**Herkunft der Stämme**

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

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110-2209

USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology,

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Amblerside

Cumbria

LA22 0LP

UK

SAG: Sammlung Algenkulturen

Pflanzenphysiologisches Institut

Universität Göttingen

Nikolausberger Weg 18

3400 Göttingen

DEUTSCHLAND

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

the University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

USA

▼M1

**Aussehen und Merkmale der empfohlenen Arten**

| | *P. subcapitata* | *D. subspicatus* | *N. pelliculosa* | *A. flos-aquae* | *S. leopoliensis* |
|---|---|---|---|---|---|
| Aussehen | Gekrümmte und gedrehte einzelne Zellen | Oval, meist einzelne Zellen | Stäbchen | Ketten ovaler Zellen | Stäbchen |
| Größe (L × B) µm | 8-14 × 2-3 | 7-15 × 3-12 | 7,1 × 3,7 | 4,5 × 3 | 6 × 1 |
| Zellvolumen (µm3/Zelle) | 40-60 ([1]) | 60-80 ([1]) | 40-50 ([1]) | 30-40 ([1]) | 2,5 ([2]) |
| Zelltrockengewicht (mg/Zelle) | 2-3 × $10^{-8}$ | 3-4 × $10^{-8}$ | 3-4 × $10^{-8}$ | 1-2 × $10^{-8}$ | 2-3 × $10^{-9}$ |
| Wachstumsrate ([3]) ($Tag^{-1}$) | 1,5-1,7 | 1,2-1,5 | 1,4 | 1,1-1,4 | 2,0-2,4 |

([1]) Gemessen mit einem elektronischen Teilchenzähler.
([2]) Aus der Größe berechnet.
([3]) Am häufigsten beobachtete Wachstumsrate im OECD-Medium bei einer Lichtintensität von ca. 70 µE · $m^{-2}$ · $s^{-1}$ und einer Temperatur von 21 °C.

**Spezifische Empfehlungen zur Kultivierung und zur Handhabung der für den Test empfohlenen Arten**

*Pseudokirchneriella subcapitata* und *Desmodesmus subspicatus*

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

*Anabaena flos-aquae*

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

*Synechococcus leopoliensis*

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

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

*Navicula pelliculosa*

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

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

▼**M1**

*Anlage 2*

**Nährmedien**

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

OECD-Medium: Originalmedium gemäß OECD TG 201 sowie gemäß ISO 8692

US. EPA-Medium AAP, auch gemäß ASTM.

Bei der Herstellung dieser Medien sollten chemische Stoffe in Reagenzien- oder Analysequalität und entionisiertes Wasser verwendet werden.

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

| Bestandteil | EPA | | OECD | |
|---|---|---|---|---|
| | mg/l | mM | mg/l | mM |
| $NaHCO_3$ | 15,0 | 0,179 | 50,0 | 0,595 |
| $NaNO_3$ | 25,5 | 0,300 | | |
| $NH_4Cl$ | | | 15,0 | 0,280 |
| $MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$ | 12,16 | 0,0598 | 12,0 | 0,0590 |
| $CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$ | 4,41 | 0,0300 | 18,0 | 0,122 |
| $MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$ | 14,6 | 0,0592 | 15,0 | 0,0609 |
| $K_2HPO_4$ | 1,044 | 0,00599 | | |
| $KH_2PO_4$ | | | 1,60 | 0,00919 |
| $FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$ | 0,160 | 0,000591 | 0,0640 | 0,000237 |
| $Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$ | 0,300 | 0,000806 | 0,100 | 0,000269 (*) |
| $H_3BO_3$ | 0,186 | 0,00300 | 0,185 | 0,00299 |
| $MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$ | 0,415 | 0,00201 | 0,415 | 0,00210 |
| $ZnCl_2$ | 0,00327 | 0,000024 | 0,00300 | 0,0000220 |
| $CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$ | 0,00143 | 0,000006 | 0,00150 | 0,00000630 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$ | 0,00726 | 0,000030 | 0,00700 | 0,0000289 |
| $CuCl_2.2(H_2O)$ | 0,000012 | 0,00000007 | 0,00001 | 0,00000006 |
| pH | 7,5 | | 8,1 | |

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

Im Test mit der Kieselalge Navicula pelliculosa sind beide Medien mit $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ aufzufüllen, bis eine Konzentration von 1,4 mg Si/l erreicht ist.

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

$$PH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼M1

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

**Stoffliche Zusammensetzung des Prüfmediums**

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

**Herstellung des OECD-Mediums**

| Nährstoff | Konzentration in der Stammlösung |
|---|---|
| Stammlösung 1: Makronährstoffe | |
| $NH_4Cl$ | 1,5 $g \cdot l^{-1}$ |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1,2 $g \cdot l^{-1}$ |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 1,8 $g \cdot l^{-1}$ |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1,5 $g \cdot l^{-1}$ |
| $KH_2PO_4$ | 0,16 $g \cdot l^{-1}$ |
| Stammlösung 2: Eisen | |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 64 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 100 $mg \cdot l^{-1}$ |
| Stammlösung 3: Spurenelemente | |
| $H_3BO_3$ | 185 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 415 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $ZnCl_2$ | 3 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1,5 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,01 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 7 $mg \cdot l^{-1}$ |
| Stammlösung 4: Bicarbonat | |
| $NaHCO_3$ | 50 $g \cdot l^{-1}$ |
| $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ | |

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

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

▼M1

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

Zu 500 ml sterilisiertem Wasser werden folgende Mengen hinzugegeben:

— 10 ml Stammlösung 1

— 1 ml Stammlösung 2

— 1 ml Stammlösung 3

— 1 ml Stammlösung 4

Anschließend wird sterilisiertes Wasser bis zu einem Volumen von 1 000 ml hinzugegeben.

Danach muss hinreichend Zeit zur Herstellung eines Gleichgewichts zwischen dem Medium und dem $CO_2$-Gehalt der Umgebungsluft belassen werden; wenn erforderlich, ist das Nährmedium einige Stunden mit steriler gefilterter Luft zu sprudeln.

**Herstellung des AAP-Mediums**

A1.1. Von den Stammlösungen aus A1.2.1–A1.2.7 ist jeweils 1 ml zu etwa 900 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser hinzuzugeben; anschließend wird die Flüssigkeit bis zu einem Volumen von 1 l aufgefüllt.

A1.2. Stammlösungen mit Makronährstoffen werden hergestellt, indem die folgenden Stoffmengen jeweils zu 500 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser hinzugegeben werden. Die Reagenzien A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 und A1.2.4 können zu einer einzigen Stammlösung kombiniert werden.

A1.2.1. $NaNO_3$ — 12,750 g.

A1.2.2. $MgCL_2 \cdot 6H_2O$ — 6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 2,205 g.

A1.2.4. *Micronutrient Stock Solution* — (siehe A1.3).

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 7,350 g.

A1.2.6. $K_2HPO_4$ — 0,522 g.

A1.2.7. $NaHCO_3$ — 7,500 g.

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ — Siehe Hinweis A1.1.

*Hinweis A1.1*: Ausschließlich für im Test eingesetzte Kieselalgen-Arten zu verwenden; kann unmittelbar (202,4 mg) hinzugegeben oder mittelbar durch Auffüllen mit einer Stammlösung bis zum Erreichen einer Endkonzentration von 20 mg/l Si im Medium hinzugegeben werden.

A1.3. Die Mikronährstoff-Lösung wird hergestellt, indem folgende Mengen in 500 ml entionisiertem oder destilliertem Wasser aufgelöst werden:

A1.3.1. $H_3BO_3$ — 92,760 mg.

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ — 207,690 mg.

A1.3.3. $ZnCl_2$ — 1,635 mg.

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ — 79,880 mg.

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ — 0,714 mg.

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 3,630 mg.

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,006 mg.

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ — 150,000 mg.

[Dinatrium(ethylendinitril)tetraacetat]

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ — 0,005 mg Siehe Hinweis A1.2.

*Hinweis A1.2*: Darf ausschließlich im Medium für Stammkulturen mit Kieselalgen-Arten verwendet werden.

A1.4. Der pH-Wert ist auf 7,5 ± 0,1 einzustellen (mit 0,1 N oder 1,0 N NaOH oder HCl).

A1.5. Wenn ein Teilchenzähler verwendet werden soll, wird das Medium durch einen 0,22-µm-Membranfilter in ein steriles Gefäß gefiltert; ansonsten erfolgt die Filtration in ein steriles Gefäß durch einen 0,45-µm-Filter.

A1.6. Das Medium ist bis zur Verwendung bei einer Temperatur von etwa 4 °C dunkel zu lagern.

▼M1

*Anlage 3*

**Beispiel eines Verfahrens zur Kultivierung der Algen**

**Allgemeine Bemerkungen**

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

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

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

**Ausrüstung und Materialien**

Siehe Prüfmethode: Apparatur.

**Verfahren zur Herstellung von Algenkulturen**

*Herstellung der Nährlösungen (Medien)*

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

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

*Stammkultur*

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

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

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

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

*Vorkultur*

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

▼M1

*Anlage 4*

**Datenanalyse durch nicht-lineare Regression**

**Allgemeine Bemerkungen**

In den Algentests und in sonstigen Tests zur Ermittlung des mikrobiologischen Wachstums — des Wachstums einer Biomasse — stellt die Reaktion naturgemäß eine kontinuierliche oder metrische Variable dar: eine Prozessrate, wenn von einer Wachstumsrate ausgegangen wird, und ein zeitbezogenes Integral, wenn die Biomasse zugrunde gelegt wird. Beide Parameter werden auf die entsprechende mittlere Reaktion von zur Wiederholung verwendeten nicht behandelten Kontrollproben bezogen, die am stärksten auf die jeweils gegebenen Bedingungen reagieren; bei Algentests sind Licht und Temperatur die Hauptfaktoren. Das System kann verteilt oder homogen sein, und die Biomasse kann als kontinuierlicher Parameter betrachtet werden; einzelne Zellen brauchen nicht berücksichtigt zu werden. Die Varianzverteilung des Reaktionstyps dieser Systeme hängt ausschließlich von den Versuchsbedingungen ab (die in der Regel durch logarithmisch-normale oder normale Fehlerverteilungen gekennzeichnet sind). In dieser Hinsicht besteht ein Unterschied gegenüber typischen Reaktionen in Bioassays mit quantitativen Daten, bei denen die Toleranz (typischerweise mit binomischer Verteilung) der einzelnen Organismen häufig als maßgebliche Varianzkomponente betrachtet wird. Die Kontrollreaktionen liegen hier bei Null oder im Bereich des Hintergrundwerts.

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

**Regressionsanalyse**

*Modelle*

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

Der Einsatz kontinuierlicher Schwellenwert-Funktionsmodelle (z. B. des Kooijman-Modells der „Hemmung des Populationswachstums“ (Kooijman u. a. 1996) wurde kürzlich als Alternative zu asymptotischen Modellen vorgeschlagen. Dieses Modell geht davon aus, dass bei Konzentrationen unter einem bestimmten Schwellenwert EC0+ keine Auswirkungen mehr gegeben sind; dieser Schwellenwert wird mit Hilfe einer einfachen kontinuierlichen Funktion mit undifferenziertem Ausgangspunkt durch Extrapolation der Reaktions-Konzentrationsbeziehung so geschätzt, dass die Konzentrationsachse geschnitten wird.

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

▼M1

*Verfahren*

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

Die angepasste Kurve und die gemessenen Daten werden grafisch dargestellt; anschließend ist zu prüfen, ob die Kurve in angemessener Weise angepasst wurde. Eine Analyse der Restwerte könnte für diesen Zweck besonders hilfreich sein. Wenn die gewählte Funktionsbeziehung zur Anpassung der Konzentrations-Reaktionskurve die Kurve nicht vollständig beschreibt oder einen wesentlichen Teil der Kurve wie z. B. die Reaktion bei niedrigen Konzentrationen nicht gut beschreibt, ist eine andere Option zur Kurvenanpassung zu wählen (z. B. eine nicht symmetrische Kurve wie etwa die Weibull-Funktion anstelle einer symmetrischen Kurve). Negative Hemmungen können z. B. in Verbindung mit der logarithmischen Normalverteilung problematisch sein und ebenfalls den Einsatz einer alternativen Regressionsfunktion erfordern. Es wird nicht empfohlen, diesen negativen Werten einen Wert von Null oder einen kleinen positiven Wert zuzuweisen, weil ansonsten die Fehlerverteilung beeinträchtigt werden könnte. Angemessen sind unter Umständen getrennte Kurvenanpassungen für bestimmte Bereiche der Kurve (z. B. für den Bereich mit der niedrigen Hemmung, wenn $EC_{low\ x}$-Werte geschätzt werden sollen). Aus der angepassten Formel sind (mit der Umkehrfunktion $C = f^{-1}(Y)$) charakteristische Schätzwerte für $EC_x$ zu ermitteln und mindestens für $EC_{50}$ sowie für einen oder zwei Werte von $EC_{low\ x}$ zu protokollieren. Praktische Erfahrungen haben gezeigt, dass die Genauigkeit der Algentests im Allgemeinen eine angemessen exakte Schätzung der Konzentration bei einer Hemmung von etwa 10 % ermöglicht, wenn hinreichende Datenpunkte verfügbar sind (sofern nicht eine Unregelmäßigkeit in Form einer Stimulation auch bei niedrigen Konzentrationen gegeben ist). Die Genauigkeit einer $EC_{20}$-Schätzung ist häufig beträchtlich größer als die Genauigkeit geschätzter $EC_{10}$-Werte, weil die $EC_{20}$-Werte gewöhnlich im annähernd linearen Bereich der zentralen Konzentrations-Reaktionskurve vorgenommen werden. Gelegentlich ist die Beurteilung von $EC_{10}$-Werten wegen der Wachstumsstimulation problematisch. Werte für $EC_{10}$ sind also im Allgemeinen mit hinreichender Genauigkeit zu erhalten; in jedem Fall empfiehlt sich jedoch, auch die $EC_{20}$-Werte zu erfassen.

*Gewichtungsfaktoren*

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

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

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

*Normalisierung der Reaktionen*

Die Normalisierung durch die mittlere Kontrollreaktion bringt einige grundsätzliche Probleme mit sich und bedingt eine eher komplizierte Varianzstruktur. Mit der Division der Reaktionen durch die mittlere Kontrollreaktion zur Ermittlung der prozentualen Hemmung wird ein weiterer Fehler eingeführt, der auf den in den Mittelwerten der Kontrollen enthaltenen Fehler zurückzuführen ist. Wenn dieser Fehler nicht vernachlässigbar gering ist, sind Gewichtungsfaktoren in Verbindung mit der Regression und mit den Konfidenzintervallen bezogen auf die Kovarianz der Kontrollen zu korrigieren (17). Eine hohe Genauigkeit der geschätzten Mittelwerte der Kontrollreaktionen ist wichtig, um die Gesamtvarianz der relativen Reaktion zu minimieren. Diese Varianz lässt sich wie folgt beschreiben.

▼M1

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

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

bei gegebener Varianz:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \quad (\partial Y_i/\partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

entsprechend gilt

$$(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0 \text{ und } (\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$$

bei normal verteilten Daten und $m_i$ und $m_0$ Wiederholungen:

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

für die Gesamtvarianz der relativen Reaktion $Y_i$ gilt somit:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\, m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\, m_0$$

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

*Umkehrung der Konfidenzintervalle*

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

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

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

**Literatur**

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

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

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

▼B

## C.4. BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — BESTIMMUNG DER „LEICHTEN“ BIOLOGISCHEN ABBAUBARKEIT

### TEIL I. ALLGEMEINES

#### I.1. EINLEITUNG

Es werden sechs Prüfverfahren als „Screening“-Untersuchungen zur leichten biologischen Abbaubarkeit von chemischen Substanzen in einem aeroben wässrigen Medium beschrieben:

a) DOC-Die-Away-Test — Abnahme von gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC) ([1]) (Methode C.4-A);

b) modifizierter OECD-Screening-Test — Abnahme von gelöstem organischem Kohlenstoff (Methode C.4-B);

c) $CO_2$-Entwicklungstest (modifizierter Sturm-Test) (Methode C.4-C);

d) manometrischer Respirationstest (Methode C.4-D);

e) geschlossener Flaschentest (Methode C.4-E);

f) MITI-Test (Ministry of International Trade and Industry — Japan) (Methode C.4-F).

Teil I der Methode enthält allgemeine Überlegungen sowie Anmerkungen, die für alle sechs Prüfverfahren gelten. Spezielle Ausführungen zu den einzelnen Prüfverfahren werden in den Teilen II bis VII gemacht. Die Anlagen enthalten Definitionen, Formeln und Übersichtsmaterial.

Ein im Jahr 1988 im Bereich der OECD-Länder durchgeführter Ring-Test hat ergeben, dass mit den Prüfverfahren übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden. Dennoch wird im Einzelfall, je nach den physikalischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, das eine oder das andere Verfahren vorzuziehen sein.

#### I.2. AUSWAHL DES GEEIGNETEN VERFAHRENS

Um das geeignetste Verfahren auszuwählen, sind Angaben über die Löslichkeit, den Dampfdruck und die Adsorption der chemischen Substanz erforderlich. Zur Berechnung der theoretischen Werte und/oder zur Kontrolle der gemessenen Parameter (z. B. ThSB, $ThCO_2$, DOC, TOC, CSB — siehe Anlagen 1 und 2) müssen chemische Struktur oder Formel bekannt sein.

Prüfsubstanzen, die mindestens 100 mg/l wasserlöslich sind, können mit jedem beliebigen der genannten Verfahren geprüft werden, sofern sie nicht flüchtig und nicht adsorbierend sind. Geeignete Verfahren für schwer wasserlösliche, flüchtige oder adsorbierende chemische Substanzen sind in Tabelle 1 angegeben. Der Umgang mit schwer wasserlöslichen und flüchtigen Substanzen ist in Anlage 3 beschrieben. Mäßig flüchtige Substanzen lassen sich nach dem DOC-Die-Away-Test prüfen, wenn die Prüfgefäße (die mit einem geeigneten Stopfen verschlossen sein müssen) über ausreichenden Gasraum verfügen. In diesem Fall ist hier eine abiotische Kontrolle vorzusehen, um mögliche physikalische Verluste zu berücksichtigen.

([1]) DOC = dissolved organic carbon.

▼B

*Tabelle 1*

**Anwendbarkeit der Prüfverfahren**

| Verfahren | Analysenmethode | Eignung für folgende Substanzen: | | |
|---|---|---|---|---|
| | | löslich | flüchtig | adsorbierend |
| DOC-Die-Away-Test | Gelöster organischer Kohlstoff | — | — | +/– |
| Modifizierter OECD-Screening-Test | Gelöster organischer Kohlstoff | — | — | +/– |
| $CO_2$-Entwicklungstest | Respirationstest: $CO_2$-Entwicklung | + | — | + |
| Manometrischer Respirationstest | Manometrische Messung: Sauerstoffverbrauch | + | +/– | + |
| Geschlossener Flaschentest | Respirationstest: Sauerstoffverbrauch | +/– | + | + |
| MITI-Test | Respirationstest: Sauerstoffverbrauch | + | +/– | + |

Zur Interpretation der erzielten Ergebnisse sind Angaben zur Reinheit oder zu den relativen Anteilen der Hauptbestandteile der Prüfsubstanz erforderlich, insbesondere wenn es sich um niedrige oder marginale Werte handelt.

Angaben zur Bakterientoxizität der Prüfsubstanz (Anlage 4) können bei der Wahl geeigneter Prüfkonzentrationen zweckdienlich und bei der richtigen Interpretation geringer biologischer Abbauwerte wichtig sein.

I.3. REFERENZSUBSTANZEN

Zur Überprüfung des Verfahrens werden Referenzsubstanzen getestet, die die Kriterien für eine leichte biologische Abbaubarkeit erfüllen; dazu wird ein geeignetes Prüfgefäß parallel zur normalen Prüfreihe mitgeführt.

Geeignete Chemikalien sind Anilin (frisch destilliert), Natriumacetat und Natriumbenzoat. Diese Referenzsubstanzen werden bei diesen Verfahren durchweg abgebaut, auch wenn kein Inokulum hinzugefügt wird.

Es ist vorgeschlagen worden, dass eine Referenzsubstanz gesucht werden sollte, die biologisch leicht abgebaut wird, aber die Zugabe eines Inokulums erfordert. Als eine solche Substanz wurde Kaliumhydrogenphthalat vorgeschlagen, doch steht ein entsprechender Nachweis noch aus, bevor es als Referenzsubstanz akzeptiert werden kann.

Bei den Respirationstests können stickstoffhaltige Verbindungen die Sauerstoffaufnahme infolge Nitrifikation beeinflussen (siehe Anlagen 2 und 5).

I.4. PRINZIP DER METHODE

Eine Lösung oder Suspension der Prüfsubstanz in einem mineralischen Medium wird unter aeroben Bedingungen im Dunkeln oder bei diffuser Beleuchtung angeimpft und bebrütet. Die DOC-Menge in der Prüflösung, die aus dem Inokulum stammt, muss im Vergleich zu der DOC-Menge aus der Prüfsubstanz so gering wie möglich sein. Die endogene Aktivität des Inokulums wird durch Mitfuhren paralleler Blindproben mit Inokulum aber ohne Prüfsubstanz in der Lösung berücksichtigt, obwohl die endogene Aktivität der Zellen in Gegenwart der Substanz nicht genau dieselbe sein wird wie in der endogenen Kontrolle. Eine Referenzsubstanz wird parallel dazu eingesetzt, um den Verlauf der Vorgänge zu kontrollieren.

▼B

Im Allgemeinen wird der Abbau durch Bestimmung von Parametern (z. B. DOC-Abnahme, $CO_2$-Erzeugung und Sauerstoffaufnahme) ermittelt; entsprechende Messungen werden in ausreichenden Abständen vorgenommen, um Beginn und Ende des Bioabbaus zu identifizieren. Automatische Respirometer gestatten eine fortlaufende Messung. Mitunter wird der DOC-Wert zusätzlich zu einem weiteren Parameter gemessen, im Allgemeinen aber nur zu Beginn und am Ende des Tests. Zur Beurteilung des Primärabbaus der Prüfsubstanz und zur Bestimmung der Konzentration eventueller Abbauprodukte können auch spezifische Analysen durchgeführt werden. (Beim MITI-Test sind diese obligatorisch).

Normalerweise beträgt die Testdauer 28 Tage. Die Tests können jedoch auch vorzeitig abgebrochen werden, wenn die biologische Abbaukurve über mindestens drei Messungen ein Plateau erreicht hat. Eine Verlängerung der Tests über 28 Tage hinaus ist ebenfalls möglich, wenn aus der Kurve zu ersehen ist, dass der biologische Abbau eingesetzt hat, das Plateau aber am 28. Tag noch nicht erreicht ist.

## I.5. QUALITÄTSKRITERIEN

### I.5.1. **Reproduzierbarkeit**

Wegen der Spezifität des biologischen Abbaus und der als Inokula verwendeten Bakterienmischpopulationen sind die Messungen mindestens in doppelten Ansätzen durchzuführen.

Es ist allgemein bekannt, dass die Unterschiede zwischen Doppelmessungen umso kleiner sind, je größer die Konzentration der dem Prüfmedium anfänglich hinzugefügten Mikroorganismen war. Ringtests haben auch gezeigt, dass zwischen den in verschiedenen Prüfeinrichtungen erzielten Ergebnissen große Unterschiede bestehen können, doch wird normalerweise eine gute Übereinstimmung erreicht, wenn biologisch leicht abbaubare Substanzen verwendet werden.

### I.5.2. **Gültigkeit des Versuchs**

Ein Versuch wird dann als gültig angesehen, wenn die Extremwerte der Wiederholungsmessungen für die Abnahme der Prüfsubstanz nicht mehr als 20 % voneinander abweichen, am Plateau, Testende oder am Ende des 10-Tage-Fensters, und wenn der prozentuale Abbau der Referenzsubstanz das Plateau für leichte biologische Abbaubarkeit innerhalb von 14 Tagen erreicht hat. Ist eine der beiden Bedingungen nicht erfüllt, sollte der Versuch wiederholt werden. Auf Grund der Stringenz der Methoden bedeuten niedrige Ergebnisse nicht unbedingt, dass die Prüfsubstanz unter Umweltbedingungen biologisch nicht abbaubar ist, sondern zeigt nur, dass weitere Untersuchungen erforderlich sind, um einen biologischen Abbau nachzuweisen.

Wenn in einem Toxizitätstest mit Prüf- und Referenzsubstanz innerhalb von 14 Tagen weniger als 35 % Abbau (auf DOC-Basis) bzw. weniger als 25 % (auf der Basis des ThSB oder $ThCO_2$) erzielt wurde, kann von einer Hemmwirkung der Prüfsubstanz ausgegangen werden (vgl. auch Anlage 4). Die Versuchsreihe sollte in diesem Fall wiederholt werden, wenn möglich unter Verwendung einer geringeren Konzentration der Prüfsubstanz und/oder einer höheren Konzentration des Inokulums, jedoch nicht mehr als 30 mg Feststoffe pro Liter.

## I.6. ALLGEMEINE VERFAHREN UND VORBEREITUNGEN

Die allgemeinen Prüfbedingungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Geräte und weitere Versuchsbedingungen speziell zu den Einzeltests werden gesondert in den entsprechenden Kapiteln zu den einzelnen Prüfverfahren angegeben.

▼B

*Tabelle 2*

**Prüfbedingungen**

| Prüfverfahren | DOC-Die-Away-Test | $CO_2$ Entwicklungstest | Manometr. Respirationstest | Mod. OECD-Screening-Test | Geschlossener Flaschentest | MITI-(I)-Test |
|---|---|---|---|---|---|---|
| in mg/l | | | 100 | | 2-10 | 100 |
| mg DOC/l | 10-40 | 10-20 | | 10-40 | | |
| ThSB/l | | | 50-100 | | 5-10 | |
| Konzentration des Inokulums (in Zellen/l, ungefährer Wert) | höchstens 30 mg/l SF oder höchstens 100 ml Kläranlagenablauf pro 1 ($10^7$-$10^8$) | | | 0,5 ml Kläranlagenablauf pro 1 ($10^5$) | bis zu 5 ml Kläranlagenablauf pro 1 ($10^4$-$10^6$) | 30 mg/l SF ($10^7$-$10^8$) |
| Konzentration der Elemente im mineral. Medium (in mg/l): | | | | | | |
| P | 116 | | | | 11,6 | 29 |
| N | 1,3 | | | | 0,13 | 1,3 |
| Na | 86 | | | | 8,6 | 17,2 |
| K | 122 | | | | 12,2 | 36,5 |
| Mg | 2,2 | | | | 2,2 | 6,6 |
| Ca | 9,9 | | | | 9,9 | 29,7 |
| Fe | 0,05 - 0,1 | | | | 0,05 - 0,1 | 0,15 |
| pH | 7,4 ± 0,2 | | | | | nach Möglichkeit 7,0 |
| Temperatur | 22 ± 2 °C | | | | | 25 ± 1 °C |

DOC = gelöster organischer Kohlenstoff (Dissolved Organic Carbon). ThSB = Theoretischer Sauerstoffbedarf. SF = suspendierte Feststoffe.

I.6.1. **Verdünnungswasser**

Deionisiertes oder destilliertes Wasser, frei von toxischen Substanzen (z. B. $Cu^{++}$-Ionen) in hemmenden Konzentrationen, wird verwendet. Es darf nicht mehr als 10 % des von der Prüfsubstanz eingebrachten organischen Kohlenstoffs enthalten. Die hohe Reinheit des Prüfwassers ist zur Vermeidung hoher Blindwerte erforderlich. Eine Kontamination kann sich aus inhärenten Verunreinigungen sowie aus dem Ionenaustauscherharz und Materialien aus Bakterien und Algen ergeben. Für jede Versuchsreihe ist nur eine Charge Wasser zu verwenden, die vorher durch DOC-Analyse zu prüfen ist. Diese Prüfung ist nicht nötig im Closed-Bottle-Test, aber der Sauerstoffverbrauch des Wassers muss gering sein.

▼B

I.6.2. **Stammlösungen von mineralischen Bestandteilen**

Zur Herstellung der Prüflösungen werden Stammlösungen mit geeigneten Konzentrationen an mineralischen Bestandteilen angesetzt. Für den DOC-Die-Away-Test, den modifizierten OECD-Screening-Test, den $CO_2$-Enwicklungstest, den manometrischen Respirationstest und den geschlossenen Flaschentest können folgende Stammlösungen (mit unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren) verwendet werden.

Die Verdünnungsfaktoren und — beim MITI-Test — die spezielle Vorbereitung des mineralischen Mediums werden jeweils in den entsprechenden Kapiteln zu den einzelnen Versuchen angegeben.

*Stammlösungen:*

Die folgenden Stammlösungen sind unter Verwendung von Reagenzien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ (p. a.) anzusetzen:

| | | |
|---|---|---|
| a) | Kaliumdihydrogenorthophosphat, $KH_2PO_4$ | 8,50 g |
| | Dikaliummonohydrogenorthophosphat, $K_2HPO_4$ | 21,75 g |
| | Dinatriummonohydrogenorthophosphat-Dihydrat, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ | 33,40 g |
| | Ammoniumchlorid, $NH_4Cl$ | 0,50 g |
| | in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt; der pH-Wert der Lösung sollte 7,4 betragen. | |
| b) | Calciumchlorid, wasserfrei, $CaCl_2$ | 27,50 g |
| | oder Calciumchlorid-Dihydrat, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 36,40 g |
| | in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt | |
| c) | Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 22,50 g |
| | in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt | |
| d) | Eisen(III)chlorid-Hexahydrat, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0,25 g |
| | in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt | |

*Anmerkung*: Damit diese Lösung nicht unmittelbar vor Gebrauch zubereitet werden muss, ist 1 Tropfen konzentriertes HCl oder 0,4 g Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pro Liter zuzufügen.

I.6.3. **Stammlösungen der Chemikalien**

Liegt die Löslichkeit über 1 g/l, sind je nach Notwendigkeit 1-10 g der Prüf- oder Referenzsubstanz in deionisiertem Wasser zu lösen und auf 1 l aufzufüllen. Ansonsten sind die Stammlösungen im mineralischen Medium anzusetzen, oder die Prüfsubstanz wird direkt dem mineralischen Medium zugegeben. Die Vorgehensweise für schwerlösliche Substanzen ist in Anlage 3 angegeben; beim MITI-Test (Methode C.4-F) jedoch sind weder Lösungsmittel noch Emulgatoren zu verwenden.

▼B

I.6.4. **Inokula**

Das Inokulum kann aus verschiedenen Quellen gewonnen werden: aus Belebtschlamm, aus Kläranlagenablauf (nicht chloriert), aus Oberflächenwasser, aus Böden oder aus mehreren dieser Quellen zugleich. Bei den Methoden DOC-Die-Away-Test, $CO_2$-Entwicklungstest oder manometrischer Respirationstest, sollte der Belebtschlamm, falls dieser verwendet wird, einer Klärgroß- oder -laboranlage entstammen, die hauptsächlich häusliche Abwässer reinigt. Bei Inokula aus anderen Quellen sind stärker streuende Ergebnisse festgestellt worden. Beim modifizierten OECD-Screening-Test und beim geschlossenen Flaschentest ist ein stärker verdünntes Inokulum ohne Schlammflocken erforderlich, vorzugsweise aus dem Ablauf einer kommunalen Kläranlage oder einer Laboranlage für häusliche Abwässer. Beim MITI-Test wird das Inokulum aus einer Kombination verschiedener Quellen gewonnen — siehe Beschreibung im entsprechenden Kapitel.

I.6.4.1. *Inokulum aus Belebtschlamm*

Eine Belebtschlammprobe ist dem Belüftungstank einer Kläranlage oder einer Laboranlage, die hauptsächlich häusliche Abwässer reinigt, frisch zu entnehmen. Falls erforderlich, sind grobe Partikel durch Filtration durch ein feinmaschiges Sieb zu entfernen; danach ist der Schlamm aerob zu halten.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, den Schlamm nach Abtrennung grober Partikel absitzen zu lassen oder zu zentrifugieren (z. B. 10 Min. bei 1 100 g). Der Überstand wird verworfen und der Schlamm kann im mineralischen Medium gewaschen werden. Der konzentrierte Schlamm wird in einem mineralischen Medium suspendiert, um eine Konzentration von 3-5 g suspendierte Feststoffe pro Liter zu erhalten. Anschließend wird bis zur Verwendung belüftet.

Der Schlamm sollte von einer gut arbeitenden konventionellen Anlage genommen werden. Wenn Schlamm aus einer Abwasserkläranlage verwendet werden muss, der vermutlich Substanzen mit hemmender Wirkung enthält, ist er zu waschen. Dazu lässt man den resuspendierten Schlamm nach gründlichem Durchmischen absitzen oder zentrifugiert ihn, verwirft anschließend den Überstand und suspendiert den gewaschenen Schlamm in einem weiteren Volumen mineralischen Mediums erneut. Diese Schritte sind so lange zu wiederholen, bis der Schlamm als frei von übermäßigem Substrat oder Hemmsubstanz angesehen wird.

Nach vollständiger Resuspension oder bei unbehandeltem Schlamm ist unmittelbar vor Gebrauch das Trockengewicht der suspendierten Feststoffe zu bestimmen.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Homogenisierung von Belebtschlamm (3-5 g suspendierte Feststoffe pro Liter). Dazu wird der Schlamm 2 Min. bei mittlerer Geschwindigkeit in einer mechanischen Mischvorrichtung durchmischt. Danach lässt man den durchmischten Schlamm 30 Min., wenn erforderlich länger, absitzen und dekantiert die als Inokulum verwendete Flüssigkeit mit einer Geschwindigkeit von 10 ml pro Liter mineralischen Mediums.

I.6.4.2. *Andere Quellen für das Inokulum*

Dieses lässt sich aus dem Ablauf einer Kläranlage oder einer Laboranlage für überwiegend häusliche Abwässer gewinnen. Dazu ist eine frische Probe zu entnehmen und während des Transports aerob zu halten. Zum Absetzen wird die Probe eine Stunde stehen gelassen oder durch einen grobporigen Papierfilter filtriert und der dekantierte Ablauf (bzw. das Filtrat) bis zum Gebrauch aerob gehalten. Bis zu 100 ml diesen Inokulumtyps kann pro Liter Medium verwendet werden.

▼B

Als weitere Inokulumquelle dient Oberflächenwasser. In diesem Fall ist von einem geeigneten Oberflächenwasser (z. B. Fluss, See) eine Probe zu entnehmen und diese bis zum Gebrauch aerob zu halten. Falls erforderlich, wird das Inokulum durch Filtration oder Zentrifugieren konzentriert.

I.6.5. **Vorbereitung der Inokula**

Die Inokula können an die Versuchsbedingungen, nicht aber an die Prüfsubstanz adaptiert werden. Die entsprechende Konditionierung besteht in der Belüftung des Belebtschlamms im mineralischen Medium oder des Kläranlagenablaufs über eine Dauer von 5-7 Tagen bei der Prüftemperatur. Die Konditionierung verbessert mitunter die Präzision der Prüfmethoden durch eine Absenkung der Blindwerte. Eine Vorbereitung des MITI-Inokulums wird als nicht erforderlich angesehen.

I.6.6. **Abiotische Kontrollen**

Sofern erforderlich, sollte der mögliche abiotische Abbau der Prüfsubstanz durch Bestimmung der DOC-Abnahme, der Sauerstoffaufnahme oder der Kohlendioxidentwicklung in sterilen Kontrollen ohne Inokulum geprüft werden. Die Sterilisierung ist durch Membranfiltration (0,2 - 0,45 μm) oder durch Hinzufügen von einer geeigneten toxischen Substanz in entsprechender Konzentration vorzunehmen. Wenn Membranfiltration verwendet wird, muss die Probenahme aseptisch erfolgen, um sterile Bedingungen zu wahren. Unter der Voraussetzung, dass die Adsorption der Prüfsubstanz nicht von vornherein ausgeschlossen werden kann, müssen Prüfungen auf der Grundlage der Messung von DOC-Abnahme, insbesondere bei Belebtschlamm-Inokula, eine abiotische Kontrolle beinhalten, die beimpft und vergiftet wurde.

I.6.7. **Anzahl der Flaschen**

Die Anzahl der Flaschen in einem typischen Ansatz wird in den Kapiteln zu jedem Test beschrieben.

Die folgenden Flaschen sollten verwendet werden:

— Prüfsuspension: enthält Prüfsubstanz und Inokulum

— Inokulum-Blindwert: enthält nur Inokulum

— Verfahrenskontrolle: enthält Referenzsubstanz und Inokulum

— Abiotische Sterilkontrolle: steril, enthält nur Prüfsubstanz (siehe I.6.6)

— Adsorptionskontrolle: enthält Prüfsubstanz, Inokulum und Sterilisierungsmittel

— Toxizitätskontrolle: enthält Prüfsubstanz, Referenzsubstanz und Inokulum

Die Bestimmung der Prüfsuspension und des Inokulum-Blindwerts muss unbedingt parallel durchgeführt werden. Die Bestimmungen der anderen Flaschen sollten ebenfalls parallel durchgeführt werden.

Dies ist eventuell nicht immer möglich. Es sollte sichergestellt sein, dass ausreichend Proben genommen oder Ablesungen vorgenommen werden, um die prozentuale Abnahme innerhalb des auszuwertenden „10-Tage-Fensters“ zu beurteilen.

▼B

I.7. DATEN UND AUSWERTUNG

Zur Berechnung von $D_t$ (prozentualer Abbau) werden die Mittelwerte der Wiederholungsmessung der Summenparameter in beiden Prüfgefäßen und im Inokulum-Blindversuch verwendet. Die Formeln sind nachstehend in den jeweiligen Kapiteln angegeben. Der Verlauf des Abbaus wird grafisch dargestellt, und das 10-Tage-Fenster markiert. Die am Ende des 10-Tage-Fensters erreichte prozentuale Abnahme und der bei Erreichen des Plateaus bzw. bei Testende (je nach dem konkreten Fall) erzielte Wert sind zu berechnen und anzugeben.

In den respirometrischen Tests können stickstoffhaltige Substanzen den Sauerstoffverbrauch infolge Nitrifikation beeinträchtigen (vgl. Anlagen 2 und 5).

I.7.1. **Messung des Abbaus mittels DOC-Bestimmung**

Der prozentuale Abbau ($D_t$) sollte für die Flaschen mit Prüfsubstanz zu jeder Probenahme-Zeit getrennt berechnet werden, wobei Mittelwerte der beiden DOC-Messungen verwendet werden, um die Validität der Prüfungen beurteilen zu können (siehe I.5.2). Er wird wie folgt berechnet:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

Hierin bedeuten:

$D_t$ = prozentualer Abbau zum Zeitpunkt t

$C_o$ = mittlere DOC-Anfangskonzentration im angeimpften Kulturmedium mit der Prüfsubstanz (mg DOC/l)

$C_t$ = mittlere DOC-Konzentration im angeimpften Kulturmedium mit der Prüfsubstanz zum Zeitpunkt t (mg DOC/l)

$C_{bo}$ = mittlere DOC-Anfangskonzentration des Blindwerts im angeimpften mineralischen Medium (mg DOC/l)

$C_{bt}$ = mittlere DOC-Konzentration des Blindwerts im angeimpften mineralischen Medium zum Zeitpunkt t (mg DOC/l)

Sämtliche Konzentrationen werden experimentell bestimmt.

I.7.2. **Messung des Abbaus mittels spezifischer Analytik**

Liegen Daten aus einer spezifischen Analyse vor, ist der biologische Primärabbau wie folgt zu berechnen:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Hierin bedeuten:

$D_t$ = prozentualer Abbau zum Zeitpunkt t, in der Regel nach 28 Tagen

$S_a$ = Restmenge an Prüfsubstanz im angeimpften Medium bei Versuchsende (mg)

$S_b$ = Restmenge an Prüfsubstanz im Blindversuch mit Wasser/Medium, zu dem nur die Prüfsubstanz hinzugefügt wurde (mg)

▼B

I.7.3. **Abiotischer Abbau**

Bei abiotischer Sterilkontrolle wird der prozentuale abiotische Abbau wie folgt berechnet:

$$\% \text{ abiotischer Abbau} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

wobei:

$C_{s(o)}$ = DOC-Konzentration in Sterilkontrolle am Tag 0

$C_{s(t)}$ = DOC-Konzentration in Sterilkontrolle am Tag t

I.8. ABSCHLUSSBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— Prüf- und Referenzsubstanz und deren jeweiligen Reinheitsgrad;

— Versuchsbedingungen;

— Inokulum: Beschaffenheit und Herkunft, Konzentration und evtl. Vorbehandlung (Konditionierung);

— Anteil und Beschaffenheit der in den Abwässern enthaltenen Industrie-Abwässer (soweit bekannt);

— Versuchsdauer und -temperatur;

— bei schwerlöslichen Prüfsubstanzen: vorgenommene Behandlung;

— angewendetes Prüfverfahren; sämtliche Abweichungen hiervon sind wissenschaftlich zu begründen;

— Datenblatt;

— möglicherweise beobachtete Hemmwirkungen;

— ein möglicherweise beobachteter abiotischer Abbau;

— Daten aus spezifischer Analyse (falls vorhanden);

— Analysenwerte bezüglich Zwischenprodukte, wenn vorhanden;

— die Kurve des prozentualen Abbaus, aufgetragen gegen die Zeit, für Prüf- und Referenzsubstanz; die „lag"-Phase, die Abbauphase, das 10-Tage-Fenster und die Steigung sind klar anzugeben (Anlage 1). Wenn der Test mit den Validitätskriterien übereinstimmt, sollte der Mittelwert der Abbauprozente der Flaschen mit Prüfsubstanz für die Auftragung verwendet werden;

— der prozentuale Abbau nach dem 10-Tage-Fenster sowie auf dem Plateau oder zu Versuchsende.

TEIL II: **DOC-DIE-AWAY-TEST — ABNAHME VON GELÖSTEM ORGANISCHEM KOHLENSTOFF (DOC)** (Methode C.4-A)

II.1. PRINZIP DER METHODE

Ein definiertes Volumen des angeimpften mineralischen Mediums mit einer bekannten Konzentration der Prüfsubstanz (10-40 mg DOC/l) als einziger nomineller Quelle organischen Kohlenstoffs wird im Dunkeln oder bei diffuser Beleuchtung bei 22 ± 2 ºC belüftet.

▼B

Der Abbau wird mittels DOC-Analyse über einen Zeitraum von 28 Tagen in kurzen Zeitabständen verfolgt. Der Grad des biologischen Abbaus wird durch die Abnahme der DOC-Konzentration (nach Berücksichtigung des Inokulum-Blindwerts) in % der Ausgangskonzentration berechnet. Der Grad des biologischen Primärabbaus lässt sich aus der ergänzenden chemischen Analyse errechnen, die zu Beginn und am Ende der Inkubation vorgenommen wird.

II.2. BESCHREIBUNG DER METHODE

II.2.1. **Geräte**

a) Konische Flaschen, z. B. 250 ml bis 2 l, je nach dem für die DOC-Analyse benötigten Volumen

b) Schüttelmaschine zur Aufnahme der konischen Flaschen, die entweder mit einem Thermostaten ausgestattet oder in einem klimatisierten Raum aufgestellt ist und so ausgelegt sein muss, dass aerobe Bedingungen in allen Flaschen aufrechterhalten werden

c) Filtrationsgerät mit geeigneten Membranen

d) DOC-Analysator

e) Gerät zur Bestimmung von gelöstem Sauerstoff

f) Zentrifuge

II.2.2. **Ansatz des mineralischen Mediums**

Zubereitung der Stammlösung siehe I.6.2.

10 ml Lösung (a) mit 800 ml Verdünnungswasser mischen, 1 ml der Lösungen (b) bis (d) hinzugeben und mit Verdünnungswasser auf 1 l auffüllen.

II.2.3. **Ansatz und Vorbereitung des Inokulums**

Das Inokulum kann aus verschiedenen Quellen gewonnen werden: aus Belebtschlamm, aus Kläranlagenablauf, aus Oberflächenwasser, aus Böden oder aus mehreren dieser Quellen zugleich.

Vgl. I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 und I.6.5.

II.2.4. **Ansatz der Flaschen**

Beispiel: Jeweils 800 ml des mineralischen Mediums werden in konische 2-l-Flaschen gegeben, dazu wird in jeweils separate Ansätzen ein ausreichendes Volumen Stammlösung der Prüf- und der Referenzsubstanz gegeben, um ein DOC-Äquivalent von 10-40 mg/l zu erhalten. Der pH-Wert sollte überprüft und wenn nötig auf 7,4 eingestellt werden. Die Flaschen werden mit Belebtschlamm oder einem Inokulum anderer Herkunft (vgl. I.6.4) beimpft, um eine Endkonzentration nicht über 30 mg suspendierter Feststoffe pro Liter zu erhalten. Daneben werden Inokulum-Kontrollen im mineralischen Medium ohne Prüf- oder Referenzsubstanz angesetzt.

Falls erforderlich, ist ein Gefäß zur Kontrolle der möglichen Hemmwirkung der Prüfsubstanz zu verwenden; dazu ist eine Lösung mit vergleichbaren Konzentrationen sowohl der Prüf- als auch der Referenzsubstanz im mineralischen Medium anzuimpfen.

Falls erforderlich, ist eine weitere, sterile Flasche anzusetzen, um zu prüfen, ob die Prüfsubstanz abiotisch abgebaut wird; dazu ist eine nicht angeimpfte Lösung dieser Substanz zu verwenden (vgl. I.6.6).

▼B

Wenn vermutet werden muss, dass die Prüfsubstanz signifikant am Glas oder am Schlamm usw. adsorbiert wird, ist eine Vorprüfung vorzunehmen, mit der das Ausmaß der Adsorption und damit die Eignung des Versuchs für die Prüfsubstanz bestimmt werden (vgl. Tabelle 1). Ansetzen einer Flasche mit Prüfsubstanz, Inokulum und Sterilisiermittel.

Alle Flaschen mit dem mineralischen Medium auf 1 l auffüllen, mischen und anschließend von jeder Flasche eine Probe zwecks Bestimmung der DOC-Ausgangskonzentration entnehmen (vgl. Anlage 2.4). Öffnungen der Flaschen so abdecken, z. B. mit Aluminiumfolie, dass ein freier Luftaustausch zwischen der Flasche und der Umgebungsluft möglich bleibt. Danach die Flaschen in die Schüttelmaschine stellen und mit dem Versuch beginnen.

II.2.5. **Anzahl der Flaschen in einem typischen Durchgang**

Flaschen 1 und 2: Prüfsuspension

Flaschen 3 und 4: Inokulum-Blindwert

Flasche 5: Verfahrenskontrolle

Empfohlen und falls notwendig:

Flasche 6: abiotische Sterilkontrolle

Flasche 7: Adsorptionskontrolle

Flasche 8: Toxizitätskontrolle

Vgl. I.6.7.

II.2.6. **Durchführung der Prüfung**

Während des Versuchs sind die DOC-Konzentrationen in jeder Flasche in bestimmten Zeitabständen doppelt zu bestimmen, und zwar so häufig, dass der Beginn des 10-Tage-Fensters und die prozentuale Abnahme am Ende des 10-Tage-Fensters bestimmt werden können. Dabei ist pro Messung nur die Mindestmenge an Prüfsuspension zu entnehmen.

Vor der Probeentnahme sind die Verdampfungsverluste aus den Flaschen, falls erforderlich, durch Zufügen von Verdünnungswasser auszugleichen (I.6.1). Der Versuchsansatz ist vor Entnahme einer Probe gründlich zu durchmischen, wobei sicherzustellen ist, dass an den Wänden der Flaschen anhaftendes Material vor der Probenahme gelöst oder suspendiert wird. Unmittelbar nach der Probenahme ist zu filtrieren (Membranfilter) oder zu zentrifugieren (vgl. Anlage 2.4). Die filtrierten oder zentrifugierten Proben sind noch am selben Tag zu analysieren; ansonsten können sie bei 2-4 °C für maximal 48 h bzw. bei unter — 18 °C über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.

II.3. DATEN UND ABSCHLUSSBERICHT

II.3.1. **Auswertung der Ergebnisse**

Der prozentuale Abbau zum Zeitpunkt t ist entsprechend I.7.1 (DOC-Bestimmung) sowie wahlweise entsprechend I.7.2 (spezifische Analyse) zu berechnen.

Sämtliche Ergebnisse sind auf den dafür vorgesehenen Datenblättern zu protokollieren.

▼B

II.3.2. **Gültigkeit der Ergebnisse**

Vgl. I.5.2.

II.3.3. **Abschlussbericht**

Vgl. I.8.

II.4. DATENBLATT

Nachstehend ein Beispiel eines Datenblattes.

DOC-DIE-AWAY-TEST

1. **LABOR**

2. **DATUM BEI VERSUCHSBEGINN**

3. **PRÜFSUSBSTANZ**

Name:

Konzentration der Stammlösung: ... mg/l auf Substanz bezogen

Anfangskonzentration im Medium, $t_0$: ... mg/l auf Substanz bezogen

4. **INOKULUM**

Herkunft: ...

Vorgenommene Behandlung: ...

Vorbereitung/Konditionierung (soweit zutreffend): ...

Konzentration der suspendierten Feststoffe im Reaktionsgemisch: ... mg/l

5. **KOHLENSTOFFBESTIMMUNGEN**

Kohlenstoffanalysator: ...

| | Flasche Nr. | | DOC nach n Tagen (mg/l) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Testsubstanz plus Inokulum | 1 | $a_1$ | | | | | |
| | | $a_2$ | | | | | |
| | | a, Mittelwert $C_{a(t)}$ | | | | | |
| | 2 | $b_1$ | | | | | |
| | | $b_2$ | | | | | |
| | | b, Mittelwert $C_{b(t)}$ | | | | | |

▼B

| | Flasche Nr. | | DOC nach n Tagen (mg/l) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Inokulum-Blindversuch ohne Testsubstanz | 3 | $c_1$ | | | | | |
| | | $c_2$ | | | | | |
| | | c, Mittelwert $C_{c(t)}$ | | | | | |
| | 4 | $d_1$ | | | | | |
| | | $d_2$ | | | | | |
| | | d, Mittelwert $C_{d(t)}$ | | | | | |
| | $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | | | |

6. **AUSWERTUNG DER ROHDATEN**

| Flasche Nr. | | % Abbau nach n Tagen | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| 1 | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| 2 | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| Mittel (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) Bei erheblichem Unterschied sollten $D_1$ und $D_2$ nicht gemittelt werden.

*Anmerkung*: Für die Referenz und die Toxizitätskontrolle können ähnliche Formblätter verwendet werden.

7. **ABIOTISCHE KONTROLLE** (wahlweise)

| | Zeit (Tage) | |
|---|---|---|
| | 0 | t |
| DOC-Konzentration (mg/l) in Sterilkontrolle | $C_{s(o)}$ | $C_{s(t)}$ |

$$\% \text{ abiotischer Abbau} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPEZIFISCHE ANALYSE** (wahlweise)

| | Bei Versuchsende verbliebene Menge an Prüfsubstanz (mg/l) | % Primärabbau |
|---|---|---|
| Sterilkontrolle | $S_b$ | |

▼B

| | Bei Versuchsende verbliebene Menge an Prüfsubstanz (mg/l) | % Primärabbau |
|---|---|---|
| Beimpftes Prüfmedium | $S_a$ | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

TEIL III. **MODIFIZIERTER OECD-SCREENING-TEST** (Methode C.4-B)

III.1. PRINZIP DER METHODE

Ein definiertes Volumen des mineralischen Mediums mit einer bekannten Konzentration der Prüfsubstanz (10-40 mg/l DOC) als einziger nomineller Quelle organischen.Kohlenstoffs wird mit 0,5 ml Kläranlagenablauf pro Liter Medium angeimpft und im Dunkeln oder bei diffuser Beleuchtung bei 22 ± 2 °C belüftet.

Der Abbau wird mittels DOC-Analyse über einen Zeitraum von 28 Tagen in kurzen Zeitabständen verfolgt. Der Grad des biologischen Abbaus wird durch die Abnahme der DOC-Konzentration (nach Berücksichtigung des Inokulum-Blindwerts) in % der Ausgangskonzentration berechnet. Der Grad des biologischen Primärabbaus lässt sich auch aus der ergänzenden chemischen Analyse errechnen, die zu Beginn und am Ende der Inkubation vorgenommen wird.

III.2. BESCHREIBUNG DER METHODE

III.2.1. Geräte

a) Konische Flaschen, z. B. 250 ml bis 2 l, je nach dem für die DOC-Analyse benötigten Volumen

b) Schüttelmaschine zur Aufnahme der konischen Flaschen, die entweder mit einem Thermostaten ausgestattet oder in einem klimatisierten Raum aufgestellt ist und so ausgelegt sein muss, dass aerobe Bedingungen in allen Flaschen aufrechterhalten werden

c) Filtrationsgerät mit geeigneten Membranen

d) DOC-Analysator

e) Gerät zur Bestimmung von gelöstem Sauerstoff

f) Zentrifuge

III.2.2. **Ansatz des mineralischen Mediums**

Zubereitung der Stammlösung siehe I.6.2.

10 ml Lösung (a) mit 800 ml Verdünnungswasser mischen, 1 ml der Lösungen (b) bis (d) hinzugeben und mit Verdünnungswasser auf 1 l auffüllen.

Bei diesem Verfahren werden nur 0,5 ml Kläranlagenablauf pro Liter als Inokulum verwendet, so dass das Medium möglicherweise mit Spurenelementen und Wachstumsfaktoren angereichert werden muss. Zu diesem Zweck wird von den folgenden Lösungen jeweils 1 ml pro Liter endgültigem Medium zugefügt.

▼B

Lösung der Spurenelemente:

| | |
|---|---|
| Mangansulfat-Tetrahydrat, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ | 39,9 mg |
| Borsäure, $H_3BO_3$ | 57,2 mg |
| Zinksulfat-Heptahydrat, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 42,8 mg |
| Ammoniumheptamolybdat, $(NH_4)_6 \cdot Mo_7O_{24}$ | 34,7 mg |
| Fe-Chelat ($FeCl_3$ Ethylendiamintetraessigsäure) | 100,0 mg |
| in Verdünnungswasser gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. | |
| Vitaminlösung: | |
| Hefeextrakt | 15,0 mg |

in 100 ml Wasser gelöst und durch Membranfilter mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert bzw. frisch zubereitet.

III.2.3. **Ansatz und Vorbereitung des Inokulums**

Das Inokulum ist von Abläufen einer Kläranlage oder Anlage im Labormaßstab, denen vorwiegend häusliche Abwässer zugeführt werden, zu entnehmen. Vgl. I.6.4.2 und I.6.5.

0,5 ml pro Liter mineralisches Medium sind zu verwenden.

III.2.4. **Ansatz der Flaschen**

Beispiel: Jeweils 800 ml mineralischen Mediums werden in konische 2-l-Flaschen gegeben, dazu wird in jeweils separaten Ansätzen ein ausreichendes Volumen Stammlösung der Prüf- und der Referenzsubstanz gegeben, um ein DOC-Äquivalent von 10-40 mg/l zu erhalten. Der pH-Wert sollte überprüft und wenn nötig auf 7,4 eingestellt werden. Die Flaschen werden mit 0,5 ml Kläranlagenablauf pro Liter beimpft (vgl. I.6.4.2). Daneben werden Inokulum-Kontrollen im mineralischen Medium ohne Prüf- oder Referenzsubstanz angesetzt.

Falls erforderlich, ist ein Gefäß zur Kontrolle der möglichen Hemmwirkung der Prüfsubstanz zu verwenden; dazu ist eine Lösung mit vergleichbaren Konzentrationen sowohl der Prüf- als auch der Referenzsubstanz im mineralischen Medium anzuimpfen.

Falls erforderlich, ist eine weitere, sterile Flasche anzusetzen, um zu prüfen, ob die Prüfsubstanz abiotisch abgebaut wird; dazu ist eine nicht angeimpfte Lösung dieser Substanz zu verwenden (vgl. I.6.6).

Wenn vermutet werden muss, dass die Prüfsubstanz signifikant am Glas oder am Schlamm usw. adsorbiert wird, ist eine Vorprüfung vorzunehmen, mit der das Ausmaß der Adsorption und damit die Eignung des Versuchs für die Prüfsubstanz bestimmt werden (vgl. Tabelle 1). Ansetzen einer Flasche mit Prüfsubstanz, Inokulum und Sterilisiermittel.

Alle Flaschen mit dem mineralischen Medium auf 1 l auffüllen, mischen, und anschließend von jeder Flasche eine Probe zwecks Bestimmung der DOC-Ausgangskonzentration entnehmen (vgl. Anlage 2.4). Öffnungen der Flaschen so abdecken, z. B. mit Aluminiumfolie, dass ein freier Luftaustausch zwischen der Flasche und der Umgebungsluft möglich bleibt. Danach die Flaschen in die Schüttelmaschine stellen und mit dem Versuch beginnen.

▼B

III.2.5. **Anzahl der Flaschen in einem typischen Durchgang**

Flaschen 1 und 2: Prüfsuspension

Flaschen 3 und 4: Inokulum-Blindwert

Flasche 5: Verfahrenskontrolle

Empfohlen und falls notwendig:

Flasche 6: abiotische Sterilkontrolle

Flasche 7: Adsorptionskontrolle

Flasche 8: Toxizitätskontrolle

Vgl. I.6.7.

III.2.6. **Durchführung der Prüfung**

Während des Versuchs sind die DOC-Konzentrationen in jeder Flasche in bestimmten Zeitabständen doppelt zu bestimmen, und zwar so häufig, dass der Beginn des 10-Tage-Fensters und die prozentuale Abnahme am Ende des 10-Tage-Fensters bestimmt werden können. Dabei ist pro Messung nur die Mindestmenge an Prüfsuspension zu entnehmen.

Vor der Probeentnahme sind die Verdampfungsverluste aus den Flaschen, falls erforderlich, durch Zufügen von Verdünnungswasser auszugleichen (I.6.1.). Der Versuchsansatz ist vor Entnahme einer Probe gründlich zu durchmischen, wobei sicherzustellen ist, dass an den Wänden der Flaschen anhaftendes Material vor der Probenahme gelöst oder suspendiert wird. Unmittelbar nach der Probenahme ist zu filtrieren (Membranfilter) oder zu zentrifugieren (vgl. Anlage 2.4). Die filtrierten oder zentrifugierten Proben sind noch am selben Tag zu analysieren; ansonsten können sie bei 2-4 °C für maximal 48 h bzw. bei unter — 18 °C über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.

III.3. DATEN UND ABSCHLUSSBERICHT

III.3.1. **Auswertung der Ergebnisse**

Der prozentuale Abbau zum Zeitpunkt t ist entsprechend I.7.1 (DOC-Bestimmung) sowie wahlweise entsprechend I.7.2. (spezifische Analyse) zu berechnen.

Sämtliche Ergebnisse sind auf den dafür vorgesehenen Datenblättern zu protokollieren.

III.3.2. Gültigkeit der Ergebnisse

Vgl. I.5.2.

III.3.3. Prüfbericht

Vgl. I.8.

III.4. DATENBLATT

Nachstehend ein Beispiel eines Datenblattes.

MODIFIZIERTER OECD-SCREENING-TEST

1. **LABOR**

2. **DATUM BEI VERSUCHSBEGINN**

▼B

3. **PRÜFSUSBSTANZ**

Name: …

Konzentration der Stammlösung: ... mg/l auf Substanz bezogen

Anfangskonzentration im Medium, $t_0$: ... mg/l auf Substanz bezogen

4. **INOKULUM**

Herkunft: ...

Vorgenommene Behandlung: ...

Vorbereitung/Konditionierung (soweit zutreffend): ...

Konzentration der suspendierten Feststoffe im Reaktionsgemisch: ... mg/l

5. **KOHLENSTOFFBESTIMMUNGEN**

Kohlenstoffanalysator: ...

| | Flasche Nr. | | DOC nach n Tagen (mg/l) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Testsubstanz plus Inokulum | 1 | $a_1$ | | | | | |
| | | $a_2$ | | | | | |
| | | a, Mittelwert $C_{a(t)}$ | | | | | |
| | 2 | $b_1$ | | | | | |
| | | $b_2$ | | | | | |
| | | b, Mittelwert $C_{b(t)}$ | | | | | |
| Inokulum-Blindversuch ohne Testsubstanz | 3 | $c_1$ | | | | | |
| | | $c_2$ | | | | | |
| | | c, Mittelwert $C_{c(t)}$ | | | | | |
| | 4 | $d_1$ | | | | | |
| | | $d_2$ | | | | | |
| | | d, Mittelwert $C_{d(t)}$ | | | | | |
| | $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | | | |

6. **AUSWERTUNG DER ROHDATEN**

| Flasche Nr. | | % Abbau nach n Tagen | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| 1 | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |

▼B

| Flasche Nr. | | % Abbau nach n Tagen | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| 2 | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| Mittel (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) Bei erheblichem Unterschied sollten $D_1$ und $D_2$ nicht gemittelt werden.

*Anmerkung*: Für die Referenz und die Toxizitätskontrolle können ähnliche Formblätter verwendet werden.

7. **ABIOTISCHE KONTROLLE** (wahlweise)

| | Zeit (Tage) | |
|---|---|---|
| | 0 | t |
| DOC-Konzentration (mg/l) in Sterilkontrolle | $C_{s(o)}$ | $C_{s(t)}$ |

$$\% \text{ abiotischer Abbau} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPEZIFISCHE ANALYSE** (wahlweise)

| | Bei Versuchsende verbliebene Menge an Prüfsubstanz (mg/l) | % Primärabbau |
|---|---|---|
| Sterilkontrolle | $S_b$ | |
| Beimpftes Prüfmedium | $S_a$ | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

TEIL IV. $CO_2$-ENTWICKLUNGSTEST (Methode C.4-C)

IV.1. PRINZIP DER METHODE

Ein definiertes Volumen des angeimpften mineralischen Mediums mit einer bekannten Konzentration der Prüfsubstanz (10-20 mg/l DOC oder TOC) als einziger nomineller Quelle organischen Kohlenstoffs wird durch Einleiten von kohlendioxidfreier Luft bei gesteuerter Geschwindigkeit im Dunkeln oder bei diffusem Licht belüftet. Der Abbau wird über einen Zeitraum von 28 Tagen durch Bestimmung des erzeugten Kohlendioxids verfolgt, das in Bariumhydroxid oder Natronlauge gebunden und durch Titration des restlichen Hydroxids/der restlichen Lauge oder als anorganischer Kohlenstoff bestimmt wird. Die Menge des aus der Prüfsubstanz freigesetzten Kohlendioxids wird (nach Berücksichtigung der Menge aus dem Inokulum-Blindversuch) in % $ThCO_2$ angegeben. Der Grad des biologischen Abbaus lässt sich auch aus der ergänzenden DOC-Analyse errechnen, die zu Beginn und am Ende der Inkubation vorgenommen wird.

▼B

IV.2. BESCHREIBUNG DER METHODE

IV.2.1. **Geräte**

a) Konische Flaschen, 2 bis 5 l, jeweils mit einem Belüftungsrohr, das nahezu auf den Boden der Flasche reicht, und mit einem Auslass

b) Magnetrührer (bei der Prüfung schwer löslicher Substanzen

c) Gaswaschflaschen

d) Einrichtung zur Steuerung und Messung des Luftstromes

e) Gerät zur Kohlendioxidwäsche zwecks Gewinnung von Luft, die frei von Kohlendioxid ist; alternativ dazu kann ein Gemisch aus $CO_2$-freiem Sauerstoff und $CO_2$-freiem Stickstoff im richtigen Verhältnis aus Gasflaschen verwendet werden (20 % $O_2$ : 80 % $N_2$)

f) Einrichtung zur Kohlendioxidbestimmung, entweder durch Titration oder Analyse des anorganischen Kohlenstoffs

g) Membranfiltrationsgerät (wahlweise)

h) DOC-Analysator (wahlweise)

IV.2.2. **Ansatz des mineralischen Mediums**

Zubereitung der Stammlösungen siehe I.6.2.

10 ml Lösung (a) mit 800 ml Verdünnungswasser mischen, 1 ml der Lösungen (b) bis (d) hinzugeben und mit Verdünnungswasser auf 1 l auffüllen.

IV.2.3. **Ansatz und Vorbereitung des Inokulums**

Das Inokulum kann aus verschiedenen Quellen gewonnen werden: aus Belebtschlamm, aus Kläranlagenablauf, aus Oberflächenwasser, aus Böden oder aus mehreren dieser Quellen zugleich.

Vgl. I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 und I.6.5.

IV.2.4. **Ansatz der Flaschen**

Die folgenden Mengen- und Gewichtsangaben sind als Beispiel für 5-Liter-Flaschen mit 3 l Suspension zu verstehen. Werden Flaschen mit geringerem Volumen verwendet, sind die Angaben entsprechend zu ändern. Es muss allerdings sichergestellt sein, dass das gebildete Kohlendioxid exakt gemessen werden kann.

In jede 5-l-Flasche werden 2 400 ml mineralisches Medium gegeben. Dazu wird eine geeignete Menge des vorbereiteten Belebtschlamms hinzugefügt (vgl. I.6.4.1 und I.6.5), um schließlich in den 3 l beimpfter Mischung eine Konzentration an suspendierten Feststoffen von nicht mehr als 30 mg/l zu erhalten. Alternativ dazu kann der vorbereitete Belebtschlamm zunächst im mineralischen Medium verdünnt werden zu einer Suspension von 500-1 000 mg/l. Danach wird dem Inhalt der 5-l-Flasche eine aliquote Menge hinzugegeben, um so eine Konzentration von 30 mg/l zu erhalten. Dieses letztere Verfahren sichert eine höhere Präzision. Es kann auch Inokulum anderer Herkunft verwendet werden (vgl. I.6.4.2).

Diese angeimpften Mischungen sind über Nacht mit $CO_2$-freier Luft zu belüften, um das System von Kohlendioxid zu reinigen.

▼B

Die Prüf- und die Referenzsubstanz sind getrennt als Stammlösungen bekannten Volumens in die Gefäße des Parallelansatzes zu geben, um so Substanzkonzentrationen von 10 bis 20 mg/l DOC oder TOC zu erhalten; einige Gefäße sind ohne Zugabe von Substanz als Inokulum-Kontrollen mitzuführen. Schwerlösliche Prüfsubstanzen sind auf Gewichts- oder Volumenbasis direkt in die Gefäße zu geben oder gemäß Anlage 3 zu behandeln.

Falls erforderlich, ist ein Gefäß zur Kontrolle der möglichen Hemmwirkung der Prüfsubstanz zu verwenden; dazu ist sowohl die Prüf- als auch die Referenzsubstanz in derselben Konzentration zuzugeben wie in den anderen Gefäßen.

Falls erforderlich, ist eine weitere, sterile Flasche anzusetzen, um zu prüfen, ob die Prüfsubstanz abiotisch abgebaut wird; dazu ist eine nicht angeimpfte Lösung dieser Substanz zu verwenden (vgl. I.6.6). Sterilisierung durch Zugabe einer toxischen Substanz in geeigneter Konzentration.

Die Suspensionen in allen Flaschen sind durch Zugabe des zuvor mit $CO_2$-freier Luft belüfteten mineralischen Mediums aufzufüllen. Wahlweise können Proben zur DOC-Analyse (vgl. Anlage 2.4) und/oder zur spezifischen Analyse entnommen werden. Die Absorptionsflaschen sind mit den Gasauslässen der Flaschen zu verbinden.

Bei Verwendung von Bariumhydroxid sind an jede 5-l-Flasche drei Absorptionsflaschen, jeweils gefüllt mit 100 ml Bariumhydroxidlösung 0,0125 M, in Serie anzuschließen. Die Lösung muss frei von ausgefälltem Sulfat und Karbonat sein; die Konzentration der Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch zu bestimmen. Bei Verwendung von Natronlauge sind zwei Absorptionsfallen anzuschließen, wobei die zweite als Kontrolle dafür dient, ob das gesamte Kohlendioxid in der ersten Falle absorbiert wurde. Geeignet sind hierfür Absorptionsflaschen, die mit Serumflaschenverschlüssen versehen sind. In jede Flasche sind 200 ml Natronlauge 0,05 M zu geben; diese Menge ist ausreichend, um das gesamte bei vollständigem Abbau der Prüfsubstanz entstehende Kohlendioxid zu absorbieren. Auch nach frischer Zubereitung enthält die Natronlauge Spuren von Karbonaten, die durch Subtraktion des im Blindwert enthaltenen Karbonats berücksichtigt werden.

IV.2.5. **Anzahl der Flaschen in einem typischen Durchgang**

Flaschen 1 und 2: Prüfsuspension

Flaschen 3 und 4: Inokulum-Blindwert

Flasche 5: Verfahrenskontrolle.

Empfohlen und falls notwendig:

Flasche 6: abiotische Sterilkontrolle

Flasche 7: Toxizitätskontrolle

Vgl. auch I.6.7.

IV.2.6. **Durchführung der Prüfung**

Bei Versuchsbeginn wird $CO_2$-freie Luft (Geschwindigkeit: 30-100 ml/min) in die Gefäße mit den Suspensionen geleitet. Zur Bestimmung der $CO_2$-Entwicklung sind regelmäßig Proben des Kohlendioxid-Absorbers zu entnehmen. Es wird empfohlen, diese Messungen in den ersten zehn Tagen alle zwei oder drei, danach bis zum 28. Tag alle fünf Tage vorzunehmen, um das 10-Tage-Fenster zu ermitteln.

▼B

Am 28. Tag werden Proben (wahlweise) zwecks DOC- und/oder spezifischer Analyse entnommen, der pH-Wert der Suspensionen gemessen und jeder Flasche 1 ml konzentrierte Salzsäure zugesetzt; die Flaschen sind über Nacht zu belüften, um das in den Prüfsuspensionen vorhandene Kohlendioxid auszutreiben. Am 29. Tag ist die letzte Bestimmung der Kohlendioxidentwicklung vorzunehmen.

An den Tagen, an denen $CO_2$-Messungen vorgenommen werden, ist die dem Testgefäß am nächsten stehende Bariumhydroxid-Absorptionsflasche abzutrennen und die Hydroxidlösung mit HCl 0,05 M unter Verwendung von Phenolphthalein als Indikator zu titrieren. Die verbleibenden Absorptionsflaschen rücken jeweils um einen Platz auf, und eine neue Absorptionsflasche mit 100 ml frischem Bariumhydroxid 0,0125 M wird an das Ende der Serie hinzugefügt. Die Titrationen sind je nach Bedarf vorzunehmen, z. B. wenn in der ersten Falle deutliche Niederschläge auftreten, d. h., bevor ein Niederschlag in der zweiten Falle sichtbar wird, zumindest aber einmal pro Woche. Alternativ kann man — bei Verwendung von NaOH als Absorber — mit einer Spritze eine kleine Probe Natronlauge (je nach verwendetem Kohlenstoffanalysator) aus der dem Testgefäß am nächsten stehenden Absorptionsflasche entnehmen und diese zur Bestimmung der Kohlenstoffentwicklung direkt in den IC-Teil des Kohlenstoffanalysators einspritzen.

Der Inhalt der zweiten Absorptionsfalle ist nur am Versuchsende zu analysieren, um eine mögliche Kohlendioxidübertragung zu berücksichtigen.

IV.3. DATEN UND ABSCHLUSSBERICHT

IV.3.1. **Auswertung der Ergebnisse**

Die in einem Absorber gebundene Menge $CO_2$ ergibt sich nach Titration:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

Hierin bedeuten:

V = zur Titration der 100 ml im Absorber verbrauchtes Volumen HCl (ml)

$C_B$ = Konzentration der Bariumhydroxidlösung (M)

$C_A$ = Konzentration der Salzsäurelösung (M)

Wenn $C_B$ 0,0125 M und $C_A$ 0,05 M sind, beträgt das zur Titration von 100 ml Bariumhydroxid verbrauchte Volumen 50 ml, während sich die Menge an $CO_2$ wie folgt ergibt:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI titrierte} = 1,1 \times \text{ml HCI}$$

Der Faktor zur Umrechnung des titrierten HO-Volumens in mg $CO_2$ beträgt demnach 1,1.

Die Mengen des aus dem Inokulum allein und aus Inokulum plus Prüfsubstanz freigesetzten $CO_2$ sind unter Verwendung der entsprechenden Titrationswerte zu berechnen; aus der Differenz ergibt sich die Menge des aus der Prüfsubstanz allein freigesetzten $CO_2$.

Ergibt z. B. das Inokulum allein einen Titrationswert vom 48 ml, Inokulum plus Prüfsubstanz einen Wert von 45 ml, so betragen

$CO_2$ aus dem Inokulum = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg,

▼B

$CO_2$ aus Inokulum plus Prüfsubstanz = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg;

d. h., die Menge des aus der Prüfsubstanz allein freigesetzten $CO_2$ liegt bei 3,3 mg.

Der prozentuale biologische Abbau berechnet sich wie folgt:

$$\% \text{ Abbau} = \frac{\text{mg freigesetztes } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg zugegebene Prüfsubstanz}}$$

oder

$$\% \text{ Abbau} = \frac{\text{mg freigesetztes } CO_2 \times 100}{\text{mg im Versuch zugegebener TOC} \times 3,67}$$

wobei 3,67 der Umrechnungsfaktor (44/12) von Kohlenstoff in Kohlendioxid ist.

Der prozentuale Abbau für jeden beliebigen Zeitabschnitt kann durch Addition der prozentualen $ThCO_2$-Werte ermittelt werden, die für jeden einzelnen Tag bis zum Zeitpunkt der Messung berechnet worden sind.

Bei Verwendung von Adsorptionsgefäßen mit Natronlauge ist die freigesetzte Kohlendioxidmenge, angegeben als IC (mg), durch Multiplikation der IC-Konzentration im Absorber mit dem Volumen des verwendeten Absorbers zu berechnen.

Der prozentuale biologische Abbau berechnet sich wie folgt:

$$\% \ ThCO_2 = \frac{\text{mg IC aus dem Prüfgefäß} - \text{mg IC des Blindwertes}}{\text{mg als Prüfsubstanz hinzugefügter TOC}} \times 100$$

Die DOC-Abnahme wird (wahlweise) entsprechend den Angaben unter Abschnitt I.7 berechnet. Die erhaltenen Werte werden zusammen mit allen anderen Ergebnissen auf den vorliegenden Datenblättern protokolliert.

IV.3.2. **Validität der Ergebnisse**

Der IC-Gehalt der Prüfsuspension im mineralischen Medium zu Versuchsbeginn darf nicht mehr als 5 % des TC-Werts betragen, und die gesamte $CO_2$-Entwicklung des Inokulum-Blindwerts zu Versuchsende sollte normalerweise 40 mg/l Medium nicht überschreiten. Bei Werten über 70 mg $CO_2$ pro Liter sollten die Daten und das Versuchsverfahren kritisch überprüft werden.

Vgl. auch I.5.2.

IV.3.3. **Abschlussbericht**

Vgl. I.8.

IV.4. DATENBLATT

Nachstehend ein Beispiel eines Datenblattes.

KOHLENDIOXIDENTWICKLUNGSTEST

1. **LABOR**

2. **DATUM BEI VERSUCHSBEGINN**

3. **PRÜFSUBSTANZ**

Name: …

Konzentration der Stammlösung: ... mg/l auf Substanz bezogen

▼B

Anfangskonzentration im Medium: ... mg/l auf Substanz bezogen

In die Flasche gegebene Gesamtmenge an C (TC): ... mg C

$ThCO_2$: ... mg $CO_2$

4. **INOKULUM**

Herkunft: ...

Vorgenommene Behandlung: ...

Vorbereitung/Konditionierung (soweit zutreffend): ...

Konzentration der suspendierten Feststoffe im Reaktionsgemisch: ... mg/l

5. **KOHLENDIOXIDENTWICKLUNG UND ABBAUBARKEIT**

Methode: $Ba(OH)_2$/NaOH/Sonstige ...

| Zeit (Tag) | Freigesetztes $CO_2$ Test (mg) | | Freigesetztes $CO_2$ Blindversuch (mg) | | Freigesetztes $CO_2$ kumulativ (mg) (Test — Blindversuch) | | % $ThCO_2$ kumulativ $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 / 2 | Mittelwert | 3 / 4 | Mittelwert | 1 | 2 | 1 | 2 | Mittelwert |
| 0 | | | | | | | | | |
| $n_1$ | | | | | | | | | |
| $n_2$ | | | | | | | | | |
| $n_3$ | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | |

*Anmerkung*: Für die Referenzsubstanz sowie für die Toxizitätskontrolle können ähnliche Formblätter verwendet werden.

6. **KOHLENSTOFFANALYSE** (wahlweise)

Kohlenstoffanalysator: ...

| Zeit (Tag) | Blindversuch mg/l | Prüfsubstanz mg/l |
|---|---|---|
| 0 | $C_{b(o)}$ | $C_o$ |
| 28 (*) | $C_{b(t)}$ | $C_t$ |

(*) oder am Ende der Inkubation.

▼B

$$\% \text{ DOC Abnahme} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTISCHER ABBAU** (wahlweise)

$$\% \text{ abiotischer Abbau} = \frac{CO_2 - \text{Bildung Sterilkontrolle nach 28 Tagen (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

TEIL V: **MANOMETRISCHER RESPIRATIONSTEST** (Methode C.4-D)

V.l. PRINZIP DER METHODE

Ein definiertes Volumen des angeimpften mineralischen Mediums mit einer bekannten Konzentration der Prüfsubstanz (100 mg/l), die einem ThSB von mindestens 50-100 mg/l entsprechen als einziger nomineller Quelle organischen Kohlenstoffs, wird in einer geschlossenen Flasche bei konstanter Temperatur (± 1 °C oder genauer) bis zu 28 Tage gerührt. Der Sauerstoffverbrauch wird entweder durch Messung der (elektrolytisch erzeugten) Sauerstoffmenge bestimmt, die erforderlich ist, um in der Respirometerflasche ein konstantes Gasvolumen aufrechtzuerhalten, oder aus der Änderung des Volumens oder Drucks im Gerät (bzw. einer Kombination beider Parameter). Das entstandene Kohlendioxid wird in einer Lösung von Kaliumhydroxid oder einem anderen geeigneten Absorptionsmittel absorbiert. Die Menge des von der Prüfsubstanz aufgenommenen Sauerstoffs wird (nach Berücksichtigung des entsprechenden Wertes in dem parallel mitgeführten Inokulum-Blindversuch) als prozentualer Anteil des ThSB oder CSB angegeben. Wahlweise lässt sich Totalabbau durch DOC-Analyse, primärer biologischer Abbau auch aus einer ergänzenden spezifischen Analyse errechnen, die zu Beginn und am Ende der Inkubation vorgenommen wird.

V.2. BESCHREIBUNG DER METHODE

V.2.1. **Geräte**

a) geeignetes Respirationsmessgerät

b) Thermostat mit einer Temperaturkonstanz von ± 1 °C oder genauer

c) Membranfiltrationsgerät (wahlweise)

d) Kohlenstoffanalysator (wahlweise)

V.2.2. **Ansatz des mineralischen Mediums**

Zubereitung der Stammlösungen siehe I.6.2.

10 ml Lösung (a) mit 800 ml Verdünnungswasser mischen, 1 ml der Lösungen (b) bis (d) hinzugeben und mit Verdünnungswasser auf 1 l auffüllen.

V.2.3. **Ansatz und Vorbereitung des Inokulums**

Das Inokulum kann aus verschiedenen Quellen gewonnen werden: aus Belebtschlamm, aus Kläranlagenablauf, aus Oberflächenwasser, aus Böden oder aus mehreren dieser Quellen zugleich.

Vgl. I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 und I.6.5.

V.2.4. **Ansatz der Flaschen**

Lösungen der Prüf- und Referenzsubstanz sind aus den Stammlösungen in getrennten Ansätzen in einer Konzentration von normalerweise 100 mg/l Substanz entsprechend einem ThSB von mindestens 50-100 mg/l zuzubereiten.

▼B

Der ThSB ist auf der Grundlage der Bildung von Ammoniumsalzen zu berechnen, sofern nicht eine Nitrifikation zu erwarten ist, bei der die Berechnung auf der Grundlage einer Nitratbildung vorzunehmen ist (siehe Anlage 2.2).

Die pH-Werte sind zu bestimmen und, falls erforderlich, auf 7,4 ± 0,2 einzustellen.

Schwerlösliche Substanzen sollten zu einem späteren Zeitpunkt hinzugegeben werden (siehe unten).

Wenn die Toxizität der Prüfsubstanz bestimmt werden soll, ist eine weitere Lösung in mineralischem Medium anzusetzen, die sowohl die Prüf- als auch die Referenzsubstanz enthält, und zwar in denselben Konzentrationen wie bei den Einzelansätzen.

Soweit die Messung der physikalisch-chemischen Sauerstoffaufnahme erforderlich ist, ist eine durch Zugabe einer geeigneten toxischen Substanz sterilisierte Lösung mit der Prüfsubstanz, entsprechend einem ThSB von normalerweise 100 mg/l, anzusetzen (vgl. I.6.6).

Die erforderliche Menge der Lösungen der Prüf- und der Referenzsubstanz wird jeweils auf zwei Flaschen verteilt. Daneben sind weitere Flaschen nur mit dem mineralischen Medium (für die Inokulum-Kontrollen) und, falls erforderlich, mit der gemischten Prüf-/Referenzlösung und mit der sterilen Lösung anzusetzen.

Handelt es sich um eine schwerlösliche Prüfsubstanz, wird diese gewichts- oder volumenbezogen zu diesem Zeitpunkt direkt in die Gefäße gegeben oder nach Anlage 3 behandelt. In die $CO_2$-Absorptionsflaschen sind Kaliumhydroxid, Natronkalk-Pellets oder ein anderes Absorptionsmittel zu geben.

V.2.5. **Anzahl der Flaschen in einem typischen Durchgang**

Flaschen 1 und 2: Prüfsuspension

Flaschen 3 und 4: Inokulum-Blindwert

Flasche 5: Verfahrenskontrolle

Empfohlen und falls notwendig:

Flasche 6: Sterilkontrolle

Flasche 7: Toxizitätskontrolle

Vgl. I.6.7.

V.2.6. **Durchführung der Prüfung**

Nachdem die Gefäße die gewünschte Temperatur erreicht haben, werden sie mit vorbereitetem Belebtschlamm oder einem Inokulum anderer Herkunft in einer Konzentration von nicht mehr als 30 mg suspendierter Feststoffe pro Liter beimpft. Danach wird die Versuchsanordnung zusammengestellt, das Rührgerät angestellt, auf Luftabschluss geprüft und mit der Messung der Sauerstoffaufnahme begonnen. Bis auf die notwendigen Ablesungen sowie täglichen Kontrollen der richtigen Temperatur und des erforderlichen angemessenen Rührens ist gewöhnlich kein weiterer Aufwand notwendig.

Die Sauerstoffaufnahme ist aus den in regelmäßigen und kurzen Abständen abgelesenen Messwerten zu berechnen; dabei sind die vom Gerätehersteller angegebenen Methoden zu verwenden. Am Ende der Inkubation, normalerweise nach 28 Tagen, sind die pH-Werte der Flascheninhalte zu messen, insbesondere wenn die Sauerstoffaufnahme niedrig ist bzw. über dem $ThSB_{NH4}$ liegt (für stickstoffhaltige Verbindungen).

▼B

Falls erforderlich, sind den Respirometerflaschen am Anfang und am Ende Proben zur DOC-Analyse oder zur spezifischen Analyse zu entnehmen (vgl. Anlage 2.4). Bei der ersten Probenahme ist sicherzustellen, dass das Volumen der in der Flasche verbleibenden Prüfsuspension bekannt ist. Im Falle der Sauerstoffaufnahme einer stickstoffhaltigen Prüfsubstanz, ist die Zunahme der Nitrit- und Nitratkonzentration über einen Zeitraum von 28 Tagen zu bestimmen und der Sauerstoffverbrauch infolge Nitrifikation zu berücksichtigen (Anlage 5).

V.3. DATEN UND ABSCHLUSSBERICHT

V.3.1. **Auswertung der Ergebnisse**

Die Sauerstoffaufnahme (mg) der Prüfsubstanz nach einer vorgegebenen Zeit (korrigiert um die Sauerstoffaufnahme der Inokulum-Blindkontrolle nach der gleichen Zeit) ist durch das Gewicht der verwendeten Prüfsubstanz zu dividieren. Dadurch erhält man den BSB, ausgedrückt als mg Sauerstoff pro mg Prüfsubstanz:

$$\text{BSB} = \frac{(\text{mg } O_2 - \text{Aufn. der Prüfsubst.} - \text{mg } O_2 - \text{Aufn. der Blindkontr.})}{(\text{mg Prüfsubst. in der Flasche})}$$

= mg $O_2$ pro mg Prüfsubstanz

Der prozentuale biologische Abbau ist zu berechnen entweder nach:

$$\%\ \text{biolog. Abbau} = \%\ \text{ThSB} = \frac{\text{BSB (mg } O_2/\text{mg Substanz)}}{\text{ThSB (mg } O_2 \text{ Substanz)}} \times 100$$

oder nach:

$$\%\ \text{CSB} = \frac{\text{BSB (mg } O_2/\text{mg Substanz)}}{\text{CSB (mg } O_2 \text{ Substanz)}} \times 100$$

Dabei ist anzumerken, dass diese beiden Verfahren nicht notwendigerweise denselben Wert ergeben; vorzugsweise sollte das erstere Verfahren angewendet werden.

Bei stickstoffhaltigen Prüfsubstanzen ist, je nachdem, ob eine Nitrifikation zu erwarten ist oder nicht, der entsprechende ThSB-Wert ($NH_4$ oder $NO_3$) zu verwenden (Anlage 2.2). Bei auftretender, jedoch unvollständiger Nitrifikation, ist aus den Veränderungen der Nitrit- und Nitratkonzentration ein Korrekturfaktor für den durch die Nitrifikation verbrauchten Sauerstoff zu berechnen (Anlage 5).

Wenn wahlweise Bestimmungen des organischen Kohlenstoffs und/oder einer Einzelsubstanz vorgenommen werden, ist der prozentuale Abbau entsprechend I.7 zu berechnen.

Sämtliche Ergebnisse sind auf den beigefügten Datenblättern zu protokollieren.

V.3.2. **Gültigkeit der Ergebnisse**

Die Sauerstoffaufnahme des Inokulum-Blindwerts liegt normalerweise bei 20-30 mg/l $O_2$ und sollte nach 28 Tagen nicht größer sein als 60 mg/l. Bei Werten über 60 mg/l sollten die Daten und Versuchsdurchführung kritisch überprüft werden. Wenn der pH-Wert außerhalb des Bereichs 6-8,5 liegt und der Sauerstoffverbrauch durch die Prüfsubstanz unter 60 % beträgt, ist der Test mit einer geringeren Konzentration der Prüfsubstanz zu wiederholen.

Vgl. auch I.5.2.

▼B

V.3.3. **Abschlussbericht**

Vgl. I.8.

V.4. **DATENBLATT**

Nachstehend ein Beispiel eines Datenblatts.

MANOMETRISCHER RESPIRATIONSTEST

1. **LABOR**

2. **DATUM BEI VERSUCHSBEGINN**

3. **PRÜFSUBSTANZ**

Name:

Konzentration der Stammlösung: ... mg/l

Anfangskonzentration im Medium, $C_o$: ... mg/l

Volumen in der Prüfflasche (V): ... ml

ThSB/CSB: ... mg $O_2$/mg Prüfsubstanz ($NH_4$, $NO_3$)

4. **INOKULUM**

Herkunft: ...

Vorgenommene Behandlung: ...

Vorbereitung/Konditionierung (soweit zutreffend): ...

Konzentration der suspendierten Feststoffe im Reaktionsgemisch: ... mg/l

5. **SAUERSTOFFAUFNAHME: BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT**

| | | Zeit (Tage) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | | 7 | | 14 | | | 21 | | | 28 | |
| $O_2$-Aufnahme (mg) Prüfsubstanz | 1 | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | | |
| | a, Mittelwert | | | | | | | | | | | | |
| $O_2$-Aufnahme (mg) Blindwert | 3 | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | |
| | b, Mittelwert | | | | | | | | | | | | |
| Korrigierter BSD (mg) | $(a_1 - b_m)$ | | | | | | | | | | | | |
| | $(a_2 - b_m)$ | | | | | | | | | | | | |
| BSB pro mg Prüfsubstanz | $\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$ | | | | | | | | | | | | |
| | $\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$ | | | | | | | | | | | | |

▼B

| | | Zeit (Tage) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | | 7 | | 14 | | | 21 | | | 28 | |
| % Abbau | $D_1$ ($a_1$) | | | | | | | | | | | | |
| $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$ | $D_2$ ($a_2$) | | | | | | | | | | | | |
| | Mittelwert (*) | | | | | | | | | | | | |

V = Volumen des Mediums in der Prüfflasche.
(*) Bei erheblichem Unterschied sollten $D_1$ und $D_2$ nicht gemittelt werden.

*Anmerkung*: Für die Referenzsubstanz sowie Toxizitätskontrolle können ähnliche Formblätter verwendet werden.

6. **KORREKTUR INFOLGE NITRIFIKATION** (vgl. Anlage 5)

| Tag | | 0 | 28 | Differenz |
|---|---|---|---|---|
| (i) | Nitratkonzentration (mg N/l) | | | (N) |
| (ii) | Sauerstoffäquivalent (4,57 × N × V) (mg) | — | — | |
| (iii) | Nitritkonzentration (mg N/l) | | | (N) |
| (iv) | Sauerstoffäquivalent (3,43 × N × V) (mg) | — | — | |
| (ii + iv) | Gesamtsauerstoffäquivalent | — | — | |

7. **KOHLENSTOFFANALYSE** (wahlweise)

Kohlenstoffanalysator: ...

| Zeit (Tag) | Blindversuch mg/l | Prüfsubstanz mg/l |
|---|---|---|
| 0 | $C_{b(o)}$ | $C_o$ |
| 28 (*) | $C_{b(t)}$ | $C_t$ |

(*) oder am Ende der Inkubation.

$$\% \text{ DOC Abnahme} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPEZIFISCHE ANALYSE** (wahlweise)

$S_b$ = Konzentration der Prüfsubstanz in der physikalisch-chemischen (steril-)Kontrolle nach 28 Tagen

$S_a$ = Konzentration in der angeimpften Flasche nach 28 Tagen

$$\% \text{ biologischer Primärabbau} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTISCHER ABBAU** (wahlweise)

a = Sauerstoffverbrauch in sterilen Flaschen nach 28 Tagen (mg)

$$\text{Sauerstoffverbrauch pro mg Prüfsubstanz} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(vgl. Abschnitte 1 und 3)

$$\% \text{ abiotischer Abbau} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThSB}$$

TEIL VI: **GESCHLOSSENER FLASCHENTEST** (Methode C.4-E)

VI.1. PRINZIP DER METHODE

Die Lösung der Prüfsubstanz im mineralischen Medium, normalerweise in einer Konzentration von 2-5 mg/l, wird mit einer relativ kleinen Anzahl Mikroorganismen einer gemischten Population beimpft und in vollständig gefüllten, verschlossenen Flaschen im Dunkeln bei konstanter Temperatur gehalten. Der Abbau wird 28 Tage lang mittels Analyse des gelösten Sauerstoffs verfolgt. Die von der Prüfsubstanz verbrauchte Sauerstoffmenge, korrigiert um die Aufnahme im parallelen Inokulum-Blindversuch, wird als Prozent des ThSB oder CSB angegeben.

VI.2. BESCHREIBUNG DER METHODE

VI.2.1. **Geräte**

a) BSB-Flaschen mit Glasstopfen, z. B. 250-300 ml;

b) Wasserbad oder Inkubator, in dem die Flaschen im Dunkeln bei konstanter Temperatur (± 1 °C oder genauer) gehalten werden;

c) große Glasflaschen (2-5 l) zur Vorbereitung der Medien und zum Füllen der BSB-Flaschen;

d) Sauerstoffelektrode und -messgerät bzw. Ausrüstung und Reagenzien zur Winkler-Titration.

VI.2.2. **Ansatz des mineralischen Mediums**

Zubereitung der Stammlösungen siehe I.6.2.

1 ml der Lösungen (a) bis (d) zusammengeben und mit Verdünnungswasser auf 1 l auffüllen.

VI.2.3. **Ansatz des Inokulums**

Das Inokulum ist normalerweise von Abläufen einer Kläranlage oder Anlagen im Labormaßstab, denen vorwiegend häusliche Abwässer zugeleitet werden, zu entnehmen. Alternativ kann ein Inokulum aus Oberflächengewässern verwendet werden. Die Verwendung sollte üblicherweise ein Tropfen (0,05 ml) bis 5 ml Filtrat pro Liter Medium betragen; Versuche können erforderlich werden, um das geeignete Volumen für den jeweiligen Ablauf zu ermitteln. (Vgl. I.6.4.2 und I.6.5).

VI.2.4. **Ansatz der Flaschen**

Das mineralische Medium ist über mindestens 20 min intensiv zu belüften. Jede Prüfreihe ist mit mineralischem Medium aus derselben Charge durchzuführen. Im Allgemeinen ist das Medium nach 20 h Stehen bei der Prüftemperatur gebrauchsfertig. Für Kontrollzwecke ist die Konzentration des gelösten Sauerstoffs zu bestimmen; der Wert sollte bei 20 °C etwa 9 mg/l betragen. Alle Transfer- und Fülloperationen mit luftgesättigtem Medium sind blasenfrei auszuführen, z. B. durch Verwendung von Ansaughebern.

▼B

Gruppen von Flaschen zur gleichzeitigen BSB-Bestimmung der Prüf- und Referenzsubstanz werden in parallelen Versuchsreihen angesetzt. Eine ausreichende Anzahl von BSB-Flaschen — einschließlich der für die Inokulum-Blindversuche — ist so aufzustellen, dass zu den gewünschten Zeitpunkten, z. B. nach 0, 7, 14, 21 und 28 Tagen, mindestens Doppelmessungen des Sauerstoffverbrauchs vorgenommen werden können. Wenn das 10-Tage-Fenster erkannt werden soll, können mehr Flaschen erforderlich sein.

Die großen Flaschen werden zu etwa einem Drittel ihres Volumens mit vollständig belüftetem mineralischem Medium gefüllt. Danach wird so viel an Stammlösungen der Prüf- sowie der Referenzsubstanz in getrennte Flaschen gegeben, dass die Endkonzentration der Substanzen im Normalfall nicht größer als 10 mg/l ist. Der Blindkontrolle werden in einer anderen großen Flasche keine chemischen Substanzen hinzugesetzt.

Um sicherzustellen, dass die Aktivität des Inokulums nicht eingeschränkt wird, darf die Konzentration des gelösten Sauerstoffs in den BSB-Flaschen nicht unter 0,5 mg/l fallen. Dies beschränkt die Konzentration der Prüfsubstanz auf etwa 2 mg/l. Für schwer abbaubare Substanzen und solche mit einem geringen ThSB können jedoch 5-10 mg/l verwendet werden. In einigen Fällen kann es ratsam sein, parallele Versuchsreihen mit der Prüfsubstanz in zwei verschiedenen Konzentrationen, z. B. 2 und 5 mg/l, anzusetzen. Normalerweise ist der ThSB auf der Grundlage der Bildung von Ammoniumsalzen zu berechnen; wenn aber eine Nitrifikation erwartet oder vorausgesetzt werden kann, muss die Berechnung auf der Basis der Nitratbildung erfolgen ($ThSB_{NO3}$: siehe Anlage 2.2). Bei auftretender, jedoch unvollständiger Nitrifikation muss eine Korrektur erfolgen, die die Veränderungen der analytisch ermittelten Nitrit- und Nitratkonzentration berücksichtigt (Anlage 5).

Wenn die Toxizität der Prüfsubstanz bestimmt werden soll (z. B. im Falle einer zuvor ermittelten geringen biologischen Abbaubarkeit), ist eine zusätzliche Reihe Flaschen notwendig.

Eine weitere große Flasche ist mit belüftetem mineralischem Medium (etwa bis zu einem Drittel ihres Volumens) mit Prüf- und Referenzsubstanz zusammen anzusetzen, in Endkonzentrationen wie normalerweise in den anderen großen Flaschen.

Die Lösungen in den großen Flaschen sind mit dem Ablauf aus einer Kläranlage (ein Tropfen oder etwa 0,05 ml auf 5 ml/l) oder mit einem Inokulum anderer Herkunft, z. B. Flusswasser, zu beimpfen (vgl. I.6.4.2). Schließlich werden die Lösungen mit Hilfe eines Schlauches, der bis zum Boden der Flasche reicht, mit belüftetem mineralischem Medium aufgefüllt, um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten.

VI.2.5. **Anzahl der Flaschen in einem typischen Ansatz**

In einem typischen Ansatz werden folgende Flaschen benötigt:

— mindestens 10 Flaschen mit Prüfsubstanz und Inokulum (Prüfsuspension),

— mindestens 10 Flaschen nur mit Inokulum (Inokulum-Blindwert),

— mindestens 10 Flaschen mit Referenzsubstanz und Inokulum (Verfahrenskontrolle),

▼B

— sowie, falls erforderlich, 6 Flaschen mit der Prüf-, der Referenzsubstanz und dem Inokulum (Toxizitätskontrolle). Um jedoch sicherzustellen, das 10-Tage-Fenster zu erkennen, ist etwa die doppelte Anzahl Flaschen erforderlich.

VI.2.6. Durchführung der Prüfung

Jede zubereitete Lösung wird sofort mit einem Schlauch aus dem unteren Viertel (nicht vom Flaschenboden) der entsprechenden großen Flasche auf die jeweilige Gruppe von BSB-Flaschen verteilt, bis alle BSB-Flaschen vollständig gefüllt sind. Danach wird leicht an die Flaschen geklopft, um mögliche Luftblasen zu entfernen. Die Flaschen zum Zeitpunkt 0 werden sofort nach dem Winkler- oder dem Elektrodenverfahren auf gelösten Sauerstoff analysiert. Der Inhalt der Flaschen kann zwecks späterer Analyse durch Zugabe von Mangan-(II)-sulfat und Natronlauge (dem ersten Winkler-Reagens) konserviert werden. Die sorgfältig mit einem Stopfen verschlossenen Flaschen, die den fixierten Sauerstoff als braunes Mangan-(III)-oxihydrat enthalten, sind im Dunkeln bei 10-20 °C nicht länger als 24 h aufzubewahren, bevor mit dem Winkler- Verfahren fortgefahren wird. Die verbleibenden parallelen Flaschen werden mit einem Stopfen versehen, wobei darauf zu achten ist, dass keine Luftblasen in den Flaschen eingeschlossen werden, und bei 20 °C im Dunkeln inkubiert. Neben jeder Versuchsreihe führt man eine vollständige Parallelreihe zur Bestimmung des Inokulum-Blindwerts mit. Während der 28-tägigen Inkubation sind in bestimmten Zeitabständen (mindestens einmal wöchentlich) mindestens zwei Flaschen pro Serie zwecks Untersuchung auf gelösten Sauerstoff zu entnehmen.

Die wöchentlichen Proben gestatten die Bewertung der prozentualen Abnahme in einem 14-Tage-Fenster, während die Probenahme alle 3-4 Tage die Bestimmung des 10-Tage-Fensters ermöglichen soll, wofür jedoch etwa die doppelte Anzahl von Flaschen erforderlich ist.

Bei stickstoffhaltigen Prüfsubstanzen sind Korrekturen für die Sauerstoffaufnahme infolge Nitrifikation vorzunehmen. Dazu ist die $O_2$-Elektrodenmethode zur Bestimmung der Konzentration von gelöstem Sauerstoff zu verwenden und anschließend zwecks Nitrit- und Nitratanalyse eine Probe aus der BSB-Flasche zu entnehmen. Aus der Zunahme der Nitrit- und Nitratkonzentration ist der Sauerstoffverbrauch zu berechnen (siehe Anlage 5).

VI.3. DATEN UND ABSCHLUSSBERICHT

VI.3.1. **Auswertung der Ergebnisse**

Zuerst ist der BSB nach jedem Zeitabschnitt zu berechnen; dazu ist die $O_2$-Eigenzehrung (mg $O_2$/l) des Inokulum-Blindansatzes von dem Wert des Prüfansatzes zu subtrahieren. Diese korrigierte Zehrung ist durch die Konzentration (mg/l) der Prüfsubstanz zu dividieren, um so den spezifischen BSB, ausgedrückt als mg Sauerstoff pro mg Prüfsubstanz, zu erhalten. Die prozentuale biologische Abbaubarkeit wird dann durch Dividieren des spezifischen BSB durch den spezifischen ThSB (bestimmt entsprechend Anlage 2.2) oder CSB (bestimmt durch Analyse, vgl. Anlage 2.3) wie folgt berechnet:

$$\text{BSB} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ – Aufn. Prüfsubst. – mg } O_2 \text{ – Aufn. Blindkontrolle})}{(\text{mg Prüfsubst. in der Flasche})}$$

▼B

= mg $O_2$ pro mg Prüfsubstanz

$$\% \text{ Abbau} = \frac{\text{BSB (mg } O_2/\text{mg Prüfsubstanz)}}{\text{ThSB (mg } O_2/\text{mg Prüfsubstanz)}} \times 100$$

oder

$$\% \text{ Abbau} = \frac{\text{BSB (mg } O_2/\text{mg Prüfsubstanz)}}{\text{CSB (mg } O_2/\text{mg Prüfsubstanz)}} \times 100$$

Dabei ist anzumerken, dass diese beiden Verfahren nicht notwendigerweise denselben Wert ergeben; vorzugsweise sollte das erste Verfahren verwendet werden.

Bei stickstoffhaltigen Prüfsubstanzen ist, je nachdem, ob eine Nitrifikation zu erwarten ist oder nicht (Anlage 2.2), der entsprechende ThSB-Wert ($NH_4$ oder $NO_3$) zu verwenden. Bei stattfindender, jedoch unvollständiger Nitrifikation ist aus den Veränderungen der Nitrit- und Nitratkonzentration ein Korrekturfaktor für den durch die Nitrifikation verbrauchten Sauerstoff zu berechnen (Anlage 5).

VI.3.2. **Gültigkeit der Ergebnisse**

Bei der Impfzehrkontrolle sollte der Sauerstoffverbrauch nach 28 Tagen 1,5 mg gelösten Sauerstoff pro Liter nicht überschreiten. Bei höheren Werten ist eine Überprüfung der Versuchsdurchführung vorzunehmen. Die in den Prüfflaschen verbleibende Sauerstoffkonzentration darf zu keinem Zeitpunkt 0,5 mg/l unterschreiten. Solch niedrige Sauerstoffkonzentrationen sind nur gültig, wenn das zur Bestimmung des gelösten Sauerstoffs verwendete Verfahren in der Lage ist, solche Konzentrationen genau zu messen.

Vgl. auch I.5.2.

VI.3.3. **Abschlussbericht**

Vgl. I.8.

VI.4. DATENBLATT

Nachstehend ein Beispiel eines Datenblatts

GESCHLOSSENER FLASCHENTEST

1. **LABOR**

2. **DATUM BEI VERSUCHSBEGINN**

3. **PRÜFSUBSTANZ**

Name:

Konzentration der Stammlösung: ... mg/l

Anfangskonzentration in der Flasche: ... mg/l

ThSB bzw. CSB: ... mg $O_2$/mg Prüfsubstanz

4. **INOKULUM**

Herkunft: ...

Vorgenommene Behandlung: ...

▼B

Vorbereitung/Konditionierung (falls zutreffend): ...

Konzentration im Reaktionsgemisch: ... ml/l

5. **DO-BESTIMMUNG**

Methode: Winkler- oder Elektrodenverfahren

**Flaschenanalysen**

| Inkubationszeit (d) | | | DO (mg/l) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | |
| Blindwert (ohne Prüfsubstanz) | 1 | $C_1$ | | | | |
| | 2 | $C_2$ | | | | |
| Mittelwert | $m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$ | | | | | |
| Prüfsubstanz | 1 | $a_1$ | | | | |
| | 2 | $a_2$ | | | | |
| Mittelwert | $m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$ | | | | | |

*Anmerkung*: Für die Referenzsubstanz sowie Toxizitätskontrolle können ähnliche Formblätter verwendet werden.

6. **KORREKTUR INFOLGE NITRIFIKATION** (vgl. Anlage 5)

| Inkubationszeit (d) | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ |
|---|---|---|---|---|---|
| (i) | Nitratkonzentration (mg N/l) | | | | |
| (ii) | Änderung der Nitratkonzentration (mg N/l) | — | | | |
| (iii) | Sauerstoffäquivalent (mg/l) | — | | | |
| (iv) | Nitritkonzentration (mg N/l) | | | | |
| (v) | Änderung der Nitritkonzentration (mg N/l) | — | | | |
| (vi) | Sauerstoffäquivalent (mg/l) | — | | | |
| (iii + vi) | Sauerstoffäquivalent insges. (mg/l) | — | | | |

7. **DO-ZEHRUNG: % ABBAU**

| | Zehrung nach n Tagen (mg/l) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | |
| FLASCHE 1: $(m_{to} - m_{tx}) — (m_{bo} - m_{bx})$ | | | | |
| FLASCHE 2: $(m_{to} - m_{tx}) — (m_{bo} - m_{bx})$ | | | | |

▼B

| | Zehrung nach n Tagen (mg/l) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | |
| FLASCHE 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. of test} \times \text{ThOD chemical}}$ | | | | |
| FLASCHE 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. of test} \times \text{ThOD chemical}}$ | | | | |
| $(*)\ \frac{D_1 - D_2}{2}$ | | | | |

(*) Nicht mitteln bei starker Abweichung der Parallelansätze.

$m_{t0}$ = Wert in der Prüfflasche zur Zeit 0

$m_{tx}$ = Wert in der Prüfflasche zur Zeit x

$m_{bo}$ = Mittelwert Blindansatz zur Zeit 0

$m_{bx}$ = Mittelwert Blindansatz zur Zeit x

Außerdem ist die Korrektur infolge Nitrifikation aus iii + iv in Abschnitt 6 vorzunehmen.

8. **DO-ZEHRUNG IM INOKULUM-BLINDANSATZ**

Sauerstoffverbrauch im Blindversuch: ($m_{bo}$ - $m_{b28}$) mg/l. Dieser Verbrauch ist wichtig für die Gültigkeit des Tests. Er sollte unter 1,5 mg/l liegen.

TEIL VII: **MITI-TEST** (Methode C.4-F)

VII.1. PRINZIP DER METHODE

Das Prinzip der Methode besteht in der automatischen Messung der Sauerstoffaufnahme durch eine gerührte Lösung oder Suspension der Prüfsubstanz in einem mit speziell gezüchteten, nicht adaptierten Mikroorganismen angeimpften mineralischen Medium; die Messung erfolgt über einen Zeitraum von 28 Tagen in einem abgedunkelten, geschlossenen Respirationsmessgerät bei 25 ± 1 °C. Das entstehende Kohlendioxid wird durch Natronkalk absorbiert. Die biologische Abbaubarkeit wird als prozentuale Sauerstoffaufnahme (nach Berücksichtigung der Aufnahme aus dem Blindansatz) auf der Grundlage der theoretischen Aufnahme (ThSB) angegeben. Zusätzlich wird der Grad des biologischen Primärabbaus aus der ergänzenden spezifischen Analyse errechnet, die zu Beginn und am Ende der Inkubation vorgenommen wird, wahlweise auch durch DOC-Analyse.

VII.2. BESCHREIBUNG DER METHODE

VII.2.1. **Geräte**

a) Automatisches elektrolytisches BSB-Messgerät oder Respirometer, normalerweise ausgestattet mit 6 Flaschen zu je 300 ml mit Bechern für das $CO_2$-Absorbens;

▼B

b) Klimakammer und/oder Wasserbad mit 25 °C ± 1 °C oder genauer;

c) Membranfiltrationsgerät (wahlweise);

d) Kohlenstoffanalysator (wahlweise).

VII.2.2. **Ansatz des mineralischen Mediums**

Die folgenden Stammlösungen sind unter Verwendung von Reagenzien des Reinheitsgrades zur Analyse (p. a.) und Wasser (I.6.1) anzusetzen:

| | | |
|---|---|---|
| a) | Kaliumdihydrogenorthophosphat, $KH_2PO_4$ | 8,50 g |
| | Dikaliummonohydrogenorthophosphat, $K_2HPO_4$ | 21,75 g |
| | Dinatriummonohydrogenorthophosphat-Dodecahydrat, $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ | 44,60 g |
| | Ammoniumchlorid, $NH_4Cl$ | 1,70 g |
| | in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt; | |
| | der pH-Wert der Lösung sollte 7,2 betragen, | |
| b) | Magnesiumsulfat-Heptahydrat, $MgSO_4.7\ H_2O$ | 22,50 g |
| | in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. | |
| c) | Calciumchlorid, wasserfrei, $CaCl_2$ | 27,50 g |
| | in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. | |
| d) | Eisen(III)chlorid-Hexahydrat, $FeCl_3.6\ H_2O$ | 0,25 g |
| | in Wasser gelöst und auf 1 l aufgefüllt. | |

Je 3 ml der Lösungen a, b, c, d zusammengeben und auf 1 l auffüllen.

VII.2.3. **Ansatz des Inokulums**

Es sind frische Proben an mindestens zehn Orten zu entnehmen, vorzugsweise aus Gebieten, in denen eine Vielzahl chemischer Substanzen verwendet und eingetragen werden. An solchen Orten wie kommunalen Kläranlagen, Industriekläranlagen, Flüssen, Seen oder dem Meer sind 1-l-Proben Belebtschlamm, Oberboden, Wasser usw. zu entnehmen und gründlich zu durchmischen. Nach Entfernen aufschwimmender Stoffe wird die Probe stehen gelassen und der Überstand mit Natronlauge oder Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 7 ± 1 eingestellt.

Ein geeignetes Volumen des abfiltrierten Überstands wird in ein Belebtschlammgefäß gefüllt und etwa 23 1/2 h belüftet. Eine halbe Stunde nach Abschalten der Belüftung wird etwa ein Drittel des gesamten Überstands entnommen und das gleiche Volumen einer Lösung (pH 7), aus jeweils 0,1 % Glukose, Pepton und Kaliumorthophosphat, dem abgesetzten Material hinzugefügt und weiterbelüftet. Diese Schritte sind täglich zu wiederholen. Die Belebtschlammanlage ist unter Beachtung folgender Kriterien ordnungsgemäß zu betreiben: Der Überstand sollte klar sein und einen pH-Wert von 7 ± 1 aufweisen, die Temperatur sollte 25 ± 2 °C betragen, der Schlamm sollte sich gut absetzen, die Anlage sollte ausreichend belüftet werden, um die Mischung jederzeit aerob zu halten, es sollten Protozoa vorhanden sein, und die Aktivität des Schlamms sollte mindestens alle 3 Monate mit einer Referenzsubstanz überprüft werden. Vor Verwendung einer Schlammprobe als Inokulum muss die Anlage mindestens einen Monat, aber nicht länger als 4 Monate in Betrieb gewesen sein. Danach sind in regelmäßigen Abständen, alle 3 Monate, Proben an mindestens 10 Orten zu entnehmen.

▼B

Um frischen und alten Belebtschlamm bei gleicher Aktivität zu halten, wird der filtrierte Überstand des alten, bereits in der Prüfung verwendeten Belebtschlamms mit einem gleichen Teil Überstandsfiltrat einer frisch gewonnenen Mischung von zehn Orten gemischt. Die Gesamtmischung wird wie beschrieben weitergezüchtet. Als Inokulum sind Schlammproben erst 18-24 h nach Beschickung der Anlage zu verwenden.

VII.2.4. **Ansatz der Flaschen**

Es sind folgende sechs Flaschen anzusetzen:

Nr. 1: 100 mg/l Prüfsubstanz in Verdünnungswasser

Nr. 2, 3 und 4: 100 mg/l Prüfsubstanz in mineralischem Medium

Nr. 5: 100 mg/l Referenzsubstanz (z. B. Anilin) in mineralischem Medium

Nr. 6: nur mineralisches Medium

Schwerlösliche Prüfsubstanzen werden gewichts- oder volumenbezogen direkt in die Flasche gegeben oder entsprechend Anlage 3 behandelt (mit der Abweichung, dass weder Lösungsmittel noch Emulgatoren verwendet werden dürfen). Das $CO_2$-Absorbens wird allen Flaschen in die dafür vorgesehenen Behälter gegeben und der pH-Wert in den Flaschen Nr. 2, 3 und 4 auf 7,0 eingestellt.

VII.2.5. **Durchführung der Prüfung**

Die Flaschen Nr. 2, 3 und 4 (Prüfsuspensionen), Nr. 5 (Aktivitätsprüfung) und Nr. 6 (Inokulum-Blindversuch) werden mit einer geringen Menge Inokulum angeimpft, um eine Konzentration an suspendierten Feststoffen von 30 mg/l zu erhalten. Flasche Nr. 1, die als abiotische Kontrolle dient, erhält kein Inokulum. Anschließend ist die Versuchsanordnung aufzubauen, auf Luftabschluss zu prüfen, die Rührgeräte anzustellen und mit der Messung der Sauerstoffaufnahme im Dunkeln zu beginnen. Es sind tägliche Kontrollen der Temperatur, des Rührgeräts und des coulometrischen Registriergeräts für die Sauerstoffaufnahme vorzunehmen und eventuelle Farbänderungen des Flascheninhalts zu protokollieren. Die Sauerstoffaufnahme für die sechs Flaschen ist direkt mit Hilfe eines geeigneten Geräts, zum Beispiel am Sechsfachschreiber abzulesen, der eine BSB-Kurve erzeugt. Am Ende der Inkubation, normalerweise nach 28 Tagen, sind die pH-Werte der Flascheninhalte zu messen und die Konzentration der restlichen Prüfsubstanz sowie möglicher Abbauprodukte und, im Falle wasserlöslicher Stoffe, die DOC-Konzentration zu bestimmen (Anlage 2.4). Besondere Vorsicht ist bei flüchtigen Substanzen geboten. Ist eine Nitrifikation zu erwarten, sind — wenn möglich — Nitrat- und Nitritkonzentration zu bestimmen.

VII.3. DATEN UND ABSCHLUSSBERICHT

VII.3.1. **Auswertung der Ergebnisse**

Die Sauerstoffaufnahme (mg) durch die Prüfsubstanz nach einer vorgegebenen Zeit (korrigiert um die Sauerstoffaufnahme der Inokulum-Blindkontrolle nach der gleichen Zeit) ist durch die Menge der verwendeten Prüfsubstanz zu dividieren. Dadurch erhält man den BSB, angegeben als mg Sauerstoff pro mg Prüfsubstanz:

$$\text{BSB} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ – Aufn. Prüfsubst. – mg } O_2 \text{ – Aufn. Blindkontrolle})}{(\text{mg Prüfsubst. in der Flasche})}$$

= mg $O_2$ pro mg Prüfsubstanz

▼B

Der prozentuale biologische Abbau ist dann wie folgt zu berechnen:

$$\% \text{ biolog. Abbau} = \% \text{ ThSB} = \frac{\text{BSB (mg } O_2/\text{mg Prüfsubstanz)}}{\text{ThSB (mg } O_2/\text{mg Prüfsubstanz)}} \times 100$$

Bei Mischungen ist der ThSB aus der Elementanalyse — wie für einfache Verbindungen — zu berechnen. Der zu verwendende ThSB-Wert ($ThSB_{NH4}$ oder $ThSB_{NO3}$) richtet sich danach, ob keine oder eine vollständige Nitrifikation stattgefunden hat (Anlage 2.2). Bei auftretender, jedoch unvollständiger Nitrifikation, ist ein Korrekturfaktor für den durch die Nitrifikation verbrauchten Sauerstoff aus den Änderungen der Nitrit- und Nitratkonzentration zu berechnen (Anlage 5).

Der prozentuale biologische Primärabbau wird aus dem Verlust an spezifischer (Ausgangs-)Substanz ermittelt (vgl. I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Wird in Flasche Nr. 1 bei der Bestimmung des physikalisch-chemischen Abbaus ein Verlust an Prüfsubstanz festgestellt, so ist dies zu protokollieren und die Konzentration der Prüfsubstanz ($S_b$) nach 28 Tagen in dieser Flasche zur Berechnung des prozentualen biologischen Abbaus zu verwenden.

Wenn DOC-Bestimmungen vorgenommen werden (wahlweise), dann ist der prozentuale biologische Endabbau entsprechend I.7.1. aus

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

zu berechnen. Wird in Flasche Nr. 1 bei der Bestimmung des physikalisch-chemisch bedingten Abbaus eine Abnahme an DOC festgestellt, so ist die DOC-Konzentration in dieser Flasche zur Berechnung des prozentualen biologischen Abbaus zu verwenden.

Sämtliche Ergebnisse sind auf den beigefügten Datenblättern zu protokollieren.

VII.3.2. **Gültigkeit der Ergebnisse**

Die Sauerstoffaufnahme in dem Inokulum-Blindansatz liegt normalerweise bei 20-30 mg/l $O_2$ und sollte nach 28 Tagen einen Wert von 60 mg/l nicht überschreiten. Bei Werten über 60 mg/l sollten die Daten und die Versuchsdurchführung kritisch überprüft werden. Liegt der pH-Wert außerhalb des Bereichs 6-8,5 und der Sauerstoffverbrauch durch die Prüfsubstanz unter 60 %, ist der Test mit einer geringeren Konzentration an Prüfsubstanz zu wiederholen.

Vgl. auch I.5.2.

Wenn der aus dem Sauerstoffverbrauch berechnete prozentuale Abbau des Anilins nach 7 Tagen nicht mehr als 40 % und nach 14 Tagen nicht mehr als 65 % beträgt, wird der Test als ungültig betrachtet.

VII.3.3. **Abschlussbericht**

Vgl. I.8.

VII.4. DATENBLATT

Nachstehend ein Beispiel eines Datenblatts

MITI-(I)-TEST

1. **LABOR**

2. **DATUM BEI VERSUCHSBEGINN**

▼B

3. **PRÜFSUBSTANZ**

Name:

Konzentration der Stammlösung: ... mg/l auf Substanz bezogen

Anfangskonzentration im Medium, $C_o$: ... mg/l auf Substanz bezogen

Volumen des Reaktionsgemisches, V: ... ml

ThSB: ... mg $O_2$/l

4. **INOKULUM**

Entnahmeorte:

1) … 6) …
2) … 7) …
3) … 8) …
4) … 9) …
5) … 10) …

Konzentration der suspendierten Feststoffe im Belebtschlamm nach Akklimatisierung mit synthetischen Abwässern = ... mg/l

Menge Belebtschlamm pro Liter im Versuchsansatz = ... ml

Konzentration des Schlamms im Versuchsansatz = ... mg/l

5. **SAUERSTOFFAUFNAHME: BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT**

Verwendeter respirometertyp:

| | | | Zeit (Tage) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Aufnahme (mg) Prüfsubstanz | $a_1$ | | | | | | |
| | $a_2$ | | | | | | |
| | $a_3$ | | | | | | |
| $O_2$ Aufnahne (mg) Blindwert | b | | | | | | |
| Korrigierte $O_2$-Aufnahne (mg) | $(a_1 - b)$<br>$(a_2 - b)$<br>$(a_3 - b)$ | | | | | | |
| BSB pro mg Prüfsubstanz | $\frac{(a-b)}{C_o V}$ | Flasche 1 | | | | | |
| | | Flasche 2 | | | | | |
| | | Flasche 3 | | | | | |
| % Abbau<br>$\frac{BOD}{ThOD} \times 100$ | | 1 | | | | | |
| | | 2 | | | | | |
| | | 3 | | | | | |
| | | Mittelwert (*) | | | | | |

(*) Bei erheblichem Unterschied sollten die Parallelansätze nicht gemittelt werden.

▼B

*Anmerkung*: Für die Referenzsubstanz sowie Toxizitätskontrolle können ähnliche Formblätter verwendet werden.

6. **KOHLENSTOFFANALYSE** (wahlweise)**:**

Kohlenstoffanalysator: ...

| Flasche | DOC | | | | %DOC-Abnahme | Mittelwert |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Gemessener | | Korrigierter | | | |
| Wasser + Prüfsubstanz | a | | | | — | — |
| Schlamm + Prüfsubstanz | $b_1$ | | $b_1$ - c | | | |
| Schlamm + Prüfsubstanz | $b_2$ | | $b_2$ - c | | | |
| Schlamm + Prüfsubstanz | $b_3$ | | $b_3$ - c | | | |
| Blindkontrolle | c | | — | | — | — |

% DOC Abnahme: $\frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$

7. **DATEN AUS DER SPEZIFISCHEN ANALYSE**

| | Restliche Menge an Prüfsubstanz zu Versuchsende | % Abbau |
|---|---|---|
| Blindversuch mit Wasser | $S_b$ | |
| Angeimpftes Medium | $S_{a1}$ | |
| | $S_{a2}$ | |
| | $S_{a3}$ | |

$$\% \text{ Abbau} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Der prozentuale Abbau ist für die Flaschen a1, a2 bzw. a3 zu berechnen

8. **ANMERKUNGEN**

Nach Möglichkeit ist die BSB-Zeit-Kurve beizufügen.

▼B

*Anlage 1*

**ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN**

DO: Gelöster Sauerstoff (Dissolved Oxygen) (mg/l) — Konzentration des in einer wässrigen Probe gelösten Sauerstoffs.

BSB: Biochemischer Sauerstoffbedarf (g) — von den Mikroorganismen beim Abbau einer Prüfsubstanz verbrauchte Sauerstoffmenge; auch angegeben als g Sauerstoffaufnahme pro g Prüfsubstanz (vgl. Methode C.5).

CSB: Chemischer Sauerstoffbedarf (g) — bei der Oxidation einer Prüfsubstanz mit heißem, saurem Dichromat verbrauchte Sauerstoffmenge; Maß für die vorhandene Menge an oxidierbarer Substanz; auch angegeben als g Sauerstoffverbrauch pro g Prüfsubstanz (vgl. Methode C.6).

DOC: Gelöster organischer Kohlenstoff (Dissolved Organic Carbon) — Menge an organischem Kohlenstoff, die in der Lösung vorliegt oder ein Filter mit 0,45 um Porengröße passiert bzw. nach 15 Minuten Zentrifugieren bei 40 000 $m/s^{-2}$ (± 4 000 g) im Überstand verbleibt.

ThSB: Theoretischer Sauerstoffbedarf (mg) — Gesamtmenge an Sauerstoff, die zur vollständigen Oxidation einer Substanz erforderlich ist; wird aus der Summenformel berechnet (siehe Anlage 2.2); auch angegeben als mg Sauerstoffbedarf pro mg Prüfsubstanz.

$ThCO_2$: Theoretisches Kohlendioxid (mg) — Kohlendioxidmenge, die sich rechnerisch aus dem bekannten oder gemessenen Kohlenstoffgehalt der Prüfsubstanz bei vollständiger Mineralisation ergibt; auch angegeben als mg Kohlendioxidentwicklung pro mg Prüfsubstanz.

TOC: Gesamter organischer Kohlenstoff (Total Organic Carbon) einer Probe — Summe des organischen Kohlenstoffs in Lösung und in Suspension.

IC: Anorganischer Kohlenstoff (Inorganic Carbon).

TC: Gesamtkohlenstoff (Total Carbon) — Summe des in einer Probe enthaltenen organischen und anorganischen Kohlenstoffs.

*Biologischer Primärabbau:*

durch biologische Prozesse in der chemischen Struktur einer Substanz herbeigeführte Veränderung, die zum Verlust spezifischer Eigenschaften dieser Substanz führt.

*Biologischer Gesamtabbau (aerob):*

der nach vollständiger Umsetzung durch Mikroorganismen erreichte Abbaugrad der Prüfsubstanz unter Erzeugung von Kohlendioxid, Wasser, Mineralsalzen und neuen mikrobiellen Zellbestandteilen (Biomasse).

*biologisch leicht abbaubar:*

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

▼B

*potenziell biologisch abbaubar:*

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

*in einer Kläranlage abbaubar:*

Eigenschaft chemischer Substanzen, im Verlauf der biologischen Abwasserbehandlung entfernt zu werden, ohne dass der normale Betrieb der Klärprozesse negativ beeinträchtigt wird. Im Allgemeinen sind biologisch leicht abbaubare Substanzen in einer Kläranlage abbaubar, nicht aber alle potenziell abbaubaren Substanzen. Hier können auch abiotische Prozesse stattfinden.

*Lag-Phase*

in einem Abbaubarkeitstest die Zeit zwischen der Animpfung und dem Zeitpunkt, zu dem der prozentuale Abbau mindestens 10 % erreicht hat. Die Lag-Phase ist häufig sehr variabel und schwer reproduzierbar.

*Abbauzeit*

Zeit vom Ende der Lag-Phase bis zu dem Zeitpunkt, zu dem 90 % des maximalen Abbauwerts erreicht sind.

*10- Tage-Fenster*

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

▼B

*Anlage 2*

**BERECHNUNG UND BESTIMMUNG GEEIGNETER SUMMENPARAMETER**

Je nach der gewählten Methode werden bestimmte Summenparameter benötigt. Nachfolgend wird die Ableitung dieser Werte beschrieben. Die Verwendung dieser Parameter wird bei den einzelnen Methoden angegeben.

1. **Kohlenstoffgehalt**

Der Kohlenstoffgehalt wird aus der bekannten Elementzusammensetzung berechnet oder durch Elementanalyse der Prüfsubstanz bestimmt.

2. **Theoretischer Sauerstoffbedarf (ThSB)**

Der Theoretische Sauerstoffbedarf (ThSB) kann berechnet werden, wenn die Summenformel bekannt ist oder durch Elementaranalyse bestimmt wird. Für die Substanz

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

beträgt sie ohne Nitrifikation

$$ThSB_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

bzw. mit Nitrifikation

$$ThSB_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)**

Der Chemische Sauerstoffbedarf (CSB) wird nach Methode C.6 bestimmt.

4. **Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC)**

Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) ist per definitionem der organische Kohlenstoff, der bei Filtration einer chemischen Substanz oder Gemischs in Wasser durch ein Filter mit 0,45 m Porengröße in dieser verbleibt.

Dazu werden Proben aus den Prüfgefäßen entnommen und sofort im Filtrationsgerät unter Verwendung eines geeigneten Membranfilters filtriert. Die ersten 20 ml (diese Menge kann bei Verwendung kleiner Filter verringert werden) des Filtrats werden verworfen. 10-20 ml oder — bei Injektion — weniger (je nach der für den Kohlenstoffanalysator benötigten Menge) werden für die Kohlenstoffanalyse zurückbehalten. Die DOC-Konzentration wird mit Hilfe eines organischen Kohlenstoffanalysators bestimmt, der eine genaue Messung einer Kohlenstoffkonzentration von 10 % oder weniger der im Versuch verwendeten DOC-Ausgangs-Konzentration ermöglichen muss.

Filtrierte Proben, die am selben Arbeitstag nicht mehr analysiert werden können, können 48 h im Kühlschrank bei 2-4 °C bzw. über längere Zeiträume bei Temperaturen unter - 18 °C aufbewahrt werden.

*Anmerkungen:*

*Membranfilter* sind häufig mit oberflächenaktiven Substanzen versehen, die ihnen hydrophile Eigenschaften verleihen. Daher kann der Filter bis zu mehreren mg löslichen organischen Kohlenstoff enthalten, der die Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit beeinträchtigt. Um die oberflächenaktiven Substanzen sowie andere lösliche organische Verbindungen aus den Filtern zu entfernen, werden diese 3 × jeweils 1 Stunde in deionisiertem Wasser gekocht. Danach können die Filter eine Woche in Wasser aufbewahrt werden. Bei Verwendung von Einwegfilterpatronen ist jede einzelne darauf zu überprüfen, dass sie keinen löslichen organischen Kohlenstoff freisetzt.

▼B

Bestimmte Membranfilter haben die Eigenschaft, die Prüfsubstanz zu adsorbieren. Es wird daher empfohlen, die Filter in dieser Hinsicht zu überprüfen.

Anstelle der Filtration kann zur Differenzierung von TOC und DOC eine 15-minütige *Zentrifugation* bei 40 000 $m/s^{-2}$ (4 000 g) vorgenommen worden. Allerdings ist dieses Verfahren bei einer Ausgangskonzentration < 10 mg/l DOC nicht zuverlässig, da entweder nicht alle Bakterien beseitigt werden oder aber der Kohlenstoff als Bestandteil des Bakterienplasmas erneut gelöst wird.

*LITERATUR*


— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Publ. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, 65.

— Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuss Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

▼B

*Anlage 3*

## BEWERTUNG DER BIOLOGISCHEN ABBAUBARKEIT VON SCHWERLÖSLICHEN SUBSTANZEN

Bei Bioabbaubarkeitstests mit schwerlöslichen Substanzen ist folgenden Aspekten besondere Aufmerksamkeit zu schenken.

Während homogene Flüssigkeiten selten Probleme bei der Probenahme bereiten, wird empfohlen, Feststoffe durch geeignete Mittel zu homogenisieren, um so durch Inhomogenität bedingte Fehler zu vermeiden. Besondere Vorsicht ist geboten, wenn repräsentative Proben von nur wenigen mg von Mischungen bzw. Substanzen, die reich an Verunreinigungen sind, benötigt werden.

Während der Prüfungen können verschiedene Bewegungsvorgänge angewandt werden. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass nur so viel bewegt wird, um die Substanz gut zu verteilen, und dass ein Überhitzen, übermäßige Schaumbildung sowie übermäßige Scherkräfte vermieden werden.

Ein Emulgator, der der Substanz eine stabile Dispersion verleiht, kann verwendet werden. Dieser sollte allerdings nicht bakterientoxisch sein und darf unter den Bedingungen des Versuchs einem biologischen Abbau nicht unterliegen oder Schaum bilden.

Dieselben Kriterien wie für Emulgatoren gelten für Lösungsmittel.

Es wird davon abgeraten, für feste Prüfsubstanzen feste Trägerstoffe zu verwenden; für ölige Substanzen können diese allerdings geeignet sein.

Wenn Hilfsstoffe, wie z. B. Emulgatoren, Lösungsmittel und Trägerstoffe, verwendet werden, ist ein Blindversuch mit dem Hilfsstoff mitzuführen.

Zur Prüfung der biologischen Abbaubarkeit von schwerlöslichen Substanzen kann jeder der drei respirometrischen Tests — $CO_2$, BSB, MITI — eingesetzt werden.

*LITERATUR*

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradabilicy testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

*Anlage 4*

**BEURTEILUNG DER BIOLOGISCHEN ABBAUBARKEIT VON CHEMISCHEN SUBSTANZEN, BEI DENEN VERDACHT AUF TOXIZITÄT GEGENÜBER DEM INOKULUM BESTEHT**

Wenn eine Prüfsubstanz auf leichte biologische Abbaubarkeit getestet wird und biologisch nicht abbaubar scheint, wird folgendes Verfahren empfohlen, um zwischen Hemmung und stoffbedingter Nichtabbaubarkeit zu unterscheiden (Reynolds et al., 1987).

Für die Toxizitätsprüfung und den Test auf biologische Abbaubarkeit sind ähnliche oder gleiche Inokula zu verwenden.

Zur Bewertung der Toxizität von Prüfsubstanzen, die auf leichte biologische Abbaubarkeit getestet werden, erscheint die Anwendung einer oder einer Kombination der folgenden Methoden geeignet: Belebtschlamm: Prüfung der Atmungshemmung — Richtlinie 88/302/EWG, BSB und/oder Wachstumshemmung.

Um eine toxizitätsbedingte Hemmung zu vermeiden, wird empfohlen, dass die bei den Tests auf leichte biologische Abbaubarkeit verwendeten Prüfsubstanzkonzentrationen unter 1/10 der $EC_{50}$-Werte (oder unter den $EC_{20}$-Werten) aus dem Toxizitätsversuch liegen. Bei Verbindungen, deren $EC_{50}$-Wert über 300 mg/l liegt, sind toxische Wirkungen bei Prüfungen auf leichte biologische Abbaubarkeit unwahrscheinlich.

Bei $EC_{50}$-Werten unter 20 mg/l sind bei den nachfolgenden Tests ernste Probleme zu erwarten. Es müssen niedrige Prüfkonzentrationen verwendet werden, die allerdings die Anwendung des stringenten und empfindlichen Geschlossenen Flaschentests bzw. die Verwendung von $^{14}C$-markiertem Material erforderlich machen. Alternativ dazu kann ein akklimatisiertes Inokulum die Verwendung höherer Prüfkonzentrationen erlauben. Im letzteren Falle geht das spezifische Kriterium der leichten biologischen Abbaubarkeit jedoch verloren.

*LITERATUR*

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

*Anlage 5*

**BERÜCKSICHTIGUNG DER SAUERSTOFFAUFNAHME INFOLGE NITRIFIKATION**

Bei Prüfsubstanzen, die keinen Stickstoff enthalten, sind Fehler, die durch Nichtberücksichtigung der Nitrifikation bei der Bewertung der biologischen Abbaubarkeit anhand der Sauerstoffaufnahme entstehen, von marginaler Bedeutung (nicht größer als 5 %), selbst wenn die Oxidation des Ammonium-N im Medium zwischen dem Prüf- und dem Blindansatz gelegentlich schwankt. Bei stickstoffhaltigen Prüfsubstanzen kann es jedoch zu schweren Fehlern kommen.

Bei auftretender, jedoch unvollständiger Nitrifikation kann die Sauerstoffaufnahme durch das Reaktionsgemisch um den Sauerstoffverbrauch durch Oxidation von Ammonium zu Nitrit und Nitrat korrigiert werden, wenn die Konzentrationsänderungen von Nitrit und Nitrat während der Inkubation bestimmt und durch folgende Gleichungen berücksichtigt werden:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

insgesamt:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Aus Gleichung (1) ergibt sich, dass die Sauerstoffaufnahme zur Oxidation von 28 g Stickstoff [Bestandteil von Ammoniumchlorid ($NH_4Cl$)] zu Nitrit 96 g beträgt; dies entspricht einem Faktor von 3,43 (96/28). Auf die gleiche Weise ergibt sich aus Gleichung (3) für die Oxidation von 28 g Stickstoff zu Nitrat eine Sauerstoffaufnahme von 128 g; dies entspricht einem Faktor von 4,57 (128/28).

Da es sich hier um aufeinander folgende Reaktionen handelt, die auf verschiedene Bakterienarten zurückzuführen sind, kann die Nitritkonzentration zu- oder abnehmen; im letzteren Falle würde eine äquivalente Nitratkonzentration gebildet. Der bei der Nitratbildung verbrauchte Sauerstoff beträgt daher 4,57, multipliziert mit der Konzentrationszunahme des Nitrats, wohingegen der bei der Nitritbildung verbrauchte Sauerstoff 3,43 beträgt, multipliziert mit der Konzentrationszunahme des Nitrits. Bei einer Nitritabnahme beträgt der Sauerstoffverlust - 3,43, multipliziert mit der Abnahme der Konzentration.

Das heißt:

der bei der Nitratbildung verbrauchte $O_2$ = 4,57 × Zunahme in N-Nitratkonzentration (4)

und

der bei der Nitritbildung verbrauchte $O_2$ = 3,43 × Zunahme in N-Nitritkonzentration (5)

und

$O_2$-Verlust bei der Nitritabnahme = Abnahme der N-Nitritkonzentration × - 3,43 (6)

so dass

$O_2$-Aufnahme infolge Nitrifikation = ± 3,43 × Änderung der N-Nitritkonzentration + 4,57 × Zunahme der N-Nitratkonzentration (7)

und infolgedessen

$O_2$-Aufnahme durch Oxidation von C = festgestellte Gesamtaufnahme — Aufnahme infolge Nitrifikation (8).

Wenn andererseits nur der gesamte oxidierte N bestimmt wird, kann für die Sauerstoffaufnahme infolge Nitrifikation in erster Näherung ein Wert von 4,57 × Zunahme an oxidiertem N angenommen werden.

Der korrigierte Wert für den Sauerstoffverbrauch infolge Oxidation von C wird dann mit dem $ThSB_{NH4}$, berechnet nach Anlage 2, verglichen.

▼B

## C.5. ABBAUBARKEIT — BIOCHEMISCHER SAUERSTOFFBEDARF

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Zweck des Verfahrens ist die Messung des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB) fester oder flüssiger organischer Substanzen.

Die mit diesem Verfahren erzielbaren Prüfergebnisse gelten in erster Linie für wasserlösliche Substanzen; flüchtige und in Wasser schwer lösliche Verbindungen können zumindest grundsätzlich auch mit diesem Verfahren geprüft werden.

Die Methode ist nur für solche organischen Substanzen anwendbar, die bei den im Test verwendeten Konzentrationen keine bakterienhemmende Wirkung haben. Ist eine Substanz bei der Prüfkonzentration nicht löslich, so sind gegebenenfalls besondere Verfahren wie Ultraschalldispersion anzuwenden, um eine ausreichende Dispersion der Prüfsubstanz sicherzustellen.

Angaben zur Toxizität der Prüfsubstanz können bei der Interpretation niedriger Ergebnisse und bei der Auswahl der geeigneten Testkonzentrationen von Nutzen sein.

#### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Der biochemische Sauerstoffbedarf (BSB) wird definiert als die Menge an gelöstem Sauerstoff, die zur biochemischen Oxidation einer bestimmten Menge einer gelösten Substanz unter den vorgeschriebenen Bedingungen notwendig ist.

Die Ergebnisse werden dargestellt als g biochemischer Sauerstoffbedarf (BSB) pro g Prüfsubstanz.

#### 1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Es wird empfohlen, eine geeignete Referenzsubstanz zur Überprüfung der Inokulumaktivität zu verwenden.

#### 1.4. PRINZIP DER METHODE

Eine vorher bestimmte Menge der Prüfsubstanz wird in einem geeigneten sauerstoffreichen Medium gelöst oder dispergiert und anschließend mit einem Inokulum angeimpft sowie bei einer konstanten Umgebungstemperatur im Dunkeln inkubiert.

Der BSB wird aus der Differenz des Gehalts an gelöstem Sauerstoff vor Beginn und nach Ende des Tests bestimmt. Die Testdauer muss mindestens 5 Tage, darf jedoch nicht mehr als 28 Tage betragen.

Parallel zu diesem Test ist ein Blindversuch ohne die Prüfsubstanz durchzuführen.

#### 1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Die BSB-Bestimmung kann nicht als valide Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit eines Stoffes angesehen werden. Dieser Test ist nur als „Screening“-Test zu betrachten.

#### 1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

Je nach Prüfverfahren wird eine Lösung oder Dispersion der Prüfsubstanz in einer geeigneten Konzentration vorbereitet. Dann wird der BSB nach einem geeigneten national oder international standardisierten Verfahren ermittelt.

▼B

2. **DATEN UND AUSWERTUNG**

Der in der Lösung enthaltene BSB wird entsprechend dem gewählten Standardverfahren berechnet und in g Sauerstoffbedarf/g Prüfsubstanz umgerechnet.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

Die angewandte Methode ist anzugeben.

Als biochemischer Sauerstoffbedarf ist der Mittelwert von mindestens drei gültigen Messergebnissen anzugeben.

Alle für die Interpretation der Ergebnisse wichtigen Informationen und Bemerkungen sind anzugeben, insbesondere hinsichtlich Verunreinigungen, Aggregatzustand, toxischer Wirkungen und inhärenter Zusammensetzung der Prüfsubstanz, die die Ergebnisse beeinflussen können.

Wird ein Zusatz zur Hemmung der biologischen Nitrifikation verwendet, muss dies angegeben werden.

4. LITERATUR

Verzeichnis der standardisierten Verfahren, z. B.

NF T 90-103: Determination of the Biochemical Oxygen Demand.

NBN 407: Biochemical Oxygen Demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The Determination of Biochemical Oxygen Demand (Methods for the examination of Water and Associated Materials, HMSO, London).

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. **ABBAUBARKEIT — CHEMISCHER SAUERSTOFFBEDARF**

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

Zweck des Verfahrens ist die Messung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) fester oder flüssiger organischer Stoffe unter bestimmten standardisierten Laborbedingungen.

Zur Durchführung dieses Tests sowie zur Interpretation der Testergebnisse sind Angaben über die chemische Formel der Prüfsubstanz von Nutzen (z. B. der Gehalt an Halogensalzen, Eisensalze organischer Substanzen oder chlorierten Kohlenwasserstoffen).

1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Der chemische Sauerstoffbedarf ist ein Maß für die Oxidierbarkeit einer Substanz, ausgedrückt als diejenige Sauerstoffmenge eines oxidierenden Reagenzmittels, die eine Prüfsubstanz unter definierten Laborbedingungen verbraucht.

Das Testergebnis wird in g chemischer Sauerstoffverbrauch/g Prüfsubstanz angegeben.

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Referenzsubstanzen müssen nicht immer bei der Prüfung neuer Stoffe eingesetzt werden. Sie sollten jedoch von Zeit zu Zeit primär zur Eichung der Messmethode benutzt werden, um auf diese Weise eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse, die mit anderen Methoden erzielt wurden, zu ermöglichen.

1.4. PRINZIP DER METHODE

Eine vorher bestimmte Menge in Wasser gelöster oder dispergierter Substanz wird mit Kaliumdichromat in einem starken Schwefelsäuremedium in Gegenwart von Silbersulfat als Katalysator unter Rückfluss über zwei Stunden lang oxidiert. Das restliche Dichromat wird durch Titration mit standardisiertem Ammoniumeisen(II)sulfat bestimmt.

Im Falle chlorhaltiger Substanzen wird zur Vermeidung von Störungen durch Chloride Quecksilbersulfat (*) zugefügt.

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Wegen der willkürlichen Art des Nachweises ist der chemische Sauerstoffbedarf ein „Oxidierbarkeitsindikator“ und wird als solcher als praktischer Parameter zur Messung des Gehalts an organischer Substanz verwendet.

Chloride können das Testergebnis verfälschen. Anorganische Reduktions- oder Oxidationsmittel können die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs ebenfalls stören.

Einige zyklische Verbindungen und zahlreiche flüchtige Substanzen (z. B. niedere Fettsäuren) werden in diesem Test nicht vollständig oxidiert.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

Zuerst wird eine Lösung oder eine Dispersion der Testsubstanz hergestellt, um einen CSB zwischen 250 und 600 mg/l zu erzielen.

(*) Nach der Verwendung sollten Quecksilbersalz enthaltende Lösungen zur Vermeidung des Eintrags von Quecksilber in die Umwelt behandelt werden.

▼B

*Bemerkung:*

Im Falle schwerlöslicher oder nicht dispergierbarer Substanzen kann eine bestimmte Menge pulverförmiger oder flüssiger Prüfsubstanz entsprechend einem CSB von 5 mg abgewogen werden und in die Versuchsgefäße mit Wasser gegeben werden.

Der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) wird häufig und besonders bei schwerlöslichen Substanzen vorzugsweise mit Hilfe einer Variante des Verfahrens bestimmt, d. h. in einem geschlossenen System mit Druckausgleich (H. Kelkenberg, 1975). Mit diesem modifiziertem Verfahren können Substanzen, die mit dem herkömmlichen Verfahren nur schwer zu bestimmen sind — wie z. B. Essigsäure —, in vielen Fällen erfolgreich quantifiziert werden. Diese Methode versagt jedoch im Fall von Pyridin. Wird die Kaliumdichromatkonzentration, wie in (1) vorgeschrieben, auf 0,25 N (0,0416 M) erhöht, wird die Direkteinwaage von 5-10 mg Substanz erleichtert, was für die CSB-Bestimmung schwer wasserlöslicher Substanzen wichtig ist (2).

Ansonsten kann der CSB nach jedem geeigneten nationalen oder internationalen standardisierten Verfahren bestimmt werden.

2. **DATEN UND AUSWERTUNG**

Der in den Versuchsflaschen auftretende CSB-Wert wird mit Hilfe der jeweils gewählten standardisierten Methode berechnet und in g chemischen Sauerstoffbedarfs pro g Testsubstanz ausgedrückt.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

Die verwendete Referenzmethode ist anzugeben.

Der chemische Sauerstoffbedarf sollte aus mindestens drei Messwerten gemittelt werden. Der Bericht sollte alle für die Interpretation der Messergebnisse relevanten Informationen und Bemerkungen enthalten, die die Testergebnisse beeinflussen könnten, z. B. Verunreinigungen der Prüfsubstanz, physikalischer Zustand und die Zusammensetzung der Substanz (falls bekannt).

Die Verwendung von Quecksilbersulfat zur Verminderung von Störungen durch Chlorid muss erwähnt werden.

4. **LITERATUR**

(1) Kelkenberg, H. Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13,169.

Liste der standardisierten Verfahren, z. B.:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 — water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling von het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

## C.7. ABBAUBARKEIT — ABIOTISCHER ABBAU: HYDROLYSE IN ABHÄNGIGKEIT VOM pH-WERT

### 1. METHODE

Diese Testmethode entspricht OECD TG 111 (2004).

### 1.1. EINLEITUNG

Chemikalien können auf unterschiedlichen Wegen in Oberflächengewässer gelangen, z. B. durch direkte Applikation, Sprühmittelabtrift, Ablauf, Entwässerung, Abfallentsorgung, Industrie-, Haushalts- oder Landwirtschaftsabwässer oder über atmosphärische Deposition, und können in diesen Gewässern durch chemische (z. B. Hydrolysereaktionen, Oxidation), fotochemische und/oder mikrobielle Prozesse umgewandelt werden. In der vorliegenden Richtlinie wird eine Labortestmethode zur Beurteilung der abiotischen hydrolytischen Umwandlung von Chemikalien in Wassersystemen bei pH-Werten beschrieben, wie sie normalerweise in der Umwelt vorkommen (pH 4-9); diese Richtlinie stützt sich auf bestehende Richtlinien (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Durch diese Tests soll i) die Hydrolysegeschwindigkeit der Testsubstanz in Abhängigkeit vom pH-Wert und ii) die Beschaffenheit bzw. Art sowie die Geschwindigkeit der Entstehung und des Rückgangs von Hydrolyseprodukten ermittelt werden, denen die Organismen ausgesetzt sein können. Derartige Studien sind für Chemikalien erforderlich, die direkt dem Wasser zugesetzt werden oder voraussichtlich durch die sonstigen oben beschriebenen Wege in die Umwelt gelangen.

### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

Siehe Anlage 2.

### 1.3. ANWENDUNGSBEREICH DER TESTMETHODE

Die Testmethode ist generell auf (markierte oder unmarkierte) chemische Substanzen anwendbar, für die eine Analysemethode mit ausreichender Genauigkeit und Empfindlichkeit zur Verfügung steht. Sie kann Anwendung finden für leicht flüchtige und nichtflüchtige Verbindungen mit ausreichender Wasserlöslichkeit. Der Test darf dagegen an Chemikalien, die in Wasser hochgradig flüchtig sind (z. B. Fumiganzien, organische Lösungsmittel) und daher unter den Versuchsbedingungen dieses Tests nicht in Lösung gehalten werden können, nicht durchgeführt werden. Die Durchführung des Tests an Substanzen, die in Wasser nur minimal löslich sind, ist möglicherweise nur erschwert möglich (8).

### 1.4. PRINZIP DER TESTMETHODE

Sterile wässrige Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten (pH 4, 7 und 9) werden mit der Testsubstanz behandelt und im Dunkeln unter kontrollierten Laborbedingungen (bei konstanter Temperatur) inkubiert. Nach entsprechenden Zeitintervallen werden die Pufferlösungen auf die Testsubstanz und Hydrolyseprodukte analysiert. Bei Verwendung einer markierten Testsubstanz (z. B. mit $^{14}C$) lässt sich die Stoffbilanz leichter erstellen.

Diese Testmethode ist als mehrstufiges Konzept angelegt (siehe Darstellung und Erläuterung in Anlage 1). Die einzelnen Stufen des Tests werden durch die Ergebnisse der jeweils vorherigen Stufe gestartet.

▼B

1.5. INFORMATIONEN ZUR TESTSUBSTANZ

Für die Messung der Hydrolysegeschwindigkeit können markierte oder nicht markierte Testsubstanzen verwendet werden. Normalerweise sollte vorzugsweise markiertes Material zur Messung der Hydrolysewege und zur Ermittlung der Stoffbilanz verwendet werden; in bestimmten Sonderfällen ist eine Markierung allerdings nicht unbedingt notwendig. Die Markierung mit $^{14}C$ wird empfohlen, andere Isotope wie $^{13}C$, $^{15}N$ oder $^{3}H$ sind jedoch ggf. ebenfalls geeignet. Die Markierung ist — soweit möglich — im stabilsten Teil des Moleküls anzuordnen. Enthält die Testsubstanz beispielsweise einen Ring, muss die Markierung auf dem Ring erfolgen; enthält die Testsubstanz zwei oder mehr Ringe, sind evtl. separate Untersuchungen zum Verhalten der einzelnen markierten Ringe und zur Ermittlung geeigneter Informationen zur Bildung von Hydrolyseprodukten notwendig. Die Testsubstanz muss eine Reinheit von mindestens 95 % aufweisen.

Vor der Durchführung von Hydrolysetests müssen folgende Informationen zur Testsubstanz vorliegen:

a) Löslichkeit in Wasser (Testmethode A.6),

b) Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln,

c) Dampfdruck (Testmethode A.4) und/oder Konstante des Henryschen Gesetzes,

d) Verteilungskoeffizient n-Oktanol/Wasser (Testmethode A.8);

e) Dissoziationskonstante ($pK_a$) (OECD-Richtlinie 112) (9);

f) direkte und indirekte Fototransformationsgeschwindigkeit in Wasser (soweit relevant).

Es müssen Analysemethoden für die Quantifizierung der Testsubstanz sowie — sofern relevant — für die Identifizierung und Quantifizierung der Hydrolyseprodukte in wässrigen Lösungen zur Verfügung stehen (siehe auch Abschnitt 1.7.2).

1.6. REFERENZSUBSTANZEN

Soweit möglich, sollten Referenzsubstanzen zur Identifizierung und Quantifizierung von Hydrolyseprodukten durch Spektroskopie- und Chromatografieverfahren oder andere ausreichend genaue Methoden verwendet werden.

1.7. QUALITÄTSKRITERIEN

1.7.1. **Wiederfindungsrate**

Die Analyse von mindestens zwei Pufferlösungen oder deren Extrakten unmittelbar nach der Zugabe der Testsubstanz gibt einen ersten Hinweis auf die Wiederholbarkeit der Analysemethode und die gleichmäßige Verteilung der Testsubstanz bei der Applikation der Testsubstanz. Die Wiederfindungsraten für spätere Versuchsphasen ergeben sich aus den jeweiligen Massenbilanzen (bei Verwendung markierter Substanzen). Die Wiederfindungsraten müssen bei markierten und unmarkierten Chemikalien zwischen 90 % und 110 % liegen (7). Falls es sich als technisch schwierig erweist, diese Wiederfindungsrate zu erreichen, ist bei unmarkierten Chemikalien eine Wiederfindungsrate von 70 % zulässig, allerdings ist dies entsprechend zu begründen.

▼B

1.7.2. **Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit der Analysemethoden**

Die Wiederholbarkeit der Analysemethode(n), die zur späteren Quantifizierung der Testsubstanz und der Hydrolyseprodukte verwendet werden, kann durch eine parallele Analyse derselben Pufferlösungen (oder ihrer Extrakte) überprüft werden, nachdem sich ausreichende Mengen an Hydrolyseprodukten für die Quantifizierung gebildet haben.

Die Analysemethode muss eine ausreichende Empfindlichkeit aufweisen, mit der die Quantifizierung der Konzentrationen der Testsubstanz bis auf 10 % der Anfangskonzentration oder weniger möglich ist. Sofern relevant, müssen die Analysemethoden außerdem eine ausreichende Empfindlichkeit für die Quantifizierung von Hydrolyseprodukten aufweisen, die 10 % der (zu einem beliebigen Zeitpunkt während der Studie) eingebrachten Konzentration oder mehr oder aber 25 % oder weniger der Spitzenkonzentration darstellt.

1.7.3. **Konfidenzintervalle für Kinetikdaten der Hydrolyse**

Die Konfidenzintervalle sind für sämtliche Regressionskoeffizienten, Geschwindigkeitskonstanten, Halbwertszeiten und sonstigen kinetischen Parameter rechnerisch zu ermitteln und darzustellen (z. B. $DT_{50}$).

1.8. BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.8.1. **Geräte und Apparatur**

Die Untersuchung ist in Glasgefäßen (z. B. Reagenzgläser, kleine Kolben) unter abgedunkelten und sterilen Bedingungen (sofern erforderlich) durchzuführen, sofern nicht bereits vorliegende Informationen (wie der n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) darauf hindeuten, dass die Testsubstanz möglicherweise am Glas anhaftet. In diesen Fällen sollte die Verwendung alternativer Materialien (wie Teflon) geprüft werden. Mitunter lässt sich das Problem der Anhaftung an Glas auch durch eine oder mehrere der folgenden Methoden mildern:

— Bestimmung der Masse der am Glas sorbierten Testsubstanz und Hydrolyseprodukte,

— Verwendung eines Ultraschallbades,

— Waschen sämtlicher Glasartikel mit Lösungsmittel bei jedem Probenahmeintervall,

— Verwendung formulierter Produkte,

— Verwendung einer größeren Menge an Zusatzlösungsmittel für die Zugabe der Testsubstanz zum System; wird ein Zusatzlösungsmittel verwendet, sollte dieses so beschaffen sein, dass es keine Hydrolysierung der Testsubstanz verursacht.

Normalerweise werden temperaturgeregelte Wasserbad-Schüttelvorrichtungen oder thermostatgeregelte Inkubatoren für die Inkubation der verschiedenen Testlösungen benötigt.

Außerdem werden Standard-Laborgeräte benötigt, insbesondere folgende Geräte:

— pH-Messgerät,

▼B

— Analyseinstrumente wie GC-, HPLC-, TLC-Geräte einschließlich der entsprechenden Detektionssysteme zur Analyse radioaktiv markierter und unmarkierter Substanzen oder für die inverse Isotopenverdünnungsmethode,

— Instrumente zu Identifikationszwecken (z. B. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR usw.),

— Flüssigkeits-Szintillationszähler,

— Trenntrichter für Flüssig-Flüssig-Extraktionen,

— Instrumentierung für die Konzentration von Lösungen und Extrakten (z. B. Rotationsverdampfer),

— Temperaturregelungsvorrichtung (z. B. Wasserbad).

Zu den chemischen Reagenzien gehören unter anderem:

— organische Lösungsmittel (analysenrein) wie Hexan, Dichlormethan usw.,

— Szintillationsflüssigkeit,

— Pufferlösungen (Details siehe Abschnitt 1.8.3).

Sämtliche Glasgeräte sowie das analysenreine Wasser und die Pufferlösungen, die in den Hydrolysetests verwendet werden, sind zu sterilisieren.

1.8.2. **Applikation der Testsubstanz**

Die Testsubstanz ist als wässrige Lösung in die verschiedenen Pufferlösungen einzugeben (siehe Anlage 3). Soweit zur Herstellung einer ausreichenden Auflösung erforderlich, ist die Verwendung geringer Mengen wassermischbarer Lösungsmittel (wie Acetonitril, Aceton, Ethanol) für die Applikation und Verteilung der Testsubstanz zulässig, allerdings darf dies normalerweise 1 % v/v nicht überschreiten. Falls eine höhere Lösungsmittelkonzentration erwogen wird (beispielsweise bei schlecht löslichen Testsubstanzen), ist dies nur zulässig, wenn nachgewiesen werden kann, dass das Lösungsmittel die Hydrolyse der Testsubstanzen nicht beeinflusst.

Die Verwendung formulierter Produkte wird nicht grundsätzlich empfohlen, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Bestandteile der Formulierung den Hydrolysevorgang beeinflussen. Bei schlecht wasserlöslichen Testsubstanzen oder Substanzen, die an Glas anhaften (siehe Abschnitt 1.8.1), bietet sich jedoch die Verwendung formulierter Substanzen als geeignete Alternative an.

Die Testsubstanz ist in einer einzigen Konzentration zu verwenden; diese darf 0,01 M oder die Hälfte der Sättigungskonzentration nicht überschreiten (siehe Anlage 1).

▼B

1.8.3. **Pufferlösungen**

Der Hydrolyseversuch wird bei drei pH-Werten durchgeführt: 4, 7 und 9. Hierzu sind Pufferlösungen unter Verwendung von analysenreinen Chemikalien und Wasser vorzubereiten. Geeignete Beispiele für Puffersysteme sind in Anlage 3 dargestellt. Dabei ist darauf zu achten, dass das verwendete Puffersystem die Hydrolysegeschwindigkeit beeinflussen kann; werden entsprechende Erscheinungen festgestellt, ist eine andere Pufferlösung zu verwenden ([1]).

Der pH-Wert der einzelnen Pufferlösungen ist mit einem kalibrierten pH-Messgerät mit einer Messgenauigkeit von mindestens 0,1 bei der Solltemperatur zu kontrollieren.

1.8.4. **Testbedingungen**

1.8.4.1. *Testtemperatur*

Die Hydrolyseversuche sind bei konstanter Temperatur durchzuführen. Zur Extrapolation ist es wichtig, die Temperatur auf mindestens ± 0,5 °C zu halten.

Ist das Hydrolyseverhalten der Testsubstanz unbekannt, ist ein vorbereitender Test (Stufe 1) bei einer Temperatur von 50 °C durchzuführen. Kinetische Tests auf höherer Stufe sind bei mindestens drei Temperaturen (die auch den Test bei 50 °C einschließen) durchzuführen, sofern die Testsubstanz sich — wie bei den Tests auf Stufe 1 ermittelt — bei Hydrolyse stabil verhält. Es wird ein Temperaturbereich von 10-70 °C empfohlen (wobei möglichst mindestens eine der Temperaturen unter 25 °C liegen sollte), der sowohl die für die Berichterstellung zugrunde gelegte Temperatur von 25 °C als auch die meisten der in der Praxis vorkommenden Temperaturen umfasst.

1.8.4.2. *Licht und Sauerstoff*

Alle Hydrolyseversuche sind mit geeigneten Methoden durchzuführen, mit denen fotolytische Effekte vermieden werden können. Durch geeignete Maßnahmen ist außerdem eine Sauerstoffbildung (z. B. durch 5-minütiges Einblasen von Helium, Stickstoff oder Argon vor der Zubereitung der Lösung) zu vermeiden.

1.8.4.3. *Testdauer*

Der Vortest ist über einen Zeitraum von 5 Tagen durchzuführen, die Tests auf höherer Stufe sind durchzuführen, bis eine 90 %ige Hydrolyse der Testsubstanz erreicht ist oder ein Zeitraum von 30 Tagen abgelaufen sind (je nachdem, welcher Zeitpunkt zuerst erreicht ist).

1.8.5. **Durchführung des Tests**

1.8.5.1. *Vortest (Stufe 1)*

Der Vortest wird bei 50 ± 0,5 °C und pH-Werten von 4,0, 7,0 und 9,0 durchgeführt. Wird nach 5 Tagen eine Hydrolyse von weniger als 10 % festgestellt ($t_{0,525}$ °C > 1 Jahr), gilt die Testsubstanz als hydrolytisch stabil, und es sind normalerweise keine weiteren Tests erforderlich. Ist bekannt, dass die Substanz bei umwelttechnisch relevanten Temperaturen instabil ist, braucht kein Vortest durchgeführt zu werden. Die Analysemethode muss so präzise und empfindlich sein, dass eine Reduktion der ursprünglichen Konzentration um 10 % festgestellt werden kann.

([1]) Mabey und Mill empfehlen die Verwendung von Borat- oder Acetatpuffern statt Phosphat (11).

▼B

1.8.5.2. *Hydrolyse instabiler Substanzen (Stufe 2)*

Der (fortgeschrittene) Test auf höherer Stufe ist bei den pH-Werten durchzuführen, bei denen gemäß den Vorgaben des oben beschriebenen Vortests eine Instabilität der Testsubstanz festgestellt wurde. Die Pufferlösungen der Testsubstanzen sind durch Thermostatregelung auf den gewählten Temperaturen zu halten. Zur Durchführung der Tests auf Reaktionen erster Ordnung ist jede Reaktionslösung in zeitlichen Intervallen zu analysieren, die so angesetzt sein müssen, dass sich mindestens sechs zwischen 10 % und 90 % Hydrolyse der Testsubstanz normal verteilte Bezugspunkte ergeben. Die einzelnen Proben der wiederholten Gleichtests (eine Mindestanzahl von Doppelproben, die in separaten Reaktionsgefäßen enthalten sind) sind zu entfernen und der Inhalt ist bei jedem der mindestens sechs Probenahmepunkte zu analysieren (für mindestens zwölf Wiederholungs-Bezugspunkte). Die Verwendung einer einzigen Sammelprobe, aus der bei jedem Probenahmeintervall einzelne Probenanteile der Testlösung entnommen werden, gilt als unzureichend, da damit keine Analyse der Datenvariabilität möglich ist und Probleme durch Kontaminierung der Testlösung auftreten können. Tests zum Nachweis der Sterilität sind am Ende des höherrangigen Tests durchzuführen (z. B. bei 90 % Hydrolyse bzw. 30 Tage). Wird allerdings keine Zersetzung (d. h. Transformation) festgestellt, sind keine weiteren Sterilitätstests notwendig.

1.8.5.3. *Feststellung der Hydrolyseprodukte (Stufe 3)*

Umfangreichere Hydrolyseprodukte, zumindest jene, die > 10 % der eingebrachten Dosis entsprechen, sind durch entsprechende Analysemethoden festzustellen.

1.8.5.4. *Zusätzliche Tests*

Bei hydrolytisch instabilen Testsubstanzen sind evtl. weitere Tests bei anderen pH-Werten als 4, 7 und 9 erforderlich. So ist für physiologische Zwecke möglicherweise ein Test unter saureren Bedingungen (z. B. pH-Wert 1,2) bei einer einzigen physiologisch relevanten Temperatur (37° C) notwendig.

2. **DATEN**

Die Mengen der Testsubstanz und der Hydrolyseprodukte sind — soweit relevant — als Prozentsatz der eingebrachten Anfangskonzentration sowie in mg/l für jedes Probenahmeintervall und für jeden pH-Wert und jede Testtemperatur anzugeben. Darüber hinaus ist eine Stoffbilanz als Prozentanteil der eingebrachten Anfangskonzentration anzugeben, wenn eine markierte Testsubstanz verwendet wurde.

In den Bericht ist eine grafische Darstellung der log-transformierten Daten der Testsubstanzkonzentrationen im zeitlichen Verlauf aufzunehmen. Umfangreichere Hydrolyseprodukte, zumindest jene, die ≥ 10 % der eingebrachten Dosis repräsentieren, sind anzugeben und ihre log-transformierten Konzentrationen sind in gleicher Weise wie die Muttersubstanz grafisch darzustellen, so dass sich eine Darstellung der Bildungs- und Verfallgeschwindigkeiten ergibt.

▼B

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Eine genauere Bestimmung der Halbwertszeiten oder $DT_{50}$-Werte dürfte mithilfe geeigneter kinetischer Modellberechnungen möglich sein. Die Halbwertszeit und/oder die $DT_{50}$-Werte (einschließlich der Vertrauensgrenzen) sind für jeden pH-Wert und jede Temperatur zusammen mit einer Beschreibung des verwendeten Modells, der kinetischen Ordnung und des Bestimmungskoeffizienten (r2) in den Bericht aufzunehmen. Erforderlichenfalls sind die Berechnungen auch für die Hydrolyseprodukte zu übernehmen.

Dabei sind $A_i$ und $B_i$ Regressionskonstanten des Abschnitts bzw. der Steigung der Geraden der besten Anpassung, die aus einem linear regressiven ln $k_i$ zur Reziproken der Absoluttemperatur in Kelvin (T) generiert wurden. Mithilfe der Arrhenius-Beziehungen für

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i=H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

Bei Geschwindigkeitsuntersuchungen, die bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden, sind die Hydrolyse-Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung ($k_{obs}$) in Abhängigkeit von der Temperatur zu beschreiben. Die Berechnung muss sich dabei auf die Trennung von $k_{obs}$ in Geschwindigkeitskonstanten für säurekatalysierte, neutrale und basenkatalysierte Hydrolyse ($k_H$, $k_{neutral}$ bzw. $k_{OH}$) sowie auf die Arrhenius-Gleichung stützen: säure-, neutral und basenkatalysierte Hydrolyse können Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung und somit die Halbwertszeiten für andere Temperaturen berechnet werden, bei denen die direkte experimentelle Ermittlung einer Geschwindigkeitskonstante nicht praktikabel ist (10).

2.2. EVALUIERUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die meisten Hydrolysereaktionen folgen scheinbaren Reaktionsgeschwindigkeiten erster Ordnung; die Halbwertszeiten sind daher von der Konzentration unabhängig (siehe Gleichung 4 in Anlage 2). Auf diese Weise können normalerweise Laborergebnisse, die bei $10^{-2}$ bis $10^{-3}$ M ermittelt wurden, auf Umgebungsbedingungen ($\leq 10^{-6}$ M) angewandt werden (10). Von Mabey und Mill wurden verschiedene Beispiele genauer Übereinstimmung zwischen Hydrolysegeschwindigkeiten dargestellt, die für unterschiedliche Chemikalien in reinem und natürlichem Wasser gemessen wurden (11), sofern pH-Wert und Temperatur gemessen wurden.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. TESTBERICHT

Der Testbericht muss mindestens folgende Informationen enthalten:

Testsubstanz:

— Common name, chemischer Name, CAS-Nummer, Strukturformel (zur Angabe der Lage der Markierung bei Verwendung radioaktiv markierten Materials) und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften (siehe Abschnitt 1.5),

— Reinheit (Verunreinigungen) der Testsubstanz,

— Reinheit der Markierung von markierten Chemikalien und molare Aktivität (soweit relevant).

▼B

— Pufferlösungen:

— Datum und Einzelheiten der Zubereitung,

— verwendete Puffersubstanzen und Wasser,

— Molarität und pH-Wert der Pufferlösungen.

Testbedingungen:

— Durchführungsdatum der Studien,

— Menge der eingebrachten Testsubstanz,

— Methode und Lösungsmittel (Art und Menge), die für die Einbringung der Testsubstanz verwendet wurden,

— Volumen der inkubierten gepufferten Testsubstanzlösungen,

— Beschreibung des verwendeten Inkubationssystems,

— pH-Wert und Temperatur während der Studie,

— Probenahmezeiten,

— Extraktionsverfahren,

— Verfahren zur Quantifizierung und Identifizierung der Testsubstanz und ihrer Hydrolyseprodukte in den Pufferlösungen,

— Zahl der Wiederholungen.

Ergebnisse:

— Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit der verwendeten Analysemethoden,

— Wiederfindungsraten (Prozentwerte für eine gültige Studie sind in Abschnitt 1.7.1 angegeben),

— Wiederholungsdaten und -mittel in Tabellenform,

— Stoffbilanz während und am Ende der Untersuchung (wenn markierte Testsubstanzen verwendet werden),

— Ergebnisse des Vortests,

— Diskussion und Interpretation der Ergebnisse,

— sämtliche ursprünglichen Daten und Abbildungen.

Die folgenden Angaben werden nur zur Bestimmung der Hydrolysegeschwindigkeit benötigt:

— zeitabhängige grafische Darstellung der Konzentrationen der Testsubstanzen und — soweit relevant — der Hydrolyseprodukte für die einzelnen pH-Werte und für jede Temperatur,

— Tabellen der Ergebnisse der Arrhenius-Gleichung für die Temperaturen 20 °C/25 °C mit pH-Werten, Geschwindigkeitskonstanten [$h^{-1}$ oder $Tag^{-1}$], Halbwertszeiten oder $DT_{50}$, Temperaturen ( °C) einschließlich der Vertrauensgrenzen und der Korrelationskoeffizienten (r2) oder vergleichbarer Informationen,

— vorgeschlagener Hydrolyseweg.

▼B

4. **LITERATUR**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, angenommen am 12. Mai 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 ºC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) Europäische Union (EU) (1995). Richtlinie 95/36/EG der Kommission zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln. Anhang V: Verbleib und Verhalten in der Umwelt.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (Niederländische Kommission für die Eintragung von Pestiziden) (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air (Antrag auf Eintragung eines Pestizids — Teil G. Verhalten des Produkts und seiner Stoffwechselprodukte im Boden, in Wasser und in der Luft).

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (Oktober 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

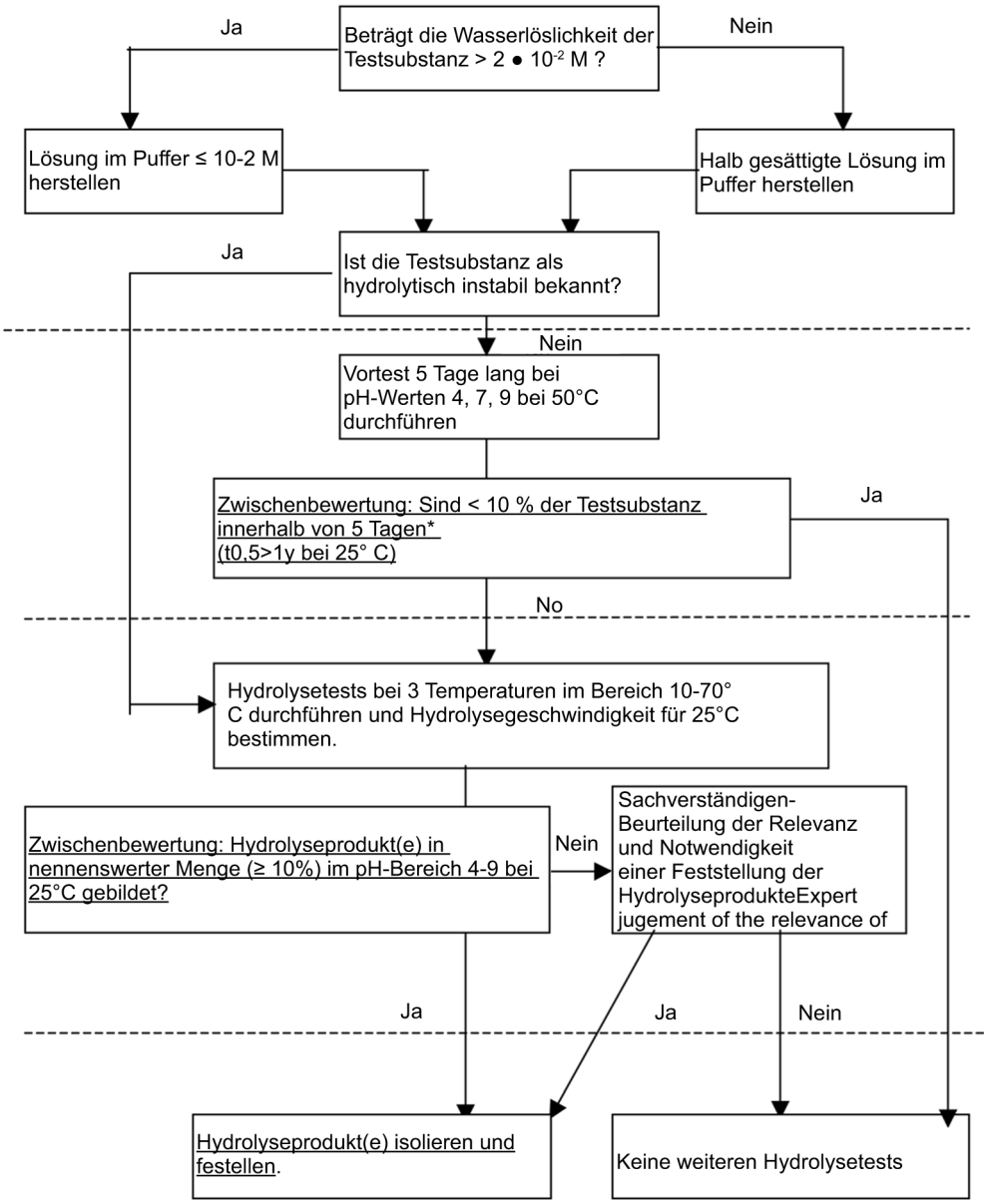
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

*Anlage 1*

**Mehrstufiger Hydrolyse-Testablauf**




* A vizsgált anyag 10%-os hidrolízise 50 °C-on kb. 30 nap, 25 °C-on kb. 1 év felezési időnek felel meg.Keine weiteren Hydrolysetests

▼B

*Anlage 2*

**Definitionen und Einheiten**

Es sind grundsätzlich **SI-Einheiten** (der **Standard-International-Organisation)** zu verwenden.

**Testsubstanz:** Eine beliebige Substanz (Mutterverbindung oder die entsprechenden Umwandlungsprodukte).

**Umwandlungsprodukte:** Alle Substanzen, die aus biotischen oder abiotischen Umwandlungsreaktionen der Testsubstanz entstehen.

**Hydrolyseprodukte:** Alle Substanzen, die aus hydrolytischen Umwandlungsreaktionen der Testsubstanz entstehen.

**Hydrolyse** bezeichnet die Reaktion einer Testsubstanz RX mit Wasser, die sich durch den Austausch der Gruppe X mit OH im Reaktionszentrum darstellen lässt:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Die Geschwindigkeit, mit der die Konzentration von RX in diesem vereinfachten Prozess sinkt, wird wie folgt angegeben:

Geschwindigkeit = $k\ [H_2O]\ [RX]$ Reaktion zweiter Ordnung

oder

Geschwindigkeit = $k\ [RX]$ Reaktion erster Ordnung

Dies ist vom geschwindigkeitsbestimmenden Schritt abhängig. Da Wasser gegenüber der Testsubstanz in erheblichem Überschuss vorhanden ist, wird dieser Reaktionstyp gewöhnlich als Reaktion pseudo-erster Ordnung beschrieben, in der die ermittelte Geschwindigkeitskonstante durch die Beziehung

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

ausgedrückt wird und aus der folgenden Formel ermittelt werden kann (*):

$$k_{obs} = \frac{1}{t}\ \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

Dabei sind:

t = Zeit

und $C_o$, $C_t$ = Konzentrationen von RX zum Zeitpunkt 0 und t.

Die Einheiten dieser Konstanten weisen die Dimension $(Zeit)^{-1}$ auf; die Halbwertszeit der Reaktion (Zeitdauer für die Reaktion von 50 % RX) wird ausgedrückt durch:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

**Halbwertszeit:** ($t_{0,5}$) bezeichnet die Zeitdauer für eine 50 %ige Hydrolyse einer Testsubstanz, wenn die Reaktion durch Kinetik erster Ordnung beschrieben werden kann: Sie ist von der Konzentration unabhängig.

(*) Lässt die grafische Darstellung der logarithmisch umgewandelten Daten über der Zeit keine lineare Funktion erkennen (gleich einer Reaktionsgeschwindigkeit erster Ordnung gesetzt), eignet sich Gleichung [3] nicht für die Ermittlung der Hydrolyse-Geschwindigkeitskonstante der Testverbindung.

▼B

**$DT_{50}$ (Disappearance Time 50 bzw. Abbauzeit 50):** Die Zeitdauer, innerhalb deren die Konzentration der Testsubstanz um 50 % reduziert wird; sie differiert von der Halbwertszeit $t_{0,5}$, wenn die Reaktion nicht nach einer Kinetik erster Ordnung verläuft.

**Schätzung von k bei unterschiedlichen Temperaturen**

Wenn die Geschwindigkeitskonstanten für zwei Temperaturen bekannt sind, können die Geschwindigkeitskonstanten bei anderen Temperaturen nach der Arrhenius-Gleichung berechnet werden:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ oder } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Eine grafische Darstellung von ln k in Abhängigkeit von 1/T ergibt eine Gerade mit einer Steigung von –E/R

Dabei ist:

k = Geschwindigkeitskonstante, bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen

E = Aktivierungsenergie (kJ/mol)

T = Absoluttemperatur (K)

R = Gaskonstante (8,314 J/mol.K)

Die Aktivierungsenergie wurde durch Regressionsanalyse oder durch die folgende Gleichung berechnet:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

Dabei ist: $T_2 > T_1$.

▼B

*Anlage 3*

**Puffersysteme**

A. **CLARK AND LUBS:**

**Puffergemische von CLARK and LUBS** (*)

| Zusammensetzung | pH |
|---|---|
| **0,2 N HCl UND 0,2 N KCl BEI 20 °C** | |
| 47,5 ml HCl + 25 ml KCl dil. auf 100 ml | 1,0 |
| 32,25 ml HCl + 25 ml KCl dil. auf 100 ml | 1,2 |
| 20,75 ml HCl + 25 ml KCl dil. auf 100 ml | 1,4 |
| 13,15 ml HCl + 25 ml KCl dil. auf 100 ml | 1,6 |
| 8,3 ml HCl + 25 ml KCl dil. auf 100 ml | 1,8 |
| 5,3 ml, HCl + 25 ml KCl dil. auf 100 ml | 2,0 |
| 3,35 ml HCl + 25 ml KCl dil. auf 100 ml | 2,2 |
| **0,1 M Kaliumhydrogenphthalat + 0,1 N HCl bei 20 °C** | |
| 46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 2,2 |
| 39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 2,4 |
| 32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 2,6 |
| 26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 2,8 |
| 20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 3,0 |
| 14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 3,2 |
| 9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 3,4 |
| 5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 3,6 |
| 2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 3,8 |
| **0,1 M Kaliumhydrogenphthalat + 0,1 N NaOH bei 20 °C** | |
| 0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 4,0 |
| 3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 4,2 |
| 7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 4,4 |
| 12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 4,6 |
| 17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 4,8 |

(*) Die in diesen Tabellen aufgeführten pH-Werte wurden ausgehend von den Potenzialmessungen unter Verwendung der Sörensen'schen Standardgleichungen (1909) errechnet. Die entsprechenden pH-Werte liegen um 0,04 Einheiten über den Werten in dieser Tabelle.

▼B

| Zusammensetzung | pH |
|---|---|
| 23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 5,0 |
| 29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 5,2 |
| 35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 5,4 |
| 39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 5,6 |
| 43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 5,8 |
| 45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Hydrogenphthalat auf 100 ml | 6,0 |

**Puffergemische von CLARK and LUBS (Forts.)**

| **0,1 M Monokaliumphosphat + 0,1 N NaOH bei 20 °C** | |
|---|---|
| 5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml | 6,0 |
| 8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml | 6,2 |
| 12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml | 6,4 |
| 17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml | 6,6 |
| 23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml | 6,8 |
| 29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml | 7,0 |
| 35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml | 7,2 |
| 39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml | 7,4 |
| 42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml | 7,6 |
| 45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml | 7,8 |
| 46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Phosphat auf 100 ml | 8,0 |
| **0,1 M $H_3BO_3$ in 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH bei 20 °C** | |
| 2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 7,8 |
| 3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 8,0 |
| 5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 8,2 |
| 8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 8,4 |
| 12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 8,6 |
| 16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 8,8 |
| 21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 9,0 |
| 26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 9,2 |

▼B

| | |
|---|---|
| 32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 9,4 |
| 36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 9,6 |
| 40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 9,8 |
| 43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Borsäure auf 100 ml | 10,0 |

B. **KOLTHOFF UND VLEESCHHOUWER:**

**Zitratpuffer von KOLTHOFF und VLEESCHHOUWER** (*)

| Zusammensetzung | pH |
|---|---|
| **0,1 M Monokaliumzitrat und 0,1 N HCl bei 18 °C** (*) | |
| 49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 2,2 |
| 43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 2,4 |
| 36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 2,6 |
| 30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 2,8 |
| 23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 3,0 |
| 17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 3,2 |
| 10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 3,4 |
| 4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 3,6 |
| **0,1 M Monokaliumzitrat und 0,1 N NaOH bei 18 °C** (*) | |
| 2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 3,8 |
| 9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 4,0 |
| 16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 4,2 |
| 23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 4,4 |
| 31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 4,6 |
| 39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 4,8 |
| 46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 5,0 |
| 54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 5,2 |
| 61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 5,4 |
| 68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 5,6 |
| 74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 5,8 |
| 81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml Zitrat auf 100 ml | 6,0 |

(*) Zur Vermeidung von Pilzbildung ist ein kleiner Kristall Thymol oder einer ähnlichen Substanz zuzusetzen.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

**Boratgemische von sörenseN**

| Zusammensetzung | | Sörensen 18 °C | Walbum, pH bei | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ml Borax | ml HCl/NaOH | | 10 °C | 40 °C | 70 °C |
| **0,05 M Borax + 0,1 NHCl** | | | | | |
| 5,25 | 4,75 | 7,62 | 7,64 | 7,55 | 7,47 |
| 5,50 | 4,50 | 7,94 | 7,98 | 7,86 | 7,76 |
| 5,75 | 4,25 | 8,14 | 8,17 | 8,06 | 7,95 |
| 6,00 | 4,00 | 8,29 | 8,32 | 8,19 | 8,08 |
| 6,50 | 3,50 | 8,51 | 8,54 | 8,40 | 8,28 |
| 7,00 | 3,00 | 8,08 | 8,72 | 8,56 | 8,40 |
| 7,50 | 2,50 | 8,80 | 8,84 | 8,67 | 8,50 |
| 8,00 | 2,00 | 8,91 | 8,96 | 8,77 | 8,59 |
| 8,50 | 1,50 | 9,01 | 9,06 | 8,86 | 8,67 |
| 9,00 | 1,00 | 9,09 | 9,14 | 8,94 | 8,74 |
| 9,50 | 0,50 | 9,17 | 9,22 | 9,01 | 8,80 |
| 10,00 | 0,00 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |
| **0,05 M Borax + 0,1 N NaOH** | | | | | |
| 10,0 | 0,0 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |
| 9,0 | 1,0 | 9,36 | 9,42 | 9,18 | 8,94 |
| 8,0 | 2,0 | 9,50 | 9,57 | 9,30 | 9,02 |
| 7,0 | 3,0 | 9,68 | 9,76 | 9,44 | 9,12 |
| 6,0 | 4,0 | 9,97 | 10,06 | 9,67 | 9,28 |

**Phosphatgemische von SÖRENSEN**

| Zusammensetzung | pH |
|---|---|
| **0,0667 M Monokaliumphosphat + 0,0667 M Dinatriumphosphat bei 20 °C** | |
| 99,2 ml $KH_2PO_4$ + 0,8 ml $Na_2HPO_4$ | 5,0 |
| 98,4 ml $KH_2PO_4$ + 1,6 ml $Na_2HPO_4$ | 5,2 |
| 97,3 ml $KH_2PO_4$ + 2,7 ml $Na_2HPO_4$ | 5,4 |
| 95,5 ml $KH_2PO_4$ + 4,5 ml $Na_2HPO_4$ | 5,6 |
| 92,8 ml $KH_2PO_4$ + 7,2 ml $Na_2HPO_4$ | 5,8 |
| 88,9 ml $KH_2PO_4$ + 11,1 ml $Na_2HPO_4$ | 6,0 |
| 83,0 ml $KH_2PO_4$ + 17,0 ml $Na_2HPO_4$ | 6,2 |
| 75,4 ml $KH_2PO_4$ + 24,6 ml $Na_2HPO_4$ | 6,4 |
| 65,3 ml $KH_2PO_4$ + 34,7 ml $Na_2HPO_4$ | 6,6 |

▼B

| | |
|---|---|
| 53,4 ml $KH_2PO_4$ + 46,6 ml $Na_2HPO_4$ | 6,8 |
| 41,3 ml $KH_2PO_4$ + 58,7 ml $Na_2HPO_4$ | 7,0 |
| 29,6 ml $KH_2PO_4$ + 70,4 ml $Na_2HPO_4$ | 7,2 |
| 19,7 ml $KH_2PO_4$ + 80,3 ml $Na_2HPO_4$ | 7,4 |
| 12,8 ml $KH_2PO_4$ + 87,2 ml $Na_2HPO_4$ | 7,6 |
| 7,4 ml $KH_2PO_4$ + 92,6 ml $Na_2HPO_4$ | 7,8 |
| 3,7 ml $KH_2PO_4$ + 96,3 ml $Na_2HPO_4$ | 8,0 |

▼B

## C.8. TOXIZITÄT FÜR REGENWÜRMER

PRÜFUNG IN KÜNSTLICHEM BODEN

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

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

#### 1.2. DEFINITION UND MESSGRÖSSE

$LC_{50}$: Die Konzentration einer Substanz, durch die 50 % der Versuchstiere während der Versuchszeit getötet werden.

#### 1.3. REFERENZSUBSTANZ

Mit einer Referenzsubstanz wird regelmäßig überprüft, dass sich die Empfindlichkeit des Prüfsystems nicht wesentlich geändert hat.

Als Referenzsubstanz wird Chloracetamid p. a. empfohlen.

#### 1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

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

#### 1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

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

#### 1.6. BESCHREIBUNG DES PRÜFVERFAHRENS

##### 1.6.1. *Material*

###### 1.6.1.1. Prüfsubstrat

Ein definierter künstlicher Boden wird als Grundprüfsubstrat eingesetzt.

a) Grundsubstrat (in Prozent des Trockengewichts)

— 10 % Sphagnumtorf (so nahe wie möglich bei pH 5,5 bis 6,0; ohne sichtbare Pflanzenreste und fein gemahlen);

▼B

— 20 % Kaolinitkreide mit vorzugsweise mehr als 50 % Kaolinit;

— etwa 69 % Industriequarzsand (überwiegend feiner Sand mit mehr als 50 % 0,05 bis 0,2 mm großen Teilchen). Wenn die Prüfsubstanz in Wasser ungenügend dispergierbar ist, werden 10 g pro Prüfgefäß aufbewahrt, die später mit der Prüfsubstanz gemischt werden;

— etwa 1 % Kalziumcarbonat ($CaCO_1$), in Pulverform, chemisch rein, zur Einstellung des pH-Werts auf 6,0 ± 0,5.

b) Prüfsubstrat

Das Prüfsubstrat enthält das Grundsubstrat, die Prüfsubstanz und deionisiertes Wasser.

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

c) Kontrollsubstrat

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

1.6.1.2. Prüfgefäße

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

1.6.2. *Prüfbedingungen*

Die Gefäße werden in Klimakammern bei einer Temperatur von 20 °C ± 2 °C und Dauerlicht gehalten. Die Lichtintensität beträgt 400 bis 800 Lux.

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

1.6.3. *Prüfverfahren*

Prüfkonzentration

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

Vorversuch

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

▼B

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

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

Hauptprüfung

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

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

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

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

Mischung des Grundprüfsubstrats und der Prüfsubstanz

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

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

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

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

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

▼B

Die Auswertung wird 14 Tage (und wahlweise 7 Tage) nach Prüfbeginn durchgeführt. Das Substrat wird auf einer

Platte aus Glas oder rostfreiem Stahl ausgebreitet. Die Würmer werden untersucht und die Überlebenden gezählt. Regenwürmer gelten als tot, wenn sie nicht auf einen leichten mechanischen Reiz am Vorderende reagieren.

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

1.6.4. *Prüforganismen*

Als Prüforganismen werden adulte *Eisenia foetida* (siehe Anlage) (mindestens 2 Monate alt mit Clitellum) von 300 bis 600 mg Feuchtgewicht eingesetzt (zur Anzucht siehe Anlage).

2. **DATEN**

2.1. VERARBEITUNG UND AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Konzentrationen der Prüfsubstanz werden zusammen mit dem jeweils entsprechenden Prozentsatz an toten Regenwürmern angegeben.

Wenn die Daten es zulassen, lassen sich der $LC_{50}$-Wert und der Vertrauensbereich (p = 0,05) nach Standardmethoden bestimmen (Litchfield und Wilcoxon, 1949, oder entsprechende Methode). Die $LC_{50}$ wird in mg Prüfsubstanz pro kg Trockengewicht des Prüfsubstrats angegeben.

Ist die Konzentrationskurve zu steil, um eine Berechnung der $LC_{50}$ zuzulassen, dann genüge es, den Wert aufgrund der grafischen Darstellung abzuschätzen.

Ergeben 2 aufeinander folgende Konzentrationen, die sich um den Faktor 1,8 unterscheiden, 0 und 100 % Mortalität, so reichen diese beiden Werte aus, um den Bereich anzugeben, in dem die $LC_{50}$ liegt.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— die Feststellung, dass die Prüfung in Übereinstimmung mit den oben genannten Qualitätskriterien durchgeführt wurde;

— welche Prüfung durchgeführt wurde (Vorprüfung und/oder Hauptprüfung);

— die genaue Beschreibung der Prüfbedingungen oder die Feststellung, dass die Prüfung entsprechend der angegebenen Methode durchgeführt wurde; jede Abweichung muss angegeben werden;

— die genaue Beschreibung, wie die Prüfsubstanz in das Grundprüfsubstrat eingebracht wurde;

— Angaben zu den Prüforganismen (Art, Alter, Durchschnittsgewicht und Gewichtsbereich, Haltungs- und Anzuchtmethoden, Herkunft);

▼B

— das zur Bestimmung der $LC_{50}$ angewendete Verfahren;

— die Prüfergebnisse einschließlich aller verwendeten Daten;

— die Beschreibung der beobachteten Symptome oder Veränderungen im Verhalten der Versuchstiere;

— die Mortalität in den Kontrollen;

— die $LC_{50}$ oder die höchste geprüfte Konzentration ohne Mortalität und die niedrigste geprüfte Konzentration mit einer Mortalität von 100 % 14 Tage (wahlweise 7 Tage) nach Prüfbeginn;

— das Auftragen der Konzentrations-Wirkungs-Kurve;

— die Ergebnisse, die mit der Referenzsubstanz erzielt wurden, entweder in Verbindung mit der vorliegenden Prüfung oder aus vorherigen Qualitätskontrollversuchen.

4. **LITERATUR**

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207,* Beschluss des Rates C(81) 30 final.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms.* Chapman and Hall, London, 331.

(3) Bauche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 S. .

(4) Litchfield.J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. *Pharm. Exp. Therap.,* 1949, Band 96, 99.

(5) Commission of the European Communities, *Development of a standardized Laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms,* Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje: *ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

*Anlage*

**Anzucht und Haltung der Würmer vor der Prüfung**

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

**Anzucht und Haltungsbedingungen**

| | |
|---|---|
| Klimakammer:: | 20 °C ± 2 °C vorzugsweise mit Dauerlicht (400 bis 800 Lux). |
| Brutkasten:: | Geeignete flache Behälter von 10 bis 20 Liter Inhalt. |
| Substrat:: | *Eisenia foetida* kann in verschiedenen tierischen Exkrementen angezogen werden. Es wird empfohlen, ein Gemisch von 50 Vol. % Torf und 50 Vol. % Kuh- oder Pferdedung zu verwenden. Der pH-Wert sollte bei 6 bis 7 liegen (er wird mit Kalziumcarbonat eingestellt); die Ionenleitfähigkeit sollte niedrig sein (weniger als 6 mmhos oder 0,5 % Salzkonzentration).<br>Das Substrat sollte feucht, aber nicht zu nass sein.<br>Neben der oben angegebenen Methode können auch andere bewährte Verfahren eingesetzt werden. |

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

▼B

C.9. **BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT**

ZAHN-WELLENS-TEST

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

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

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

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

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

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

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

— unter den Testbedingungen wasserlöslich sind,

— unter den Testbedingungen einen unbedeutenden Dampfdruck haben,

— die Bakterien nicht hemmen,

— im Testsystem nur beschränkt adsorbiert werden,

— nicht durch Schäumen aus der Testlösung verloren gehen.

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

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

▼B

1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

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

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

$D_T$ = Abbau ( %) zur Zeit T,

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

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

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

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

Der Abbaugrad wird auf ganze Prozentzahlen gerundet.

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

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

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

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

1.4. PRINZIP DER METHODE

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

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

▼B

1.5. QU ALITÄTSKRITERIEN

In einem Ringversuch ergab sich eine befriedigende Reproduzierbarkeit des Tests.

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

1.6. PRÜFVERFAHREN

1.6.1. *Vorbereitung*

1.6.1.1. R e a g e n z i e n

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

| | |
|---|---|
| Schwefelsäure, p. a.: | 50 g/l |
| Natriumhydroxidlösung, p. a.: | 40 g/l |
| Mineralische Nährlösung: in 1 Liter deionisiertem Wasser ist Folgendes zu lösen: | |
| Ammoniumchlorid, $NH_4Cl$, p. a.: | 38,5 g |
| Natriumdihydrogenphospat, $NaH_2PO_2.2H_2O_2$ p. a.: | 33,4 g |
| Kaliumdihydrogenphosphat, KH2PO4, p. a.: | 8,5 g |
| Dikaliummonohydrogenphosphat, $K_2HPO_4$, p. a.: | 21,75 g. |

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

1.6.1.2. G e r ä t e

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

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

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

Zentrifuge (rd. 3 550 g).

pH-Messgerät.

Gerät zur Messung des gelösten Sauerstoffs.

Papierfilter.

▼B

Membranfiltrationsgerät.

Membranfilter, Porengröße 0,45 µm. Die Membranfilter dürfen weder Kohlenstoff freisetzen noch während der Filtration absorbieren.

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

1.6.1.3. Vorbereitung des Inokulums

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

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

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

1.6.1.4. Zubereitung der Testlösungen

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

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

1.6.2. *Durchführung der Prüfung*

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

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

▼B

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

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

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

Funktionskontrolle des Belebtschlamms

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

Adaptation

Werden Analysen in relativ kurzen Zeitabständen (z. B. täglich) durchgeführt, so lässt sich die Adaptation aufgrund der Abbaukurve klar erkennen (siehe Abbildung 2). Der Test sollte deshalb nicht unmittelbar vor einem Wochenende begonnen werden.

Erfolgt die Adaptation am Ende der normalen Testdauer, so kann der Test bis zum vollständigen Abbau der Prüfsubstanz verlängert werden.

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

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

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

▼B

Vorbereitung für die Analyse

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

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

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

Die CSB-Konzentration der Probefiltrate wird nach dem in der Literaturangabe ([2]) beschriebenen Verfahren bestimmt.

2. **DATEN UND AUSWERTUNG**

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

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

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

3. **SCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— Substanzkonzentration zu Beginn des Tests;

— sämtliche Informationen und experimentellen Ergebnisse, die mit der Prüfsubstanz, ggf. der Referenzsubstanz sowie der Blindprobe erhalten wurden;

— Substanzkonzentration nach drei Stunden;

— Abbau-Kurve mit Beschreibung;

— Datum und Ort der Entnahme der Organismen, Stand der Adaptation, verwendete Konzentration usw.;

— wissenschaftliche Gründe für jedwede Änderungen des Testverfahrens.

3.2. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

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

▼B

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

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

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

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

Durch spezifische Analysemethoden oder den Einsatz $^{14}C$-markierter Prüfsubstanzen lässt sich evtl. eine höhere Empfindlichkeit erreichen. Wird $^{14}C$-markierte Prüfsubstanz verwendet, lässt sich durch Nachweis des entstehenden $^{14}CO_2$ bestätigen, dass ein biologischer Abbau stattgefunden hat.

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

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

## 4. LITERATUR

(1) OECD Paris, 1981, *Test Guideline 302 B,* Beschluss des Rates C(81) 30 final.

(2) Anhang V C.9 Abbaubarkeit: Chemischer Sauerstoffbedarf. Richtlinie 84/449/EWG der Kommission (ABl. L 251 vom 19.9.1984, S. 1).

▼B

*Anlage*

BEISPIEL EINER AUSWERTUNG

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

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

(1) Mittelwerte aus dreifacher Bestimmung.

▼B

*Abbildung 1*

**Beispiele von Abbau-Kurven**

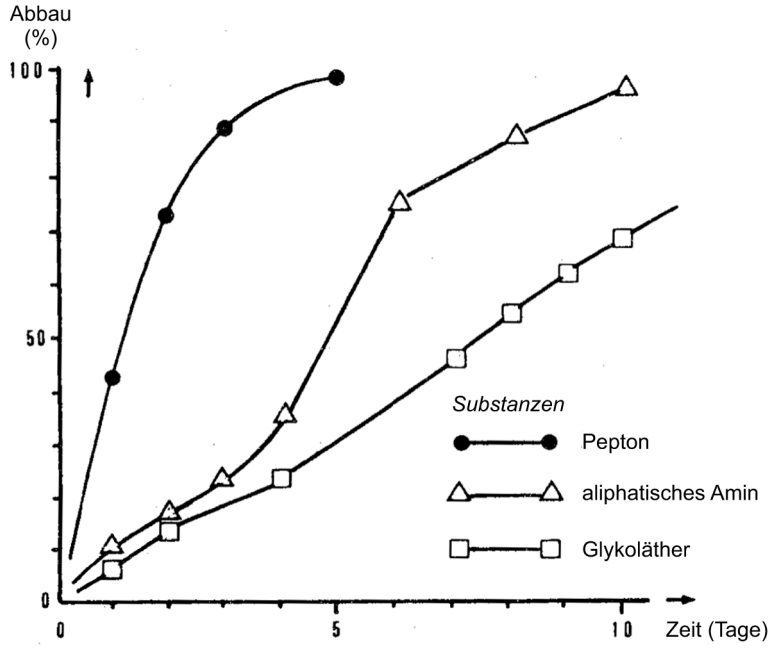
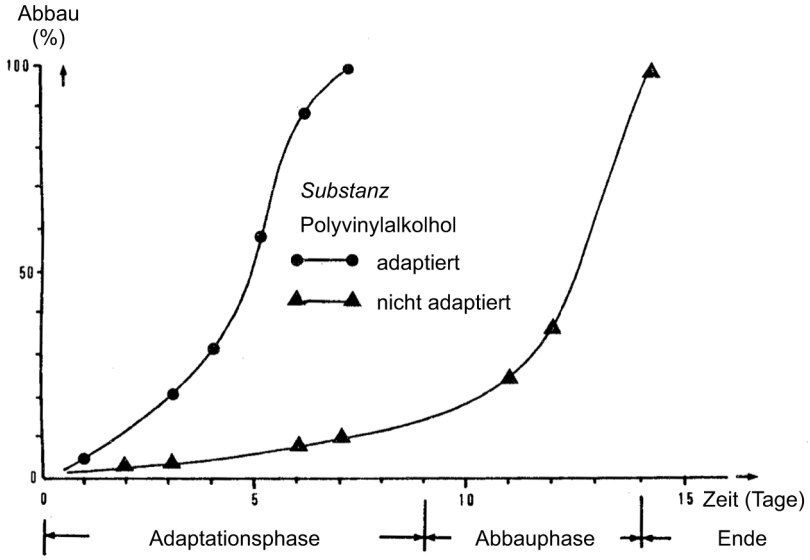



*Abbildung 2*

**Beispiel für eine Adaptation des Schlammes**



▼M4

C.10. **SIMULATION DER AEROBEN ABWASSERBEHANDLUNG: C.10-A: BELEBTSCHLAMM — C.10-B: BIOFILME**

**C.10-A: Belebtschlamm**

EINLEITUNG

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

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN

**Belebtschlammanlagen**

2. Es wurden Belebtschlamm-Modellanlagen in Größenordnungen von 300 ml bis ca. 2 000 ml Fassungsvermögen beschrieben. Einige dieser Modellanlagen gewährleisteten realitätsnahe Bedingungen mit Absetztanks und Schlämmen, die in den Belüftungstank zurückgepumpt wurden, während andere ohne Absetzvorrichtungen betrieben wurden, siehe z. B. *Swisher* (1). Die Größe der Apparatur ist stets ein Kompromiss: Sie muss einerseits groß genug sein, um einen reibungslosen mechanischen Ablauf und Probenahmen in einem Umfang zu gewährleisten, der den Betrieb der Ablage nicht beeinträchtigt, darf jedoch andererseits nicht so groß sein, dass sie zu viel Platz und Materialien in Anspruch nimmt.

3. Zwei Apparaturen, die häufig eingesetzt wurden und sich bewährt haben, sind die Modellanlage vom Typ *Husmann (2)* und der Poröse Topf (*Porous Pot*) (3)(4), die als erste für die Untersuchung von Tensiden verwendet wurden; beide Modelle werden in diesem Kapitel näher beschrieben. Auch andere Modellanlagen, z. B. *Eckenfelder* (5), wurden mit Erfolg eingesetzt. Aufgrund des mit diesem Simulationstest verbundenen relativ hohen Kosten- und Arbeitsaufwands wurde parallel dazu die Möglichkeit einfacherer und kostengünstigerer Screeningtests untersucht, die zurzeit in Kapitel C.4 (A-F) dieses Anhangs (6) beschrieben sind. Die Erfahrung mit zahlreichen Tensiden und anderen chemischen Substanzen hat gezeigt, dass sich Stoffe mit positiven („*pass*“) Ergebnissen im Screeningtest (auf leichte biologische Abbaubarkeit) auch im Simulationstest zersetzten. Einige der Stoffe mit negativen („*fail*“) Ergebnissen im Screeningtest reagierten positiv („*pass*“) im Test auf potenzielle (inhärente) Bioabbaubarkeit (Kapitel C.12 (7) und C.19 (8) dieses Anhangs), doch nur wenige Substanzen dieser letzten Gruppe zersetzten sich im Simulationstest, während Stoffe mit negativen Ergebnissen im Test auf inhärente Abbaubarkeit im Simulationstest nicht abgebaut wurden (9)(10)(11).

4. Für bestimmte Zwecke reichen Simulationstests, die stets unter denselben Prozessbedingungen durchgeführt werden, aus; die Ergebnisse dieser Tests werden als prozentuale Abnahme der Prüfsubstanz oder des gelösten organischen Kohlenstoffs (*Dissolved Organic Carbon*, DOC) ausgedrückt. Unter der vorliegenden Prüfmethode wird ein solcher Test beschrieben. Im Gegensatz zur vorherigen Version dieses Kapitels, die nur einen einzigen Apparaturtypus beschrieb, bei dem die Behandlung synthetischer Abwässer in gekoppelten Anlagen nach der relativ simplen Methode des Überschussschlammabzugs erfolgte, bietet diese aktuelle Version Variationsmöglichkeiten, d. h. es werden Alternativen für Apparaturtyp, Betriebsmodus,

▼M4

Abwässer und Überschussschlammabzug beschrieben. Der vorliegende Text lehnt sich eng an die ISO-Norm 11733 (12) an, die im Zuge der Ausarbeitung des Textes eingehend geprüft wurde, obgleich die Methode keinem Ringtest unterzogen wurde.

5. Für andere Zwecke muss die Konzentration der Prüfsubstanz im Ablauf genauer bekannt sein, und zur Bestimmung dieser Konzentration ist eine umfassendere Methode erforderlich. Beispielsweise muss die Schlammabzugsrate im Tagesverlauf und während der gesamten Prüfungsdauer präziser kontrolliert werden, und die Modellanlagen müssen bei verschiedenen Abzugsraten betrieben werden. Damit die Methode in jeder Hinsicht umfassend ist, sollten die Tests auch unter zwei oder drei verschiedenen Temperaturbedingungen durchgeführt werden: Eine derartige Methode wird von *Birch (13)* (14) beschrieben und ist in Anlage 6 zusammengefasst. Der aktuelle Wissensstand reicht jedoch nicht aus, um entscheiden zu können, welches der kinetischen Modelle zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit chemischer Substanzen bei der Abwasserbehandlung und im Wassermilieu im Allgemeinen geeignet ist. Die Anwendung der Monod-Kinetik (siehe Beispielfall in Anlage 6) ist auf chemische Substanzen begrenzt, die in Konzentrationen von 1 mg/l oder mehr präsent sind, wenngleich auch die Meinung vertreten wird, dass selbst dies zu beweisen ist. Tests bei Konzentrationen, die die Konzentrationen in Abwässern akkurater widerspiegeln, sind in Anlage 7 beschrieben, werden jedoch, ebenso wie die Tests in Anhang 6, nicht als eigenständige Prüfmethoden geführt, sondern lediglich in den Anlagen genannt.

***Filtration***

6. Sehr viel weniger Arbeit wurde in Modell-Tropfkörper investiert, vielleicht, weil sie aufwändiger und weniger kompakt sind als Modell-Belebtschlammanlagen. *Gerike et al* entwickelten Tropfkörperanlagen und betrieben sie im Koppelmodus (15). Die Filter waren relativ groß (2 m hoch mit einem Fassungsvermögen von 60 l) und für jeden einzelnen waren 2 l/Std. Abwasser erforderlich. *Baumann et al* (16) simulierten Tropfkörper, indem 1 m lange Röhren (mit 14 mm Innendurchmesser) mit zuvor für 30 Minuten in Belebtschlammkonzentrat getränkten Polyester-Vliesstreifen ausgekleidet wurden. Die Prüfsubstanz wurde als einzige C-Quelle in einer Mineralsalzlösung in die vertikal angeordnete Röhre gegeben, und die biologische Abbaubarkeit wurde durch Messung des DOC im Ablauf und des $CO_2$ im austretenden Gas bestimmt.

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

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

8. Dieses Verfahren ist ausgelegt, um die Elimination und den Primär- und/oder den vollständigen biologischen Abbau wasserlöslicher organischer Substanzen durch aerobe Mikroorganismen in einem das Belebtschlammverfahren simulierenden kontinuierlich betriebenen Prüfsystem bestimmt werden. Ein leicht biologisch abbaubares organisches Medium und die organische Prüfsubstanz dienen als C-Quellen und Energiequellen für die Mikroorganismen.

9. Zwei kontinuierlich betriebene Prüfsysteme (Belebtschlamm- oder *Porous-Pot*-Anlagen) werden unter identischen Bedingungen, die je nach Prüfungszweck festgelegt werden, parallel betrieben. In der Regel betragen die mittlere hydraulische Verweilzeit 6 Stunden und das mittlere Schlammalter (Schlammverweilzeit) 6 bis 10 Tage. Überschussschlamm wird nach einer von zwei Methoden abgezogen, und der Zulauf (organisches Medium) von ausschließlich einer der beiden Prüfanlagen wird mit Prüfsubstanz einer Konzentration von üblicherweise 10 mg/l DOC bis 20 mg/l DOC beschickt. Die zweite Anlage fungiert als Kontrollanlage zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit des organischen Mediums.

▼M4

10. Anhand häufig gezogener Ablaufproben werden durch spezifische Analyse der DOC (vorzugsweise) oder der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) sowie die Prüfsubstanzkonzentration (soweit erforderlich) im Ablauf der mit der Prüfsubstanz beschickten Anlage bestimmt. Es wird davon ausgegangen, dass die Differenz zwischen den DOC- oder CSB-Konzentrationen in den Abläufen der Prüf- und der Kontrollanlage auf die Prüfsubstanz oder ihre organischen Stoffwechselprodukte zurückzuführen ist. Um die Elimination der Prüfsubstanz zu ermitteln, wird diese Differenz mit der durch die zugeführte Prüfsubstanz bedingten DOC- oder CSB-Konzentration im Zulauf verglichen.

11. In der Regel lässt sich biologische Abbaubarkeit durch sorgfältige Prüfung der Konzentrations-Zeit-Kurve der Elimination von der Bioadsorption unterscheiden; dies kann gewöhnlich durch einen Test auf leichte biologische Abbaubarkeit, bei dem ein akklimatisiertes Inokulum aus der mit der Prüfsubstanz beaufschlagten Anlage zum Einsatz kommt, bestätigt werden.

ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

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

13. Informationen über die Toxizität der Prüfsubstanz für Mikroorganismen (siehe Anlage 4 können für die Wahl geeigneter Testkonzentrationen zweckdienlich und für die korrekte Auswertung niedriger Abbaubarkeitswerte ausschlaggebend sein.

NEGATIVE/POSITIVE TESTERGEBNISSE (PASS/FAIL)

14. Bei der ersten Anwendung dieses Simulationstests (Bestätigungstest) zur Bestimmung der primären Bioabbaubarkeit von Tensiden müssen über 80 % der betreffenden chemischen Substanz abgebaut werden, bevor das Tensid in den Verkehr gebracht werden kann. Werden diese 80 % nicht erreicht, kann der vorliegende Simulationstest (Bestätigungstest) durchgeführt werden, und das Tensid darf nur in den Verkehr gebracht werden, wenn über 90 % der betreffenden chemischen Substanz abgebaut wurden. Im Allgemeinen stellt sich die *Pass-/Fail*-Frage bei chemischen Substanzen nicht, und der Wert der prozentualen Abnahme kann zur approximativen Berechnung der wahrscheinlichen Umweltkonzentration einer chemischen Substanz verwendet werden, die zur Analyse der von chemischen Substanzen ausgehenden Gefahren erforderlich ist. Testergebnisse folgen in der Regel dem Schema „Alles oder Nichts“. Einige Untersuchungen reiner Chemikalien haben in mehr als drei Viertel aller Fälle eine prozentuale DOC-Abnahme von > 90 % und bei über 90 % der Substanzen, die sich als in signifikantem Maße biologisch abbaubar erwiesen haben, von > 80 % ergeben.

15. Relativ wenige chemische Substanzen (z. B. Tenside) sind in den für diese Prüfung verwendeten Konzentrationen (ungefähr 10 mg C/l) in Abwässern vorhanden. Einige Substanzen manifestieren in diesen Konzentrationen möglicherweise eine Hemmwirkung, bei anderen kann die Abnahmegeschwindigkeit bei niedrigen Konzentrationen unterschiedlich sein. Die Zersetzung könnte mit modifizierten Methoden, bei denen die Prüfsubstanz realitätsnäher in niedrigen Konzentrationen verwendet wird, akkurater bewertet und die so erhobenen Daten könnten zur Berechnung von kinetischen Konstanten verwendet werden. Die hierzu erforderlichen Versuchstechniken sind jedoch noch nicht umfassend validiert, und auch die kinetischen Modelle zur Beschreibung der beim biologischen Abbau stattfindenden Reaktionen liegen noch nicht fest (siehe Anlage 7).

▼M4

REFERENZSUBSTANZEN

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

REPRODUZIERBARKEIT VON TESTERGEBNISSEN

17. Es gibt wesentlich weniger Studienberichte über Simulationstests als über Tests auf leichte Bioabbaubarkeit. Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zwischen (Simultan-)Replikaten ist gut (10 % bis 15 %) bei Prüfsubstanzen, die zu mindestens 80 % abgebaut werden, bei weniger gut abgebauten Substanzen ist die Schwankungsbreite jedoch größer. Bei bestimmten grenzwertigen Substanzen wurden innerhalb des neunwöchigen Prüfungszeitraums mitunter auch weit auseinanderliegende Ergebnisse (z. B. 10 %, 90 %) verzeichnet.

18. Bei den mit den beiden Apparaturtypen erzielten Ergebnissen zeigten sich nur geringe Unterschiede, einige chemische Substanzen wurden in Haushaltsabwasser jedoch umfassender und konsistenter abgebaut als in synthetischem Abwasser (OECD).

BESCHREIBUNG DES PRÜFVERFAHRENS

**Geräte**

*Prüfsystem*

19. Das Prüfsystem für eine Prüfsubstanz umfasst eine Prüfanlage und eine Kontrollanlage; werden jedoch nur spezifische Analysen durchgeführt (primäre Bioabbaubarkeit), ist nur eine Prüfanlage erforderlich. Eine Kontrollanlage kann für mehrere Prüfanlagen verwendet werden, die entweder mit derselben oder mit unterschiedlichen Prüfsubstanzen beschickt werden. Bei gekoppelten Anlagen (Anlage 3) muss jede Prüfanlage über eine separate Kontrollanlage verfügen. Beim Prüfsystem kann es sich entweder um eine Belebtschlamm-Modellanlage vom Typ *Husmann* (Anlage 1, Abbildung 1) oder um eine *Porous-Pot*-Anlage (Anlage 1, Abbildung 2) handeln. In beiden Fällen sind ausreichend große Vorrats-/Sammelgefäße für die Zu- bzw. Abläufe erforderlich, ebenso wie Pumpen zur Dosierung des Zustroms (entweder mit Prüfsubstanzlösung gemischt oder separat).

20. Jede Belebtschlammanlage besteht aus einem Belüftungsgefäß (Belebung) mit einem bekannten Fassungsvermögen von ca. 3 Liter Belebtschlamm und einem Absetzgefäß (Nachklärung) eines Fassungsvermögens von ungefähr 1,5 Litern; durch Regelung der Höhe des Absetzgefäßes können die Füllmengen bis zu einem bestimmten Grad geändert werden. Gefäße anderer Größen sind zulässig, wenn vergleichbare hydraulische Frachten eingehalten werden. Ist es nicht möglich, die Temperatur im Prüfraum im gewünschten Bereich zu halten, wird die Verwendung von wasserummantelten Gefäßen (temperiertes Wasser) empfohlen. Für die kontinuierliche oder intermittente Rückführung von Belebtschlamm aus dem Absetzgefäß ins Belüftungsgefäß wird eine Druckluft- oder Dosierpumpe verwendet.

21. Das *Porous-Pot*-System besteht aus einem porösen inneren Zylinder mit konischem Boden, der in einem geringfügig größeren, aus undurchlässigem Kunststoff bestehenden formgleichen Gefäß fixiert ist. Als Material für das poröse Gefäß ist poröses Polyethylen einer Porengröße von maximal 90 µm und 2 mm Dicke geeignet. Der Schlamm wird durch die Filtrierwirkung der porösen Wand vom behandelten organischen Medium abgetrennt. Der Ablauf sammelt sich in dem ringförmigen Bereich, von dem aus er in das Sammelgefäß überfließt. Da kein Absetzen erfolgt, gibt es auch keine Schlammrückführung. Das gesamte System kann in einem thermostatisch kontrollierten Wasserbad montiert werden. Poröse Töpfe können in den Anfangsstadien verstopfen und überlaufen. In diesem Fall wird die poröse Auskleidung erneuert; dazu wird zunächst der Schlamm aus dem Topf in einen sauberen Eimer abgeschlaucht und die verstopfte Innenauskleidung

▼M4

wird entfernt. Der undurchlässige äußere Zylinder wird ausgewischt, eine saubere Auskleidung wird eingesetzt und der Schlamm wird in den Topf zurückgeführt. Außerdem werden alle an den Rändern der verstopfen Innenauskleidung anhaftenden Schlammreste sorgfältig abgeschabt und ebenfalls zurück in den Topf transferiert. Verstopfte Töpfe werden zunächst mit einem feinen Wasserstrahl gesäubert, um Schlammreste zu entfernen; anschließend wird das Gerät zunächst in verdünnte Natriumhypochlorit-Lösung, dann in Wasser gesetzt und gründlich mit Wasser abgespült.

22. Die Belüftung des Schlamms in den Belüftungsgefäßen beider Systeme erfordert geeignete Verfahren, z. B. gesinterte Würfel (Sprudelsteine) und Druckluft. Die Luft muss bei Bedarf gesäubert werden, indem sie durch einen geeigneten Filter geleitet und gewaschen wird. Das System muss ausreichend belüftet werden, um aerobe Bedingungen zu gewährleisten und die Schlammflocken während des Prüfungsvorgangs in ständiger Suspension zu halten.

*Filtrationsgerät oder Zentrifuge*

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

*Analysegerät*

24. Apparatur zur Bestimmung folgender Größen:

— DOC (gelöster organischer Kohlenstoff) und TOC (gesamter organischer Kohlenstoff) oder CSB (chemischer Sauerstoffbedarf);

— bestimmte chemische Substanz, soweit erforderlich;

— suspendierte Feststoffe, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration im Wasser;

— Temperatur, Azidität und Alkalinität;

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

*Wasser*

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

26. Deionisiertes Wasser mit einem DOC-Gehalt von weniger als 2 mg/l DOC.

*Organisches Medium*

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

▼M4

*Synthetisches Abwasser*

28. In jedem Liter Leitungswasser Folgendes auflösen: 160 mg Pepton; 110 mg Fleischextrakt; 30 mg Harnstoff; 28 mg wasserfreies Dikaliumhydrogenphosphat ($K_2HPO_4$); 7 mg Natriumchlorid (NaCl); 4 mg Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2.2H_2O$); 2 mg Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($Mg_2SO_4.7H_20$). Dieses synthetische Abwasser (OECD) hat Beispielcharakter und ergibt eine mittlere DOC-Konzentration im Zulauf von etwa 100 mg/l. Alternativ können andere Zusammensetzungen mit ähnlicher DOC-Konzentration verwendet werden, die realitätsnäher sind. Ist ein weniger konzentrierter Zulauf erforderlich, das synthetische Abwasser mit Leitungswasser verdünnen, beispielsweise im Verhältnis 1:1, um eine Konzentration von ungefähr 50 mg/l zu erhalten. Ein derart verdünnter Zulauf fördert das Wachstum nitrifizierender Organismen, und diese Modifikation sollte vorgenommen werden, wenn die Simulation nitrifizierender Kläranlagen untersucht werden soll. Dieses synthetische Abwasser kann aus destilliertem Wasser in konzentrierter Form hergestellt und bis zu einer Woche bei ungefähr 1 °C gelagert werden. Bei Bedarf mit Leitungswasser verdünnen. (Dieses Medium ist eher ungeeignet, weil die Stickstoffkonzentration sehr hoch und der Kohlenstoffgehalt relativ niedrig ist; es gibt jedoch keine besseren Empfehlungen, außer Hinzufügung von mehr Phosphat als Puffer und zusätzlichem Pepton).

*Haushaltsabwasser*

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

*Belebtschlamm*

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

*Stammlösungen der Prüfsubstanz*

31. Für angemessen lösliche chemische Substanzen in geeigneten Konzentrationen (z. B. 1 bis 5 g/l) in entionisiertem Wasser oder in einer mineralischen Kulturlösung aus synthetischem Abwasser Stammlösungen ansetzen (für nicht lösliche und flüchtige Chemikalien siehe Anlage 5). Den DOC- und den TOC-Wert der Stammlösung bestimmen und die Messungen bei jeder neuen Charge wiederholen. Bei einer Differenz zwischen DOC und TOC von mehr als 20 % die Wasserlöslichkeit der Prüfsubstanz überprüfen. Den DOC oder die durch spezifische Analyse der Stammlösung gemessene Konzentration der Prüfsubstanz mit dem Nennwert vergleichen, um festzustellen, ob die Wiederfindungsrate ausreicht (in der Regel kann mit > 90 % gerechnet werden). Vor allem bei Dispersionen ist festzustellen, ob der DOC als Analyseparameter verwendet werden kann oder nicht oder ob nur ein prüfsubstanzspezifisches Analyseverfahren angewendet werden kann. Bei Dispersionen müssen die Proben zentrifugiert werden. Für jede neue Charge den DOC, den CSB bzw. die Prüfsubstanz durch spezifische Analyse messen.

▼M4

32. Den pH-Wert der Stammlösung bestimmen. Extremwerte zeigen an, dass die Zugabe der chemischen Substanz den pH-Wert des Belebtschlamms im Prüfsystem beeinflussen kann. In diesem Fall die Stammlösung mit kleinen Mengen anorganischer Säure oder Base neutralisieren, um einen pH-Wert von 7 ± 0,5 zu erhalten, wobei eine Ausfällung der Prüfsubstanz zu vermeiden ist.

PRÜFVERFAHREN

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

*Vorbereitung des Inokulums*

34. Das Prüfsystem zu Testbeginn entweder mit Belebtschlamm oder mit einem Inokulum animpfen, das eine geringe Konzentration an Mikroorganismen enthält. Das Inokulum bis zu seiner Verwendung (innerhalb von 24 Stunden) bei Raumtemperatur unter aeroben Bedingungen aufbewahren. Im ersten Fall (Verwendung von Belebtschlamm) aus dem Belüftungsbecken einer ordnungsgemäß betriebenen biologischen Kläranlage oder einer Laborkläranlage, die vorwiegend mit Haushaltsabwasser betrieben wird, eine Schlammprobe ziehen. Sollen nitrifizierende Bedingungen simuliert werden, den Schlamm aus einer nitrifizierenden Kläranlage beziehen. Die Konzentration der suspendierten Feststoffe bestimmen und den Schlamm bei Bedarf durch Absetzen eindicken, so dass dem Prüfsystem nur eine minimale Schlammmenge zugeführt werden muss. Die Anfangskonzentration der Trockensubstanz sollte ungefähr 2,5 g/l betragen.

35. Im zweiten Fall (Inokulum) 2 bis 10 ml/l Ablauf aus einer biologischen Kläranlage für Haushaltsabwässer verwenden. Um möglichst viele unterschiedliche Bakterienarten zu erhalten, kann es sinnvoll sein, auch Inokula aus diversen anderen Quellen wie Oberflächenwasser zuzuführen. In diesem Fall wird sich der Belebtschlamm im Prüfsystem entwickeln und vermehren.

*Zudosierung des organischen Mediums*

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

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

▼M4

*Zudosierung der Prüfsubstanz*

38. Eine geeignete Menge Stammlösung der Prüfsubstanz (Nummer 31) in das Vorratsgefäß des Zulaufs geben oder mittels einer separaten Dosierpumpe direkt in das Belüftungsgefäß pumpen. Die normale mittlere Testkonzentration im Zulauf sollte 10 bis 20 mg/l DOC betragen, wobei die Höchstkonzentration von 50 mg/l nicht überschritten werden sollte. Ist die Wasserlöslichkeit der Prüfsubstanz gering oder ist mit toxischen Effekten zu rechnen, ist die Konzentration auf 5 mg/l DOC oder auch weniger zu reduzieren, allerdings nur, wenn eine geeignete spezifische Analysemethode verfügbar ist und angewendet wird (schlecht wasserlösliche dispergierte Prüfsubstanzen können nach besonderen Dosiermethoden zugesetzt werden; siehe Anlage 5).

39. Die Prüfsubstanz zusetzen, sobald sich das System stabilisiert und der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) im organischen Medium weitgehend (um etwa 80 %) abgenommen hat. Es muss sichergestellt werden, dass alle Anlagen mit gleicher Wirksamkeit funktionieren, bevor die Prüfsubstanz zugesetzt wird; ist dies nicht der Fall, ist es in der Regel sinnvoll, die einzelnen Schlämme zu mischen und die einzelnen Anlagen erneut mit identischen Schlammmengen zu beschicken. Wird ein Inokulum aus (etwa) 2,5 g/l (Trockengewicht) Belebtschlamm verwendet, so kann die Prüfsubstanz ab Testbeginn zugesetzt werden, denn die direkte Zugabe steigender Mengen von Testbeginn an hat den Vorteil, dass der Belebtschlamm möglicherweise besser an die Prüfsubstanz adaptiert wird. Wie immer die Prüfsubstanz zugegeben wird, empfiehlt es sich, die Dosierrate und/oder die Mengen in den Vorratsgefäßen regelmäßig zu messen.

*Handhabung von Belebtschlamm*

40. Je nach Qualität und Konzentration des organischen Mediums, Betriebsbedingungen, Art der vorhandenen Mikroorganismen und Einfluss der Prüfsubstanz und unabhängig vom verwendeten Inokulum stabilisiert sich die Konzentration der Belebtschlamm-Feststoffe während der Prüfung in der Regel im Bereich von 1 bis 3 g/l (Trockengewicht).

41. Entweder die in den Belüftungsgefäßen suspendierten Feststoffe mindestens wöchentlich bestimmen, wobei der Überschussschlamm verworfen wird, um die Konzentration zwischen 1 und 3 g/l (Trockengewicht) zu halten, oder das mittlere Schlammalter auf einem konstanten Wert (gewöhnlich innerhalb einer Bandbreite von 6 bis 10 Tagen) halten. Wird beispielsweise eine Schlammverweilzeit (*sludge retention time*, SRT) von 8 Tagen gewählt, sollte täglich 1/8 der im Belüftungsgefäß befindlichen Belebtschlammmenge abgezogen und verworfen werden. Dieser Vorgang ist täglich oder, vorzugsweise, mithilfe einer intermittent arbeitenden automatischen Pumpe zu wiederholen. Das Halten der Konzentration suspendierter Feststoffe auf einem konstanten Wert oder innerhalb einer engen Bandbreite garantiert keine konstante Schlammverweilzeit; letztere ist die Betriebsvariable, die den Wert der Prüfsubstanzkonzentration im Ablauf bestimmt.

42. Während der gesamten Prüfungsdauer zumindest täglich den an den Wänden des Belüftungs- und des Absetzungsgefäßes (Separator) anhaftenden Schlamm entfernen und resuspendieren. Alle Röhren und Schlauchleitungen regelmäßig kontrollieren und reinigen, um einen Bewuchs mit Biofilm zu vermeiden. Abgesetzten Schlamm aus dem Absetzungsgefäß (Separator) in das Belüftungsgefäß zurückführen, vorzugsweise durch intermittentes Pumpen. Beim *Porous-Pot*-System gibt es keine Schlammrückführung; es ist jedoch sicherzustellen, dass saubere Innentöpfe eingesetzt werden, bevor das Gefäßvolumen signifikant ansteigt (Nummer 21).

43. Bei *Husmann*-Anlagen kann es vorkommen, dass sich der Schlamm schlecht absetzt und verlorengeht. Diese Mängel können in Prüf- und Kontrollanlagen mit einer oder mehreren der nachstehend angeführten Maßnahmen zeitgleich behoben werden:

— Regelmäßige, z. B. wöchentliche Zuführung von frischem Schlamm oder Flockungsmittel (z. B. je Gefäß 2 ml einer 50 g/l-$FeCl_3$-Lösung), wobei jedoch sicherzustellen ist, dass es nicht zu einer Reaktion oder Präzipitation der Prüfsubstanz mit $FeCl_3$ kommt;

▼M4

— Ersetzung der Druckluftpumpe durch eine Peristaltikpumpe, um einen dem zuzuführenden Zulauf in etwa entsprechenden Schlammrücklauf und die Entwicklung eines anaeroben Milieus im abgesetzten Schlamm zu ermöglichen (die Geometrie der Druckluftpumpe begrenzt den Mindestdurchfluss des Rücklaufschlamms auf ungefähr das 12-fache der Zulaufmenge);

— intermittentes Zupumpen von Schlamm aus dem Absetzungsgefäß (Separator) in das Belüftungsgefäß (z. B. für 5 Minuten alle 2,5 Std, um statt 1 Liter/Std. 1,5 Liter/Std. zurückzuführen);

— Verwendung eines nichttoxischen schwach konzentrierten Antischaummittels (z. B. Silikonöl) zur Vermeidung von Verlusten durch Schaumbildung;

— kurze Luftschockstöße durch den Schlamm im Absetzungsgefäß (Separator) (z. B. stündlich 10 Sekunden);

— Intervalldosierung des organischen Medium in das Belüftungsgefäß (z. B. stündlich für jeweils 3 bis 10 Minuten).

*Probenahme und Analytik*

44. Konzentration an gelöstem Sauerstoff, Temperatur und pH-Wert des Belebtschlamms in den Belüftungsgefäßen in regelmäßigen Zeitabständen messen. Dabei ist sicherzustellen, dass stets ausreichend Sauerstoff vorhanden ist (> 2 mg/l) und die Temperatur innerhalb der erforderlichen Spanne (normalerweise zwischen 20 und 25 °C) liegt. Durch Zudosierung von kleinen Mengen einer anorganischen Base oder Säure ins Belüftungsgefäß oder in den Zulauf oder durch Erhöhung der Pufferkapazität des organischen Mediums (siehe Nummer 27) den pH-Wert auf 7,5 ± 0,5 konstant halten. Kommt es zur Nitrifikation, entsteht Säure, d. h. bei Oxidation von 1 mg N wird das Äquivalent von ungefähr 7 mg $CO_3^-$ erzeugt. Die Häufigkeit der Messung richtet sich nach dem Messparameter und der Systemstabilität und kann zwischen täglich und wöchentlich variieren.

45. Den DOC- bzw. den CSB-Wert in den Kontroll- und Prüfgefäßzuläufen messen. Die Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf der Prüfanlage durch spezifische Analyse messen oder anhand der Konzentration in der Stammlösung (Nummer 31), der verwendeten Menge und der der Prüfanlage zudosierten Abwassermenge schätzen. Es empfiehlt sich, die Konzentration der Prüfsubstanz zu berechnen, um die Streuung der Konzentrationsdaten zu verringern.

46. Aus (z. B. über 24 Stunden) gesammeltem Ablauf geeignete Proben ziehen und durch eine Membran einer Porengröße von 0,45 µm filtern oder bei 40 000 $m/s^2$ für ungefähr 15 Min. zentrifugieren. Erweist sich das Filtern als schwierig, sollte zentrifugiert werden. Der DOC- bzw. der CSB-Wert sollte mindestens doppelt bestimmt werden, um die vollständige Bioabbaubarkeit zu ermitteln; die primäre Bioabbaubarkeit erforderlichenfalls durch eine prüfsubstanzspezifische Analyse messen.

47. Die Verwendung des CSB-Wertes kann bei geringen Konzentrationen zu analytischen Problemen führen und wird daher nur empfohlen, wenn eine ausreichend hohe Prüfkonzentration (etwa 30 mg/l) verwendet wird. Bei stark adsorbierenden chemischen Substanzen sollte nach einem prüfsubstanzspezifischen Analyseverfahren auch die Menge der adsorbierten chemischen Substanz im Schlamm gemessen werden.

48. Die Probenahmehäufigkeit richtet sich nach der voraussichtlichen Prüfungsdauer. Empfohlen werden Probenahmen dreimal wöchentlich. Sobald die Anlagen ordnungsgemäß funktionieren, sollten nach der Beschickung mit Prüfsubstanz bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustands (*steady state*) 1 bis maximal 6 Wochen vorgesehen werden. In der Plateau-Phase (Nummer 59), die in der Regel 3 Wochen anhält, sollten wenn möglich mindestens 15 gültige Werte ermittelt werden, um das Prüfungsergebnis auswerten zu können. Die Prüfung kann abgeschlossen werden, wenn ein ausreichender Eliminationsgrad erreicht ist (z. B. > 90 %) und die genannten 15 Werte aus Analysen, die drei Wochen lang an jedem Wochentag durchgeführt wurden, vorliegen. Faustregel: Nach Zugabe der Prüfsubstanz sollte eine Prüfungsdauer von 12 Wochen nicht überschritten werden.

▼M4

49. Nitrifiziert der Schlamm und sollen die Auswirkungen der Prüfsubstanz auf die Nitrifikation untersucht werden, sind Proben aus dem Ablauf der Prüf- und der Kontrollanlage mindestens einmal wöchentlich auf Ammonium und/oder Nitrit sowie Nitrat zu untersuchen.

50. Alle Analysen sollten zügig durchgeführt werden; dies gilt vor allem für Stickstoffbestimmungen. Müssen Analysen aufgeschoben werden, sind die Proben bei etwa 4 °C in randvollen, dicht verschlossenen Flaschen dunkel zu lagern. Müssen Proben für länger als 48 Stunden gelagert werden, sind sie durch Tiefgefrieren, Ansäuern (z. B. mit 10 ml/l einer 400 g/l-Lösung Schwefelsäure) oder Zugabe einer geeigneten toxischen Substanz (z. B. 20 ml/l einer 10 g/l-Lösung Quecksilber-(II)-Chlorid) haltbar zu machen. Dabei ist sicherzustellen, dass die angewandte Konservierungsmethode die Analyseergebnisse nicht beeinträchtigt.

*Koppeln von Prüfanlagen*

51. Bei Anlagenkopplung (Anlage 3) täglich dieselbe Menge Belebtschlamm (150 ml — 1 500 ml für Belüftungsgefäße eines Fassungsvermögens von 3 Litern Liquorkultur) zwischen den Belüftungsgefäßen der Prüf- und der Kontrollanlage austauschen. Lagert sich die Prüfsubstanz stark an den Schlamm an, nur den Überstand der Absetzungsgefäße (Separatoren) austauschen. In beiden Fällen wird Berechnung der Prüfungsergebnisse einen Berichtigungsfaktor anwenden (Nummer 55).

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Auswertung der Ergebnisse**

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

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

Dabei sind:

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

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

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

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

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

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

Dabei sind:

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

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

▼M4

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

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

Dabei sind:

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

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

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

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

Dabei sind:

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

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

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

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

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

**Angabe der Prüfergebnisse**

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

*Adsorption*

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

▼M4

*Latenzphase (Lag-Phase)*

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

*Plateauphase*

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

*Mittlerer Eliminationsgrad der Prüfsubstanz*

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

*Elimination des organischen Mediums*

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

*Hinweis auf den biologischen Abbau*

62. Adsorbiert die Prüfsubstanz nicht signifikant an den Belebtschlamm und hat die Eliminationskurve die typische Form einer Bioabbaukurve mit Latenz-, Abbau- und Plateauphasen (Nummern 58, 59), so kann die gemessene Elimination mit Sicherheit dem biologischen Abbau zugeschrieben werden. War die Abnahme im Anfangsstadium hoch, kann der Simulationstest nicht zwischen biologischen und abiotischen Eliminationsprozessen differenzieren. In derartigen Fällen und in anderen Fällen, in denen Zweifel am biologischen Abbau bestehen (z. B. wenn die Prüfsubstanz ausgast (*stripping*)), die Adsorption der Prüfsubstanzen untersuchen, oder anhand von Parametern, die biologische Prozesse genau angeben, zusätzliche statische Bioabbaubarkeitstests durchführen. Zu derartigen Tests zählen die Sauerstoffaufnahmemethoden (Kapitel C.4 (D, E, F) dieses Anhangs (6)) oder Kohlendioxid-Entwicklungstests (Kapitel C.4 C dieses Anhangs (6)) oder die ISO-*Headspace*-Methode (18), bei der ein zuvor exponiertes Inokulum aus dem Simulationstest verwendet wird. Wurden sowohl die DOC-Abnahme als auch die Prüfsubstanzabnahme gemessen, zeigen große Unterschiede (d. h. wenn erstere geringer ist als letztere) zwischen den Abnahmeprozentwerten die Präsenz intermediärer organischer Produkte in den Abläufen an, die möglicherweise schwerer abzubauen sind als die Ausgangssubstanz.

*Gültigkeit der Prüfergebnisse*

63. Die Bestimmung des Eliminationsgrades des organischen Mediums (Nummer 53) in der Kontrollanlage liefert Informationen über das normale Abbauverhalten des Inokulums. Der Test kann als gültig angesehen werden, wenn der Grad der DOC- bzw. der CSB-Elimination in der (den) Kontrollanlage(n) nach zwei Wochen > 80 % beträgt und nichts Ungewöhnliches festgestellt wurde.

▼M4

64. Wurde eine leicht biologisch abbaubare (Referenz-)Substanz verwendet, sollte der Abbaubarkeitsgrad ($D_t$, Nummer 52) > 90 % betragen.

65. Wurde der Test unter nitrifizierenden Bedingungen durchgeführt, sollte die mittlere Konzentration in den Abläufen < 1 mg/l Ammonium-N und < 2 mg/l Nitrit-N betragen.

66. Sind diese Kriterien (Nummern 63-65) nicht erfüllt, müssen der Test mit einem Inokulum aus anderer Quelle wiederholt, eine Referenzsubstanz getestet und alle Testverfahren überprüft werden.

**Prüfbericht**

67. Der Prüfbericht muss Folgendes umfassen:

*Prüfsubstanz:*

— Kenndaten;

— physikalischer Zustand und, soweit relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften.

*Prüfbedingungen:*

— Art des Prüfsystems; etwaige Änderungen bei Prüfungen nicht löslicher und flüchtiger chemischer Substanzen;

— Art des organischen Mediums;

— Anteil (und Art) der Industrieabwässer im kommunalen Abwasser, soweit bekannt;

— Inokulum, Art und Probenahmestelle(n), Konzentration und etwaige Vorbehandlung;

— Prüfsubstanz-Stammlösung: DOC- und TOC-Gehalt; bei Suspension: Art der Aufbereitung; verwendete Testkonzentration; falls außerhalb der Bandbreite von 10-20 mg/l DOC: Begründung; Zugabemethode; Datum der ersten Zugabe; etwaige Änderungen;

— mittleres Schlammalter und mittlere hydraulische Verweilzeit; Methode des Überschussschlammabzugs; Methoden zur Verminderung der Bildung von Blähschlamm, von Schlammverlusten usw.;

— angewandte Analysetechniken;

— Testtemperatur;

— Eigenschaften wie Blähschlammbildung, Schlammvolumenindex (*Sludge Volume Index*, SVI), suspendierte Stoffe im Ablauf (*Mixed Liquor Suspended Solids*, MLSS);

— etwaige Abweichungen von Standardverfahren und etwaige Umstände, die die Testergebnisse möglicherweise beeinträchtigt haben.

*Prüfergebnisse:*

— alle Messdaten (DOC, CSB, spezifische Analysen, pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffkonzentration, suspendierte Feststoffe, N-Chemikalien, soweit relevant;

— alle Berechnungswerte für $D_t$ (oder $D_{tc}$), $D_B$, $D_{St}$ in tabellarischer Form und als Eliminationskurven;

— Aussagen zu Latenz- und Plateau-Phasen, Prüfungsdauer, Eliminationsgrad der Prüfsubstanz und des organischen Mediums in der Kontrollanlage sowie statistische Informationen und Angaben zur Bioabbaubarkeit und Gültigkeit des Tests;

— Diskussion der Ergebnisse.

▼**M4**

*LITERATUR:*


1. Swisher RD (1987). „*Surfactant Biodegradation*“, 2. Ausgabe. Marcel Dekker Inc. New York, S. 1085 ff.
2. Deutsche Bundesregierung (1962). Verordnung über die Abbaubarkeit von Detergenzien in Wasch- und Reinigungsmitteln. Bundesgesetzblatt, Teil I, Nr. 49: 698-706.
3. Painter HA and King EF (1978a). *WRc porous-pot method for assessing biodegradability*. Technischer Bericht Nr. 70, Water Research Centre, Medmenham, Vereinigtes Königreich.
4. Painter HA and King EF (1978b). *The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants*. Wat. Res. 12: 909-915.
5. Eckenfelder, W.W (19) US EPA.
6. Kapitel C.4 dieses Anhangs, Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit.
7. Kapitel C.12 dieses Anhangs, Biologische Abbaubarkeit — Modifizierter SCAS-Test.
8. Kapitel C.19 dieses Anhangs, Schätzung des Adsorptionskoeffizienten ($K_{OC}$) im Boden und in Klärschlamm mittels der Hochdruck-Flüssigchromatografie (HPLC).
9. Gerike P and Fischer WK (1979). *A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests*. Ecotox. Env. Saf. 3: 157-173.
10. Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II *Additional results and conclusions*. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.
11. Painter HA and Bealing D (1989). *Experience and data from the OECD activated sludge simulation test*, S. 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
12. ISO 11733 (1995; überarbeitet 2004). Bestimmung der Elimination und der biologischen Abbaubarkeit organischer Verbindungen in einem wässrigen Medium — Belebtschlamm-Simulationstest.
13. Birch RR (1982). *The biodegradability of alcohol ethoxylates*. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.
14. Birch RR (1984). *Biodegradation of noniomic surfactants*. J.A.O.C, S. 61 (2): 340-343.
15. Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). *Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test*. Wat.Res. 14: 753-758.
16. Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
17. Her Majesty’s Stationery Office (1982). *Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials*, S. 91-98 ISBN 011 751661 9.
18. ISO 14593 (1998). Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen im wässrigen Medium — Verfahren mittels Bestimmung des anorganischen Kohlenstoffs in geschlossenen Flaschen.

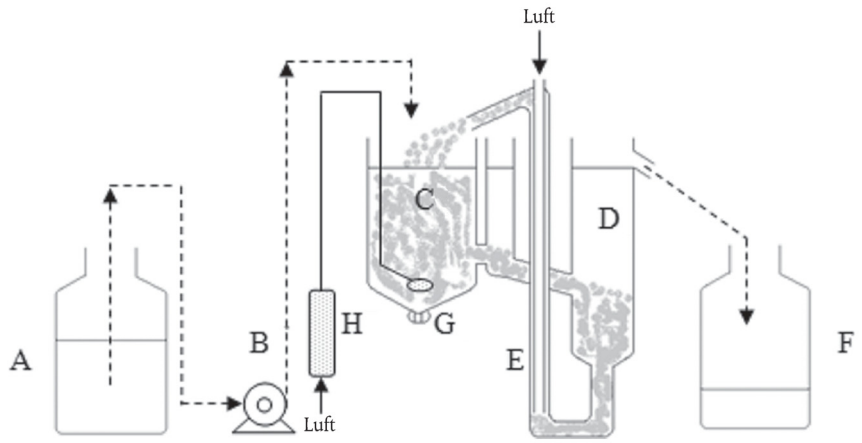
▼**M4**

*Anlage 1*

*Abbildung 1*

**Apparatur zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit**

*Husmann*-Anlage

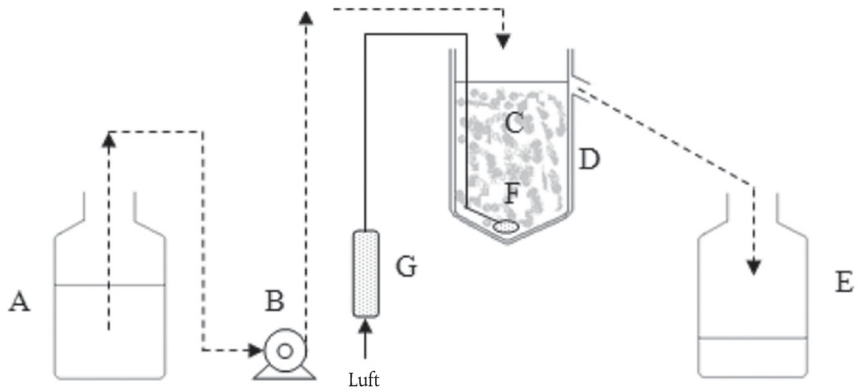



A. Vorratsgefäß
B. Dosierpumpe
C. Belüftungsgefäß (3 l-Volumen)
D. Absetzungsgefäß
E. Druckluftpumpe
F. Sammelgefäß
G. Fritte
H. Luftmengenmesser

*Abbildung 2*

**Apparatur zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit**

*„Porous-Pot“*-Anlage

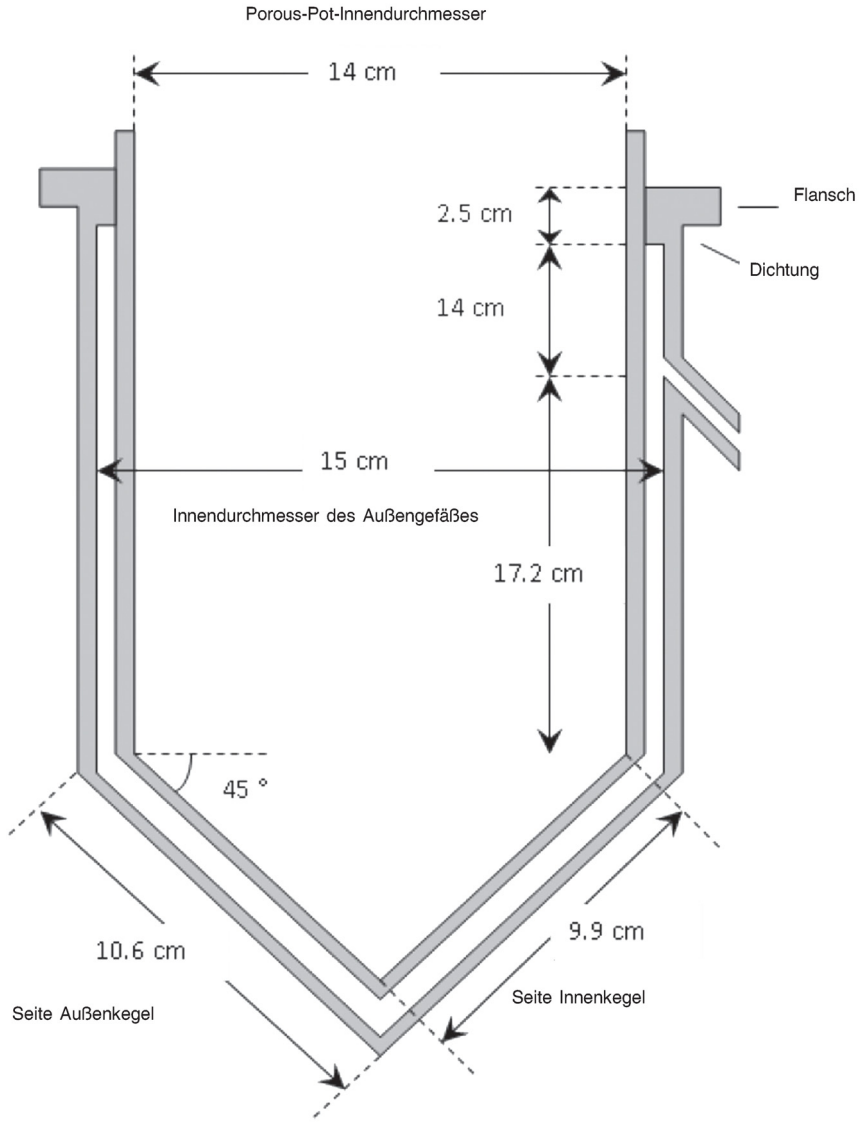



A. Vorratsgefäß
B. Dosierpumpe
C. Poröses Belüftungsgefäß
D. Undurchlässiges Außengefäß
E. Sammelgefäß
F. Diffusor
G. Luftmengenmesser

▼**M4**

*Abbildung 3*

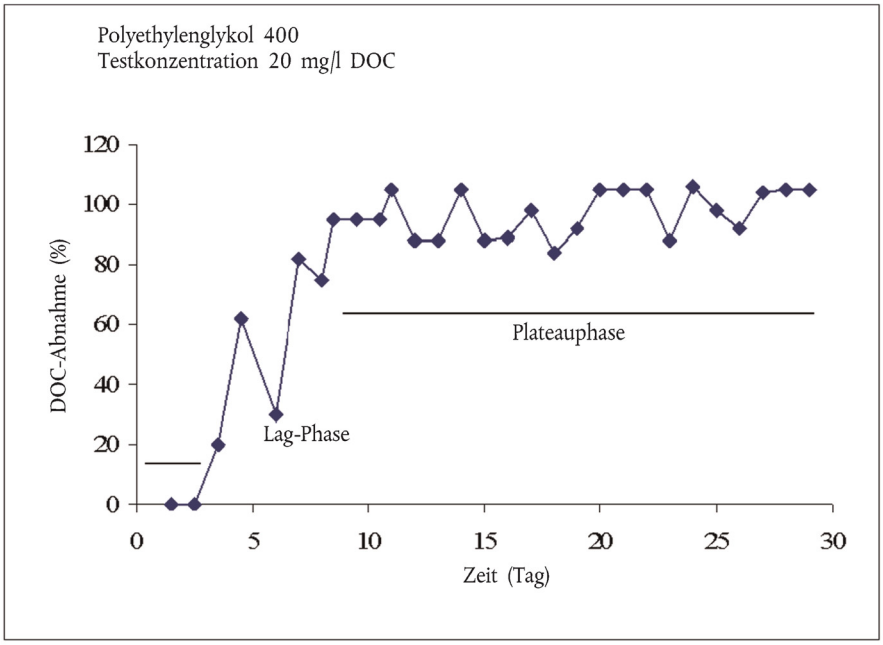
**Einzelheiten des 3-Liter-„*Porous-Pot*“-Belüftungsgefäßes**



▼**M4**

*Anlage 2*

**Beispiel einer Eliminationskurve**



▼M4

*Anlage 3*

[ZUR INFORMATION]

KOPPELN VON PRÜFANLAGEN

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

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

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

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

Dabei sind:

$D_{tc}$ = der berichtigte DOC- bzw. CSB-Eliminationsgrad (in %)

$D_t$ = die bestimmte DOC- bzw. CSB-Abnahme Eliminationsgrad (in %)

a = die ausgetauschte Fraktion des Volumens der Belebtschlammanlagen

r = die mittlere hydraulische Verweilzeit (in Std.)

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

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

*LITERATUR*

1. Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). *Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test*. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

2. Painter HA, Bealing DJ (1989). *Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test*, S. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

3. Painter HA, King EF (1978). *Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability*. Technischer Bericht TR70, Water Research Centre, Stevenage, Vereinigtes Königreich.

▼M4

*Anlage 4*

BEURTEILUNG DER BELEBTSCHLAMM-INHIBITION

**Hemmung durch Prüfsubstanzen**

1. Es kann vorkommen, dass eine chemische Substanz (oder ein Abwasser) im Simulationstest nicht abgebaut wird bzw. nicht abnimmt und sogar eine hemmende (inhibierende) Wirkung auf die Schlammmikroorganismen entfaltet. Andere chemische Substanzen werden in niedrigen Konzentrationen biologisch abgebaut, wirken jedoch in höheren Konzentrationen inhibierend (Hormesis). Inhibitionseffekte wurden möglicherweise in einem früheren Stadium festgestellt oder lassen sich im Toxizitätstest bestimmen, bei dem ein Inokulum verwendet wird, das dem im Simulationstest verwendeten Inokulum ähnlich oder identisch ist (1). Zu derartigen Methoden zählen die Prüfung der Atmungshemmung (Kapitel C.11 dieses Anhangs (2) und ISO 8192(3)) oder die Bestimmung der Hemmwirkung der Wasserbestandteile auf das Wachstum der Belebtschlamm-Mikroorganismen (ISO 15522 (4)).

2. Im Simulationstest manifestiert sich eine Hemmung dadurch, dass die Differenz zwischen dem DOC-Gehalt (bzw. dem CSB) des Prüfgefäßablaufs und dem des Kontrollgefäßablaufs größer ist als der mit der Prüfsubstanz zugeführte DOC. Anders ausgedrückt, die prozentuale Abnahme des DOC (und des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB), des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB), und/oder von $NH^+_4$) des organischen Kulturmediums ist geringer, wenn bei Prüfsubstanz zugeführt wird. In diesem Fall sollte der Test mit einer geringeren Prüfsubstanzkonzentration so lange wiederholt werden, bis ein Niveau erreicht ist, bei dem kein Hemmungseffekt mehr auftritt, wobei die Konzentration u. U. so weit verringert werden sollte, bis die Prüfsubstanz biologisch abgebaut ist. Hat die Prüfsubstanz (oder das Abwasser) jedoch in allen getesteten Konzentrationen eine nachteilige Wirkung auf den Prozess, so deutet dies darauf hin, dass die chemische Substanz nur schwer und möglicherweise überhaupt nicht biologisch abbaubar ist; es könnte jedoch sinnvoll sein, den Test mit Belebtschlamm aus einer anderen Quelle zu wiederholen und/oder den Schlamm schrittweise zu akklimatisieren.

3. Umgekehrt sollte die Konzentration der Prüfsubstanz erhöht werden, wenn diese bereits im ersten Simulationsversuch biologisch abgebaut wird und ermittelt werden muss, ob die chemische Substanz einen Inhibitionseffekt entfalten könnte.

4. Bei der Bestimmung von Hemmungsgraden sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass sich Belebtschlammpopulationen verändern können und dass die Mikroorganismen mit der Zeit möglicherweise eine Toleranz gegenüber hemmenden Substanzen entwickeln.

5. Berechnung des Hemmungsgrades:

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

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

   Dabei sind:

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

   E = die entsprechende Ablaufkonzentrationen (mg/l).

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

▼**M4**

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

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

Dabei sind:

$R_c$ = die prozentuale Abnahme in den Kontrollgefäßen

$R_t$ = die prozentuale Abnahme in den Prüfgefäßen

*LITERATUR*

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

▼M4

*Anlage 5*

**Schwer wasserlösliche Prüfsubstanzen — flüchtige chemische Substanzen**

**Schwer wasserlösliche chemische Substanzen**

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

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

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

**Flüchtige chemische Substanzen**

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

Der Test wird in zwei Phasen durchgeführt. Die Anlagen werden zunächst ohne Schlamm betrieben; synthetisches Abwasser PLUS Prüfsubstanz werden jedoch in das Belüftungsgefäß gepumpt. Es werden Zulauf- und Ablaufproben sowie Proben des austretenden Gases gezogen und einige Tage lang auf Präsenz von Prüfsubstanz analysiert. Aus den so erhobenen Daten kann der Prozentsatz ($R_{VS}$) der aus dem System gelösten und entfernten (gestrippten) Prüfsubstanz errechnet werden.

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

▼M4

Berechnung:

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

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

Dabei sind:

$R_{VP}$ = die prozentuale Abnahme der Prüfsubstanz aufgrund von Verflüchtigung,

$S_{VP}$ = die im Filter aufgefangene Prüfsubstanz, angegeben als äquivalente Konzentration in der Flüssigphase (mg/l),

$S_{IP}$ = die Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf (mg/l).

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

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

Dabei sind:

$R_V$ = die prozentuale Abnahme der Prüfsubstanz aufgrund von Verflüchtigung im biologischen Test,

$S_V$ = die im biologischen Test im Filter aufgefangene Prüfsubstanz, angegeben als äquivalente Konzentration im flüssigen Zulauf (mg/l),

$S_I$ = die Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf (mg/l).

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

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

Dabei ist:

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

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

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

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

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

*Beispiel:* Benzol

Schlammverweilzeit = 4 Tage

Synthetisches Abwasser; Verweilzeit = 8 Stunden

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

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

$S_V$ = 22,5 mg/l

$S_E$ = 50 µg/l

▼**M4**

Daher:

$R_{VP}$ = 100 %, $R_V$ = 15 %

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

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

*LITERATUR*

1. Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). *Biological degradation of tertiary butyl alcohol*. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

2. Pitter P, Chudoba J (1990). *Biodegradability of organic substances in the aquatic environment*. CRC Press. Boston, USA.

3. Stover EL, Kincannon DF (1983). *Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters*. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

4. ISO 10634 (1995) Wasserbeschaffenheit — Anleitung für die Vorbereitung und Behandlung von in Wasser schwer löslichen organischen Verbindungen für die nachfolgende Bestimmung ihrer biologischen Abbaubarkeit in einem wässrigen Medium.

5. Kapitel C.4 dieses Anhangs, Bestimmung der ‚leichten' biologischen Abbaubarkeit.

▼M4

*Anlage 6*

**Auswirkungen der Schlammverweilzeit auf die Behandlungsfähigkeit chemischer Substanzen**

EINLEITUNG

1. Die im Haupttext beschriebene Methode dient der Feststellung, ob die getesteten Substanzen (in der Regel Stoffe, die bekanntermaßen inhärent, aber nicht leicht biologisch abbaubar sind) innerhalb der für Kläranlagen geltenden Grenzen biologisch abgebaut werden können. Die Ergebnisse werden als prozentuale Abnahme und prozentualer biologischer Abbau angegeben. Die Betriebsbedingungen der Belebtschlammanlagen und die Wahl des Zulaufs lassen relativ breit gefächerte Prüfsubstanzkonzentrationen im Ablauf zu. Tests werden nur an Schlammfeststoffen in einer einzigen nominalen Konzentration oder bei einer einzigen nominalen Schlammverweilzeit (*sludge retention time*, SRT) durchgeführt, und die beschriebenen Verfahren für den Überschussschlammabzug können dazu führen, dass der SRT-Wert während des Tests sowohl von einem Tag zum anderen als auch während eines Tages beträchtlich variiert.

2. Bei dieser Variante (1)(2) wird die Schlammverweilzeit (wie dies auch bei Anlagen größeren Maßstabs der Fall ist) während jedes 24-Stunden-Zeitraums innerhalb sehr viel engerer Grenzen kontrolliert, wodurch sich eine konstantere Konzentration in den Abläufen ergibt. Es wird die Verwendung von Haushaltsabwasser empfohlen, da diese Abwasserart konsistentere und höhere Abnahmeprozentwerte ergibt. Darüber hinaus werden die Effekte verschiedener SRT-Werte untersucht, und in einer weiterreichenden Studie können die Effekte verschiedener Temperaturen auf die Ablaufkonzentration bestimmt werden.

3. Es besteht bisher kein allgemeines Einvernehmen darüber, welche kinetischen Modelle zugrunde liegen, wenn chemische Stoffe unter Abwasserbehandlungsbedingungen biologisch abgebaut werden. Auf die erhobenen Daten wurde das Monod-Modell (zur Vorhersage der Wachstumsgeschwindigkeit von Bakterien in Abhängigkeit von der Konzentration der Substrate) gewählt (1)(2), da die Methode nur zur Anwendung auf in großen Mengen produzierte chemische Substanzen bestimmt war, die in Abwasser in Konzentrationen von über 1 mg/l vorkommen. Die Gültigkeit des vereinfachten Modells und die aufgestellten Annahmen wurden anhand einer Reihe von Alkoholethoxylaten von unterschiedlicher primärer Bioabbaubarkeit bestimmt (2)(3).

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

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

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

5. Es können andere Apparaturtypen verwendet werden, doch muss in diesem Fall unbedingt sichergestellt werden, dass eine gute Kontrolle der Schlammverweilzeit gewährleistet ist. So muss bei der Verwendung von Anlagen mit Klärkasten möglicherweise in Kauf genommen werden, dass Feststoffe über den Anlagenablauf verloren gehen. Ferner sollten besondere Vorkehrungen getroffen werden, um Fehler aufgrund von Schwankungen der Schlammmenge im Klärkasten zu vermeiden.

▼M4

6. Die Anlagen werden unter allen gewählten Testbedingungen betrieben, und sobald Stabilität erreicht wurde, werden über einen Zeitraum von ungefähr drei Wochen die durchschnittlichen *Steady-State*-Konzentrationen der Prüfsubstanz in den Abläufen und — fakultativ — die DOC-Werte bestimmt. Zusätzlich zur Bestimmung der prozentualen Abnahme der Prüfsubstanz und der fakultativen Bestimmung des DOC-Wertes wird das Verhältnis zwischen Betriebsbedingungen und Prüfsubstanzkonzentration im Ablauf grafisch dargestellt. Auf diese Weise können kinetische Konstanten berechnet und die Bedingungen vorausgesagt werden, unter denen die Prüfsubstanz behandelt werden kann.

ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

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

NEGATIVE/POSITIVE TESTERGEBNISSE (PASS/FAIL)

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

REFERENZSUBSTANZ

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

REPRODUZIERBARKEIT VON TESTERGEBNISSEN

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

BESCHREIBUNG DER METHODE

***Apparatur***

11. Als Anlage ist das modifizierte *Porous-Pot*-System geeignet (siehe Anlage 6.1). Das System besteht aus einem Innengefäß (oder Einsatz) aus porösem Polypropylen mit einer Dicke von 3,2 mm und einer Porengröße von ungefähr 90 µm; das Anschlussstück ist stumpfgeschweißt (dadurch wird die Anlage robuster als das unter Nummer 21 dieses Kapitels C.10 A beschriebene System). Das Innengefäß wird in ein größeres Außengefäß aus undurchlässigem Polyethylen eingesetzt, welches aus zwei Teilen besteht — einer runden Basisplatte mit ausgestanzten Lochöffnungen für zwei Luftleitungen und eine Schlammabzugleitung und einem aufschraubbaren Zylinder mit einem derart angeordneten Ausfluss, dass das Volumen im Topf stets auf 3 Liter gehalten werden kann. Eine der Luftleitungen ist mit einem Lüftungsstein versehen, die andere ist an einem Ende offen und im Topf im rechten Winkel zum Stein angeordnet. Das System erzeugt genügend Turbulenz, um den Inhalt des Topfes vollständig durchzumischen und Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff von über 2 mg/l zu gewährleisten.

12. Die Anlagen in angemessener Zahl entweder im Wasserbad oder in konstant temperierten Räumen unter kontrollierten Temperaturbedingungen zwischen 5 und 20 °C (± 1 °C) betreiben. Um die Prüfsubstanzlösung und den abgesetzten Schlamm in den vorgeschriebenen Raten (0-1,0 ml/Min bzw. 0-25 ml/Min) in die Belüftungsgefäße zu dosieren, sind Pumpen erforderlich; eine dritte Pumpe zieht den Überschussschlamm aus den Belüftungsgefäßen ab. Die erforderliche sehr langsame Fließgeschwindigkeit des Überschussschlamms wird erreicht, indem eine Pumpe auf höhere Geschwindigkeit eingestellt und mithilfe einer Zeitschaltuhr intermittent, d. h. 10 Sekunden pro Minute, betrieben wird, wobei eine Pumpenleistung von 3 ml/Min eine Abzugrate von 0,5 ml/Min ergibt.

*Filtrationsgerät oder Zentrifuge*

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

*Analysegerät*

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

*Wasser*

▼**M4**

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

*Organisches Medium*

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

*Synthetisches Abwasser*

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

*Haushaltsabwasser*

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

*Belebtschlamm*

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

*Stammlösungen der Prüfsubstanz*

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

PRÜFVERFAHREN

*Aufbereitung des Inokulums*

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

*Anzahl Prüfanlagen*

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

*Zudosierung des organischen Mediums und der Prüfsubstanz*

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

*Handhabung von Belebtschlammanlagen*

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

*Probnahme und Analyse*

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

▼M4

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Auswertung der Ergebnisse**

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

**Darstellung der Prüfergebnisse**

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

**Berechnung kinetischer Konstanten**

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

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

**Variabilität von Ergebnissen**

29. Es ist durchaus gängig, dass für kinetische Parameter bestimmter chemischer Substanzen unterschiedliche Werte erzielt werden. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl die Bedingungen, unter denen sich der Schlamm vermehrt hat, als auch die Testbedingungen (wie unter Nummer 5 und für andere Tests beschrieben) großen Einfluss auf die Prüfergebnisse haben. Ein Aspekt dieser Variabilität wurde von *Grady et al* (4) erörtert, die vorschlugen, die Begriffe „existierend“ (*extant*) und „intrinsisch“ (*intrinsic*) auf die beiden die Grenzen des physiologischen Zustands einer Kultur repräsentierenden Extremzustände anzuwenden, die während eines kinetischen Versuchs erreicht werden können. Darf sich der Zustand während des Tests nicht verändern, so spiegeln die Werte der kinetischen Parameter die Bedingungen des Milieus wider, aus dem die Mikroorganismen entnommen wurden; diese Werte gelten als „existierend“, d. h. gegenwärtig vorhanden. Am anderen Ende, d. h. wenn die Testbedingungen die vollständige Entwicklung des protein-synthetisierenden Systems und somit eine größtmögliche Wachstumsrate gestatten, gelten die erzielten kinetischen Parameter als „intrinsisch“ und werden nur von der Art des Substrats und den Arten von Bakterien in der Kultur beeinflusst. Als Faustregel gilt, dass *Existenz*-Werte erzielt werden, wenn das Verhältnis von Substratkonzentration zu kompetenten (d. h. auf den Abbau spezialisierten) Mikroorganismen ($S_o/X_o$) gering, z. B. auf 0,025, gehalten wird, während intrinsische Werte anfallen, wenn dieses Verhältnis größer ist und ein Wert von mindestens 20 vorliegt. In beiden Fällen sollte $S_o$ dem relevanten Wert von Ks — der Halbsättigungskonstante — entsprechen oder darüber liegen.

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

*LITERATUR:*

1. Birch RR (1982). *The biodegradability of alcohol ethoxylates*. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

2. Birch RR (1984). *Biodegradation of nonionic surfactants*. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

3. Birch RR (1991). *Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment*. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

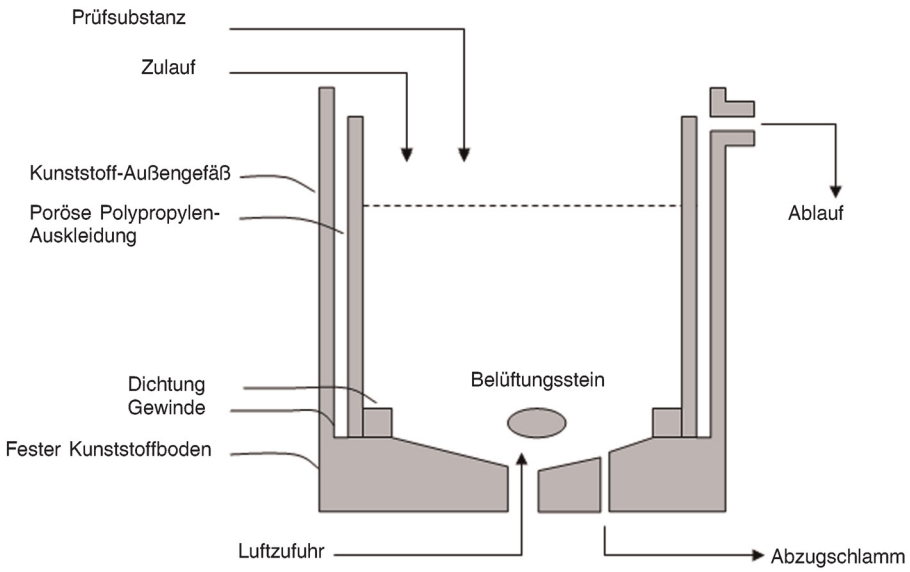
4. Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). *Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology*. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

5. *Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making* (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Herausgeber: Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6. September 1996. SETAC-Europe, Brüssel.

▼M4

*Anlage 6.1*

**„Porous Pot“ mit SRT-Kontrolle**



▼M4

*Anlage 6.2*

**Berechnung von kinetischen Konstanten**

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

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

oder

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

Dabei sind:

$S_1$ = die Konzentration des Substrats im Ablauf, (mg/l)

$K_S$ = die Halbsättigungskonstante, d. h. die Konzentration, bei der $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

$\mu$ = die spezifische Wachstumsrate ($d^{-1}$)

$\mu_m$ = der Höchstwert von $\mu_m$ ($d^{1}$)

$K_d$ = die spezifische Zerfallsrate aktiver Feststoffe ($d^{-1}$)

$\theta_S$ = die mittlere Schlammverweilzeit, SRT (d)

Die Prüfung dieser Gleichung führt zu folgenden Schlussfolgerungen:

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

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

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

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

Dabei ist:

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

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

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

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

▼**M4**

und

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

Dabei sind:

V = das Volumen des Belüftungsgefäßes (l)

$X_1$ = die Feststoffkonzentration im Belüftungsgefäß (mg/l)

$X_2$ = die Feststoffkonzentration im Ablauf (mg/l)

$Q_0$ = die Zuflussrate (l/d)

$Q_1$ = die Schlammabzugsrate (l/d)

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

Schlussfolgerungen

3. Hauptzweck dieses Tests ist es demnach, die Vorhersage der Ablaufkonzentration und somit der Prüfsubstanzmengen in den Vorflutern zu ermöglichen.

4. Durch Auftragen von $S_1$ gegen $\theta_S$ lässt sich die kritische Schlammverweilzeit, $\theta_{SC}$, in manchen Fällen vorhersagen; siehe beispielsweise Kurve 3 in Abbildung 1. Ist dies nicht möglich, kann $\theta_{SC}$ (zusammen mit Näherungswerten für $\mu_m$ und $K_S$) berechnet werden durch Auftragen von $S_1$ gegen $S_1 \bullet \theta_S$.

Die Umstellung von Gleichung (1) ergibt

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

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

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

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

▼M4

*Abbildung 1*

**Drei Temperaturen; fünf Schlammverweilzeiten (SRT)**

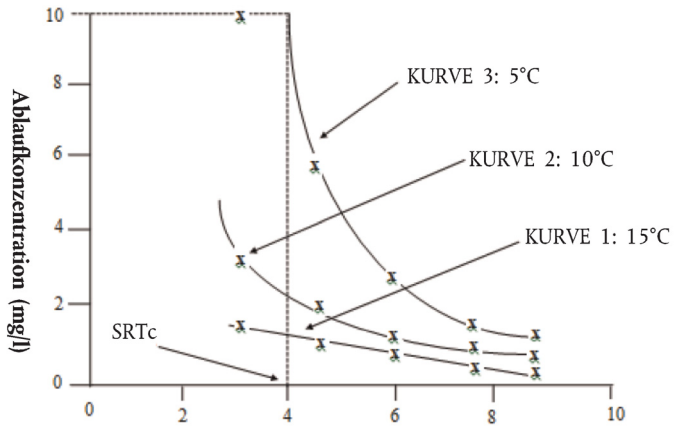
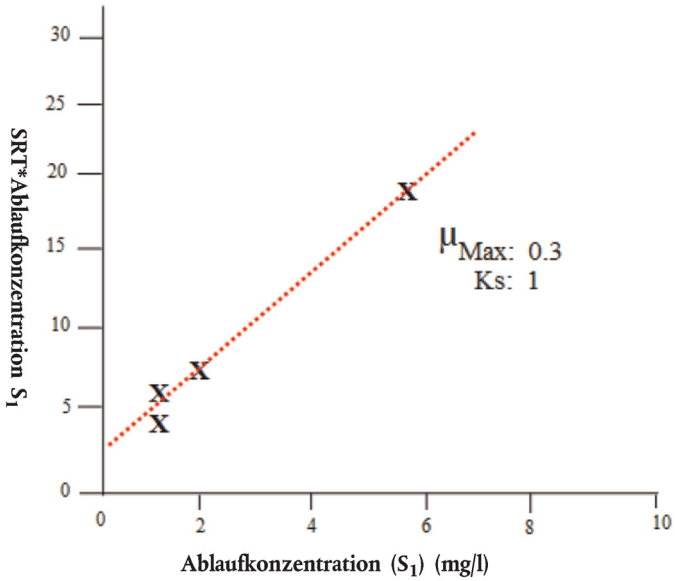



*Abbildung 2*

**Regressionsgerade SRT — $S_1$ vs $S_1$ bei Temperatur T = 5 °C**




*Legende:*

Ablaufkonzentration:

Kurve:

▼M4

*Anlage 7*

TESTS BEI NIEDRIGEN (µg/l) KONZENTRATIONSBEREICHEN

1. Zahlreiche chemische Substanzen sind im Wassermilieu, auch in Abwässern, normalerweise in sehr niedrigen Konzentrationen (µg/l) vorhanden. In derart kleinen Mengen sind sie als primäre Vermehrungssubstrate eher nicht geeignet, sondern werden vielmehr als vermehrungsunfähige Sekundärsubstrate zur gleichen Zeit wie diverse natürlich vorkommende kohlenstoffhaltige Substanzen biologisch abgebaut. Das in Anlage 6 beschriebene Modell ist für den Abbau derartiger chemischer Stoffe folglich nicht geeignet. Viele andere Modelle könnten jedoch angewendet werden, und unter den in Abwasserbehandlungssystemen vorherrschenden Bedingungen in vielen Fällen zeitgleich. Zur Klärung dieser Frage ist jedoch noch größerer Forschungsaufwand erforderlich.

2. Bis dahin kann das im Haupttext beschriebene Verfahren (Kapitel C.10 A) angewendet werden, allerdings nur zur Bestimmung der primären Bioabbaubarkeit mittels angemessen geringer Konzentrationen (< 100 µg/l) und nach einem validierten Analyseverfahren. Die prozentuale biologische Abbaubarkeit kann berechnet werden (siehe Nummer 54 der Prüfmethode), sofern abiotische Prozesse (Adsorption, Flüchtigkeit usw.) berücksichtigt werden. Als Beispiel kann die Studie von *Nyholm et al.* (1)(2) angeführt werden, bei der die Prüfanlage im 4-Stunden-Takt mit Prüfsubstanz beschickt wurde (*Fill-and-Draw*-Methode). Für fünf chemische Stoffe, mit denen synthetisches Abwasser im Verhältnis 5 zu 100 µg/l beimpft wurde, wurden Konstanten pseudo-erster Ordnung berichtet. (Für vollständige Bioabbaubarkeit können $^{14}$C-markierte Prüfsubstanzen verwendet werden. Da hierfür bislang keine allgemein anerkannten Verfahren vorliegen, geht eine Beschreibung dieser Methode über den Geltungsbereich der vorliegenden Prüfmethode hinaus, wenngleich eine für ISO 14592 (3) vorgeschlagene Methode Leitlinien für die Verwendung $^{14}$C-markierter chemischer Stoffe enthält.)

**SCAS-Test**

3. Später wurde ein einfacherer Zwei-Phasen-Test vorgeschlagen (4)(5)(6); auf die halbkontinuierliche Belebtschlamm-(SCAS)-Methode folgen kinetische Schnelltests an Proben aus den SCAS-Anlagen. Beim SCAS-System sind (im Gegensatz zur ursprünglichen C.12-Prüfmethode) die Überschussschlamm-Abzugsraten bekannt, und die Anlage wird mit modifiziertem synthetischen Abwasser (OECD) oder Haushaltsabwasser beschickt. Das synthetische Abwasser wurde (wegen veränderlichem pH-Wert und unzulänglicher Schlammsedimentation) durch Zugabe von Phosphatpuffer, Hefeextrakt, Eisen-(III)-Chlorid und Spurenelementsalzen modifiziert, und sein CSB wurde durch Erhöhung der Pepton- und Fleischextraktkonzentration auf etwa 750 mg/l angehoben. Die Anlagen wurden im 24-Stunden-Zyklus betrieben, d. h. Belüftung für 23 Stunden, Überschussschlammabzug, Sedimentation, Entfernung des Überstands (über den Ablauf) mit anschließender Zuführung von synthetischem Abwasser PLUS Prüfsubstanz in Höhe von bis zu 100 µg/l (d. h. in ungefähr derselben Konzentration wie beim Schnelltest). Einmal wöchentlich wurden 10 % des gesamten Schlamms durch frischen Schlamm ersetzt, um eine ausgewogene Mikrobenpopulation zu gewährleisten.

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

**Schnelltest**

5. Ein Schnelltest (z. B. ein 8-Stunden-Test) wird durchgeführt, um die Konstante der Abbaukinetik (pseudo-)erster Ordnung zu bestimmen, die über die Geschwindigkeit der Zersetzung der Prüfsubstanz in Belebtschlamm aus bekannten, jedoch unterschiedlichen Quellen und Werdegängen Aufschluss gibt. Während eines Akklimatisationsversuchs (Nummern 3, 4) werden insbesondere aus den SCAS-Reaktoren Schlammproben gezogen, und zwar am Ende einer Belüftungsphase, wenn die Konzentration des organischen Substrats gering ist. Zum Vergleich kann Schlamm auch aus einer parallel laufenden SCAS-Anlage entnommen werden, die nicht mit Prüfsubstanz

▼M4

beschickt wurde. Gemische aus Schlamm und Prüfsubstanz, die in zwei oder mehr Konzentrationen zwischen 1 µg/l und 50 µg/l zugeführt wird, werden ohne Zugabe von synthetischem Abwasser oder einem anderen organischen Substrat belüftet. Die Restprüfsubstanz in der Lösung wird während eines Zeitraums von maximal 24 Stunden je nach Abbaubarkeit der chemischen Substanz in regelmäßigen Zeitabständen, z. B. stündlich, bestimmt. Vor den entsprechenden Analysen werden die Proben zentrifugiert.

**Berechnungen**

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

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

Dabei sind:

t = der Belüftungszeitraum (23 Stunden)

$C_e$ = die Konzentration am Ende des Belüftungszeitraums (µg/l)

$C_i$ = die Konzentration zu Beginn des Belüftungszeitraums (µg/l)

SS = die Konzentration von Belebtschlammfeststoffen (g/l)

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

**Variabilität der Ergebnisse**

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

*LITERATUR*

1. Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). *Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability*. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). *Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption*. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der aeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Verbindungen in geringen Konzentrationen.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). *Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations.* Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg UT and Nyholm N (1996). *Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations*. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). *Activated sludge biodegradability simulation test*. Umweltprojekt, Nr. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Ministerium für Umwelt und Energie, Kopenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: *Generation and use of data for regulatory decision making* (1997). Workshop in Port Sunlight, VK. Verlag: Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4.-6. September 1996. SETAC-Europe, Brüssel.

▼M4

## C.10-B: Biofilme

EINLEITUNG

1. Simulationstests werden normalerweise an chemischen Substanzen vorgenommen, die sich im Screeningtest als nicht leicht abbaubar erwiesen haben (Kapitel C.4 (A-F) dieses Anhangs (9)), deren potenzielle (oder inhärente) biologische Abbaubarkeit jedoch im Test nachgewiesen wurde. In Ausnahmefällen werden Simulationstests auch an Substanzen vorgenommen, zu denen mehr Informationen benötigt werden (vor allem wenn sie in großen Mengen vorkommen), wobei in der Regel das Belebtschlammverfahren angewandt wird (C.10-A). In bestimmten Fällen sind jedoch spezifische Informationen über das Abbauverhalten einer chemischen Substanz bei biologischer Abwasserbehandlung (durch Biofilmreaktoren wie z. B. Tropfkörper, Tauchkörper, Fließbettreaktoren) erforderlich. Zu diesem Zweck wurden diverse Apparaturen entwickelt.

2. Gerike *et al*. (1) verwendeten große pilotmaßstäbliche Tropfkörper als gekoppelte Anlagen. Diese Filter nahmen viel Platz in Anspruch und erforderten verhältnismäßig große Mengen an Abwasser oder synthetischem Abwasser. Truesdale *et al*. (2) beschrieben kleinere Filter (eines Durchmessers von 6 Fuß × 6 Zoll), denen ein tensidfreies natürliches Abwasser zugeführt wurde; allerdings erforderten auch diese Filter immer noch große Wassermengen. Es dauerte 14 Wochen, bis sich ein „reifer" Biofilm entwickelte, und bis zur Akklimatisierung waren nach der Beschickung mit dem Prüftensid noch weitere 4-8 Wochen erforderlich.

3. Baumann *et al.* (3) entwickelten einen viel kleineren Filter, bei dem Polyester-„Vlies" verwendet wurde, das zuvor als inerte Aufwuchsfläche (*Substratum*) für den Biofilm in Belebtschlamm getränkt wurde. Die Prüfsubstanz wurde als die einzige C-Quelle verwendet, und die biologische Abbaubarkeit wurde durch Messung des gelösten organischen Kohlenstoffs (*dissolved organic carbon*, DOC) im Zu- und Ablauf und anhand des $CO_2$-Gehalts des austretenden Gases bestimmt.

4. Gloyna *et al.* (4), die Erfinder des Drehrohrreaktors, verfolgten einen ganz anderen Ansatz. Auf der Innenfläche des Drehrohres wurde ein Biofilm gebildet, indem die betreffende Fläche über die Stirnseite des in einem kleinem Winkel zur Horizontalen angeordneten Rohres mit Zulaufwasser überströmt wurde. Der Reaktor wurde zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von Tensiden (5), aber auch zur Untersuchung der optimalen Dicke der Biofilmschicht und der Diffusion durch den Film (6) verwendet. Gloyna *et al.* entwickelten den Reaktor weiter, auch durch Modifizierung, um den $CO_2$-Gehalt des austretenden Gases bestimmen zu können.

5. Der Drehrohrreaktor wurde vom *Standing Committee of Analysts* (Vereinigtes Königreich) als Standardmethode für die Bestimmung sowohl der biologischen Abbaubarkeit chemischer Substanzen (7) als auch der Reinigungsfähigkeit und Toxizität von Abwässern (8) anerkannt. Die hier beschriebene Methode hat den Vorteil, dass sie einfach, kompakt und reproduzierbar ist und relativ kleine Mengen an organischem Medium benötigt werden.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

6. Die Innenfläche eines langsam rotierenden geneigten Rohres wird mit synthetischem Abwasser oder Haushaltsabwasser und Prüfsubstanz (dazugemischt oder separat) überströmt. Auf dieser Innenfläche bildet sich eine Schicht von Mikroorganismen, die denen auf Biofiltermedien vergleichbar sind. Die Prozessbedingungen des Reaktors werden so gewählt, dass eine angemessene Eliminierung der organischen Substanzen und, falls nötig, eine Ammonium-Oxidation erfolgt.

▼M4

7. Ausfluss aus dem Rohrablauf wird gesammelt und abgesetzt und/oder gefiltert, bevor der DOC- und/oder der Prüfsubstanzgehalt nach einer spezifischen Methode analysiert wird. Zeitgleich werden zu Vergleichszwecken unter denselben Bedingungen Kontrollanlagen ohne Prüfsubstanz betrieben. Dabei wird angenommen, dass die Differenz zwischen den DOC-Konzentrationen im Ablauf der Prüf- und der Kontrollanlage durch die Prüfsubstanz und ihre organischen Stoffwechselprodukte bedingt ist. Zur Berechnung der Elimination der Prüfsubstanz wird diese Differenz mit der Konzentration der zugeführten Prüfsubstanz (als DOC) verglichen.

8. Der biologische Abbau lässt sich in der Regel durch sorgfältige Prüfung der Eliminations-Zeit-Kurve von der Bioadsorption differenzieren. Dies kann gewöhnlich durch einen Test auf leichte Bioabbaubarkeit (Sauerstoffaufnahme oder Kohlendioxidproduktion) bestätigt werden, bei dem ein akklimatisiertes Inokulum verwendet wird, das am Ende des Tests aus den mit der Prüfsubstanz beschickten Reaktoren entnommen wird.

ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

9. Reinheit, Wasserlöslichkeit und Flüchtigkeit sowie die Adsorptionsmerkmale der Prüfsubstanz sollten bekannt sein, um eine akkurate Ergebnisauswertung zu ermöglichen.

10. Normalerweise können flüchtige oder schwer lösliche chemische Substanzen nicht getestet werden, es sei denn, es werden besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen (siehe Kapitel C.10-A, Anlage 5). Die chemische Struktur oder zumindest die empirische Formel sollten ebenfalls bekannt sein, um theoretische Werte berechnen und/oder gemessene Parameterwerte, z. B. für den theoretischen Sauerstoffbedarf (ThOD) oder den DOC, überprüfen zu können.

11. Angaben zur Toxizität der Prüfsubstanz für Mikroorganismen (siehe Kapitel C.10-A, Anlage 4) können für die Wahl geeigneter Testkonzentrationen zweckdienlich und für die korrekte Auswertung niedriger Bioabbaubarkeitswerte ausschlaggebend sein.

NEGATIVE/POSITIVE TESTERGEBNISSE (PASS/FAIL)

12. Ursprünglich musste die primäre Bioabbaubarkeit von Tensiden mindestens 80 % betragen, bevor die Substanz in den Verkehr gebracht werden konnte. Wird der Wert von 80 % nicht erreicht, kann der vorliegende Simulations-(Bestätigungs-)Test durchgeführt werden, und das Tensid darf nur in den Verkehr gebracht werden, wenn über 90 % der betreffenden Substanz abgebaut wurden. Im Allgemeinen stellt sich die *Pass-/Fail*-Frage bei chemischen Substanzen nicht, und der Wert der prozentualen Abnahme kann zur approximativen Berechnung der wahrscheinlichen Umweltkonzentration einer chemischen Substanz verwendet werden, die zur Analyse der von chemischen Substanzen ausgehenden Gefahren erforderlich ist. Einige Untersuchungen reiner Chemikalien haben in mehr als drei Viertel aller Fälle eine prozentuale DOC-Abnahme von > 90 % und bei über 90 % der Substanzen, die sich in nennenswerten Maße als biologisch abbaubar erwiesen haben, von > 80 % ergeben.

REFERENZSUBSTANZEN

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

REPRODUZIERBARKEIT VON TESTERGEBNISSEN

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

▼M4

BESCHREIBUNG DES PRÜFVERFAHRENS

**Apparatur**

*Drehrohrreaktoren*

15. Die Apparatur (siehe Anlage 8, Abbildungen 1 und 2) besteht aus einer Reihe von jeweils 30,5 cm langen Acrylrohren mit jeweils 5 cm Innendurchmesser, die innerhalb eines metallenen Stützkastens auf Gummirollen angeordnet sind. Jedes Rohr hat einen ca. 0,5 cm tiefen Flansch, damit es fest auf den Rädern aufsitzt, eine mit grober Stahlwolle aufgeraute Innenfläche und am Stirnende (Zufuhrende) einen 0,5 cm tiefen inneren Randabschluss, um ein Überlaufen der Flüssigkeit zu vermeiden. Die Rohre sind in einem Winkel von ungefähr einem Grad zur Horizontalen angeordnet, um, wenn das Testmedium dem sauberen Rohr zugeführt wird, die erforderliche Kontaktzeit zu gewährleisten. Die Gummirollen werden mithilfe eines Motors mit Geschwindigkeitssteuerung langsam gedreht. Da die Apparatur in einem Raum mit konstanten Temperaturbedingungen aufgestellt wird, ist Temperaturkontrolle gewährleistet.

16. Indem jeder Rohrreaktor in ein geringfügig größeres, gedeckeltes Rohr gesetzt und sichergestellt wird, dass die Anschlüsse gasdicht sind, könnte austretendes $CO_2$ in einer alkalischen Lösung aufgefangen und anschließend gemessen werden (6).

17. Für jedes Rohr wird in einem 20 l-Vorratsgefäß (A) (siehe Abbildung 2) ein 24-Stunden-Vorrat an organischem Medium, gegebenenfalls mit Prüfsubstanz versetzt, bereitgehalten. Bei Bedarf kann die Prüfsubstanz separat dosiert zugeführt werden. Am unteren Ende jedes Vorratsgefäßes befindet sich ein Ausguss, der mit einen geeigneten Schlauch, z. B. aus Silikonkautschuk, über eine Peristaltikpumpe (B) an ein Glas- oder Acryl-Überführungsrohr angeschlossen ist, das an der Stirnseite des geneigten Rohrreaktors 2-4 cm tief in das Rohr eingeführt wird (C). Der Abfluss wird am unteren Ende des Rohres in einem Sammelgefäß aufgefangen (D). Er wird vor der Analyse abgesetzt oder gefiltert.

*Filtrationsgerät — Zentrifuge*

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

19. Analysegerät zur Bestimmung folgender Größen:

— DOC/TOC (gesamter organischer Kohlenstoff) oder CSB (chemischer Sauerstoffbedarf);

— bestimmte chemische Substanz (mittels HPLC, GC usw.), soweit erforderlich;

— pH-Wert, Temperatur, Azidität und Alkalinität;

— Ammonium, Nitrit und Nitrat, wenn die Tests unter nitrifizierenden Bedingungen durchgeführt werden.

*Wasser*

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

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

▼M4

*Organisches Medium*

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

*Synthetisches Abwasser*

23. In jedem Liter Leitungswasser wird Folgendes aufgelöst: 160 mg Pepton; 110 mg Fleischextrakt; 30 mg Harnstoff; 28 mg wasserfreies Dikaliumhydrogenphosphat ($K_2HPO_4$); 7 mg Natriumchlorid (NaCl); 4 mg Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2.2H_2O$); 2 mg Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($Mg_2SO_4.7H_20$). Dieses synthetische Abwasser (OECD) hat Beispielcharakter und ergibt eine mittlere DOC-Konzentration im Zulauf von etwa 100 mg/l. Alternativ können andere Zusammensetzungen mit ähnlichen DOC-Konzentrationen verwendet werden, die realitätsnäher sind. Dieses synthetische Abwasser kann aus destilliertem Wasser in konzentrierter Form hergestellt und bis zu einer Woche bei ungefähr 1 °C gelagert werden. Bei Bedarf wird es mit Leitungswasser verdünnt. (Dieses Medium ist eher ungeeignet, weil die Stickstoffkonzentration sehr hoch und der Kohlenstoffgehalt relativ niedrig ist; es gibt jedoch keine besseren Empfehlungen, außer dass mehr Phosphat (als Puffer) sowie zusätzliches Pepton hinzugefügt werden könnten).

*Haushaltsabwasser*

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

*Schmiermittel*

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

*Stammlösungen der Prüfsubstanz*

26. Für angemessen lösliche chemische Substanzen werden in geeigneten Konzentrationen (z. B. 1 bis 5 g/l) in entionisiertem Wasser oder in einer mineralischen Kulturlösung aus synthetischem Abwasser Stammlösungen angesetzt. Für nicht lösliche chemische Substanzen siehe Kapitel C.10-A, Anlage 5. Diese Methode ist für flüchtige Substanzen ohne Modifizierung der Drehrohrreaktoren (Nummer 16) nicht geeignet. Der DOC- und der TOC-Gehalt der Stammlösung werden bestimmt und die Messungen für jede neue Charge wiederholt. Bei einer Differenz zwischen DOC und TOC von mehr als 20 % wird die Wasserlöslichkeit der Prüfsubstanz überprüft. Der DOC oder die durch spezifische Analyse der Stammlösung

▼M4

gemessene Konzentration der Prüfsubstanz wird mit dem Nennwert verglichen, um festzustellen, ob die Wiederfindungsrate ausreicht (in der Regel kann mit > 90 % gerechnet werden). Vor allem bei Dispersionen ist festzustellen, ob der DOC-Wert als Analyseparameter verwendet werden kann oder nicht oder ob nur ein prüfsubstanzspezifisches Analyseverfahren angewendet werden kann. Bei Dispersionen müssen die Proben zentrifugiert werden. Bei jeder neuen Charge werden der DOC-Wert, der CSB-Wert bzw. die Prüfsubstanz durch spezifische Analyse gemessen.

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

PRÜFVERFAHREN

*Vorbereitung des organischen Mediums für die Zudosierung*

28. Alle Zulauf- und Ablaufgefäße und die Schlauchleitungen aus den Zulauf- und zu den Ablaufgefäßen sind vor und während des Tests gründlich zu säubern, um Mikrobenbewuchs zu entfernen.

29. Aus den Feststoffen oder aus der konzentrierten Stammlösung wird durch Verdünnen mit einer angemessenen Menge Leitungswasser täglich frisches synthetisches Abwasser (Nummer 23) vorbereitet. Die erforderliche Menge wird in einem Zylinder dosiert und in ein sauberes Vorratsgefäß gegeben. Bei Bedarf wird dem synthetischen Abwasser vor der Verdünnung auch die Stammlösung der Prüfsubstanz oder der Referenzsubstanz in vorgegebener Menge zugesetzt. Wenn dies praktischer oder zur Vermeidung von Prüfsubstanzverlusten notwendig ist, wird in einem separaten Gefäß eine verdünnte Lösung der Prüfsubstanz gesondert vorbereitet und dem geneigten Rohrreaktor über eine andere Dosierpumpe zugeführt.

30. Alternativ (und vorzugsweise) wird abgesetztes Haushaltsabwasser (Nummer 24) verwendet, das möglichst täglich frisch bezogen wird.

*Betrieb der Drehrohrreaktoren*

31. Zur Bewertung einer einzelnen Prüfsubstanz sind zwei identische Rohrreaktoren erforderlich, die in einem Raum mit konstanten Temperaturbedingungen von 22 ± 2 °C montiert werden.

32. Die Peristaltikpumpen werden so eingestellt, dass stündlich 250 ± 25 ml organisches Medium (ohne Prüfsubstanz) in die geneigten Rohre dosiert werden, die bei 18 ± 2 rpm rotieren. Die Pumpenrohre werden vor Beginn und regelmäßig während des Tests geschmiert (Nummer 25), um einen reibungslosen Prozessablauf und eine möglichst lange Lebensdauer der Rohrinstallation zu gewährleisten.

33. Der Neigungswinkel der Rohre zur Horizontalen wird so eingestellt, dass eine Verweilzeit des Zuflusses im sauberen Rohr von 125 ± 12,5 Sekunden gewährleistet ist. Die Verweilzeit wird durch Versetzung des Zuflusses mit einem nichtbiologischen Markierungsstoff (z. B. NaCl, inerter Farbstoff) geschätzt: Dabei gilt die Zeit, bis die Höchstkonzentration im Abfluss erreicht ist, als mittlere Verweilzeit (ist Biofilm in maximaler Menge vorhanden, kann sich die Verweilzeit auf bis zu 30 Minuten erhöhen).

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

▼M4

*Animpfung*

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

*Messungen*

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

*Probenahme und Analyse*

37. Methode, Schema und Häufigkeit der Probenahmen richten sich nach der Zweckbestimmung des Tests. Es werden beispielsweise Momentproben (*snap/grab samples*) des Zu- und Ablaufs gezogen, oder die Proben werden über einen längeren, z. B. drei- bis sechsstündigen, Zeitraum entnommen. In der ersten Phase (in der noch keine Prüfsubstanz zugegeben wurde) werden zweimal wöchentlich Proben gezogen. Diese werden entweder durch eine Membran gefiltert oder bei etwa 40 000 $m/sec^2$ für ungefähr 15 Minuten zentrifugiert (Nummer 18). Möglicherweise müssen die Proben vor der Membranfiltration sedimentiert und/oder grob gefiltert werden. Der DOC-Wert (bzw. der CSB-Wert) wird mindestens doppelt bestimmt, ebenso wie erforderlichenfalls der BSB-, Ammonium- und Nitrit-/Nitratwert.

38. Alle Analysen sollten nach dem Ziehen und Vorbereiten der Proben so bald wie möglich durchgeführt werden. Müssen Analysen zeitlich verschoben werden, sind die Proben in randvollen, fest verschlossenen Flaschen bei ungefähr 4 °C dunkel zu lagern. Müssen die Proben für länger als 48 Stunden gelagert werden, sollten sie durch Tiefgefrieren, Ansäuern oder Zugabe einer geeigneten toxischen Substanz (z. B. 20 ml/l einer 10 g/l-Lösung Quecksilber(II)-Chlorid) haltbar gemacht werden. Dabei ist sicherzustellen, dass die Konservierungsmethode die Analyseergebnisse nicht beeinträchtigt.

*Vorlaufphase (Running-in period)*

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

*Zugabe der Prüfsubstanz*

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

*Akklimatisierungsphase*

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

▼M4

*Bewuchsablösungen (Sloughing)*

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

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Auswertung der Ergebnisse**

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

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

Dabei sind:

$D_t$ = der Prozentsatz der Abnahme des DOC- bzw. des CSB-Wertes zum Zeitpunkt t

Cs = die DOC- bzw. CSB-Konzentration der Prüfsubstanz im Zulauf, vorzugsweise anhand der Stammlösung geschätzt (mg/l)

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

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

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

**Leistung des Kontrollreaktors**

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

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

Dabei ist:

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

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

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\ \%$$

Dabei sind:

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

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

▼M4

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

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

**Darstellung der Prüfergebnisse**

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

**Adsorption**

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

**Latenzphase (Lag-Phase)**

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

**Plateauphase**

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

**Mittlerer Eliminationsgrad der Prüfsubstanz**

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

▼M4

**Hinweis auf den biologischen Abbau**

51. Lagert sich die Prüfsubstanz nicht in nennenswertem Umfang an den Biofilm an und hat die Eliminationskurve die typische Form einer Bioabbaukurve mit Latenz-, Abbau- und Plateauphasen (Nummern 48, 49), so kann die gemessene Elimination mit Sicherheit dem biologischen Abbau zugeschrieben werden. War die Abnahme im Anfangsstadium hoch, kann der Simulationstest nicht zwischen biologischen und abiotischen Eliminationsprozessen differenzieren. In derartigen Fällen und in anderen Fällen, in denen Zweifel am biologischen Abbau bestehen (z. B. wenn die Prüfsubstanz ausgegast wird (*stripping*)), wird die Adsorption der Prüfsubstanz an Biofilmproben untersucht, oder anhand von Parametern, die biologische Prozesse genau angeben, werden zusätzliche statische Bioabbaubarkeitstests (Screeningtests) durchgeführt. Zu derartigen Tests zählen die Sauerstoffaufnahmemethoden (Kapitel C.4 (D, E und F) dieses Anhangs) (9) oder Kohlendioxid-Entwicklungstests (Kapitel C.4-C dieses Anhangs oder die ISO-*Headspace*-Methode (10), wobei als Inokulum zuvor exponierter Biofilm aus dem entsprechenden Reaktor verwendet wird.

52. Wurden sowohl die DOC-Abnahme als auch die Prüfsubstanzabnahme gemessen, deuten große Unterschiede (d. h. wenn erstere geringer ist als letztere) zwischen den Abnahmeprozentsätzen auf die Präsenz intermediärer organischer Produkte in den Abläufen hin, die möglicherweise schwerer abzubauen sind und untersucht werden sollten.

**Gültigkeit der Prüfergebnisse**

53. Der Test kann als gültig angesehen werden, wenn der Grad der DOC-Elimination (bzw. der CSB-Elimination) in den Kontrollanlagen nach zwei Wochen Betrieb > 80 % beträgt und nichts Ungewöhnliches festgestellt wurde.

54. Wurde eine leicht biologisch abbaubare (Referenz-)Substanz getestet, sollten der Abbaubarkeitsgrad > 90 % und die Differenz zwischen Duplikatwerten nicht mehr als 5 % betragen. Sind diese beiden Kriterien nicht erfüllt, sollten die Testverfahren überprüft werden, und/oder es sollte Haushaltsabwasser aus einer anderen Quelle bezogen werden.

55. Gleichermaßen sollten Differenzen zwischen Abbaubarkeitswerten aus eine Prüfsubstanz behandelnden Duplikatanlagen (sofern verwendet) nicht mehr als 5 % betragen. Wenn dieses Kriterium nicht erfüllt ist, die Abnahmewerte jedoch hoch sind, sollten die Analysen für weitere drei Wochen fortgesetzt werden. Sind die Abnahmewerte gering, müssen die Hemmwirkungen der Prüfsubstanz, soweit sie nicht bekannt sind, untersucht werden, und der Test muss mit einer niedrigeren Prüfsubstanzkonzentration wiederholt werden, sofern dies möglich ist.

**Prüfbericht**

56. Der Prüfbericht muss Folgendes umfassen:

*Prüfsubstanz:*

— Kenndaten;

— physikalischer Zustand und, soweit relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften.

*Prüfbedingungen:*

— etwaige Modifikationen des Prüfsystems, vor allem bei Prüfungen nicht löslicher und flüchtiger chemischer Substanzen;

— Art des organischen Mediums;

— Anteil (und Art) der Industrieabwässer im kommunalen Abwasser, soweit bekannt;

— Animpfungsmethode;

▼M4

— Prüfsubstanz-Stammlösung: DOC- und TOC-Gehalt; bei Suspension: Art der Zubereitung; verwendete Testkonzentration; falls außerhalb der Bandbreite von 10-20 mg/l DOC: Begründung; Zugabemethode; Datum der ersten Zugabe; etwaige Änderungen der Konzentration;

— mittlere hydraulische Verweilzeit (ohne Wachstum); Rotationsgeschwindigkeit des Rohres; ungefährer Neigungswinkel (wenn möglich);

— Angaben zur Bewuchsablösung (*Sloughing*); Dauer und Intensität;

— Testtemperatur und Temperaturspanne;

— angewandte Analysetechniken.

*Prüfergebnisse:*

— alle Messdaten (DOC, CSB, spezifische Analysen, pH-Wert, Temperatur, N-Chemikalien, soweit relevant);

— alle Berechnungswerte für $D_t$ (oder $D_{tc}$), $D_B$, $D_S$ in tabellarischer Form und als Eliminationskurven;

— Aussagen zu Latenz- und Plateau-Phasen, Prüfungsdauer, Eliminationsgrad der Prüfsubstanz, der Referenzsubstanz (falls getestet) und des organischen Mediums (in der Kontrollanlage) sowie statistische Informationen und Angaben zur Bioabbaubarkeit und zur Gültigkeit des Tests;

— Diskussion der Ergebnisse.

*LITERATUR:*

1. *Gerike* P, Fischer W, Holtmann W (1980). *Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test*. Wat. Res. 14: 753-758.

2. Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). *Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material*.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

3. Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

4. Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). *Rotary tubes as experimental trickling filters*. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

5. Kumke GW, Renn CE (1966). *LAS removal across an institutional trickling filter*. JAOCS 43: 92-94.

6. Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). *Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms*. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

7. Her Majesty's Stationery Office (1982). *Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability*, 1981, London.

8. Her Majesty's Stationery Office (1984). *Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes*, 1982, London.

9. Kapitel C.4 dieses Anhangs, Bestimmung der „leichten" biologischen Abbaubarkeit, A-F.

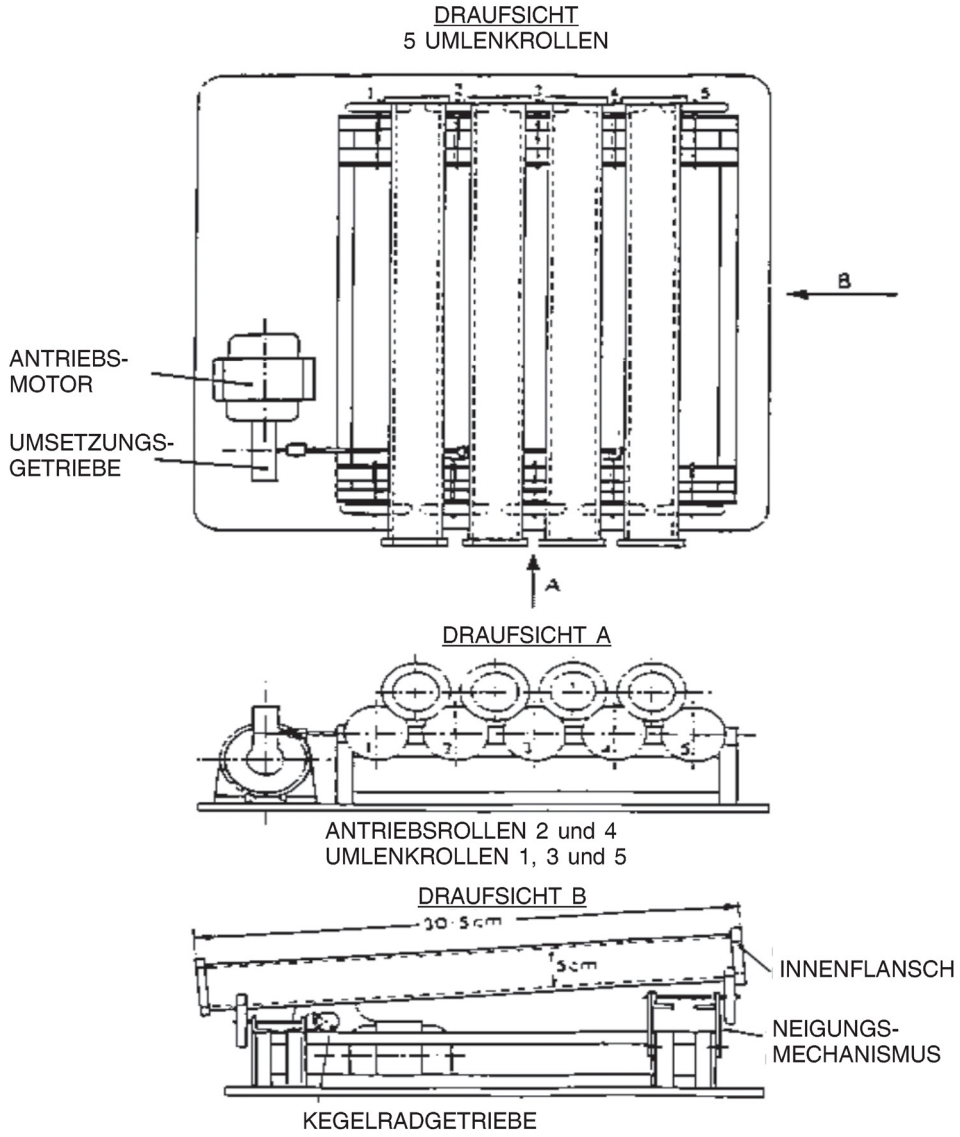
10. ISO 14593 (1998). Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen im wässrigen Medium — Verfahren mittels Bestimmung des anorganischen Kohlenstoffs in geschlossenen Flaschen.

▼**M4**

*Anlage 8*

*Abbildung 1*

**Drehrohre**




*Legende:*

Draufsicht:

Draufsicht A/B:

Antriebsrollen:

Umlenkrollen:

Antriebsmotor:

Umsetzungsgetriebe:

Innenflansch:

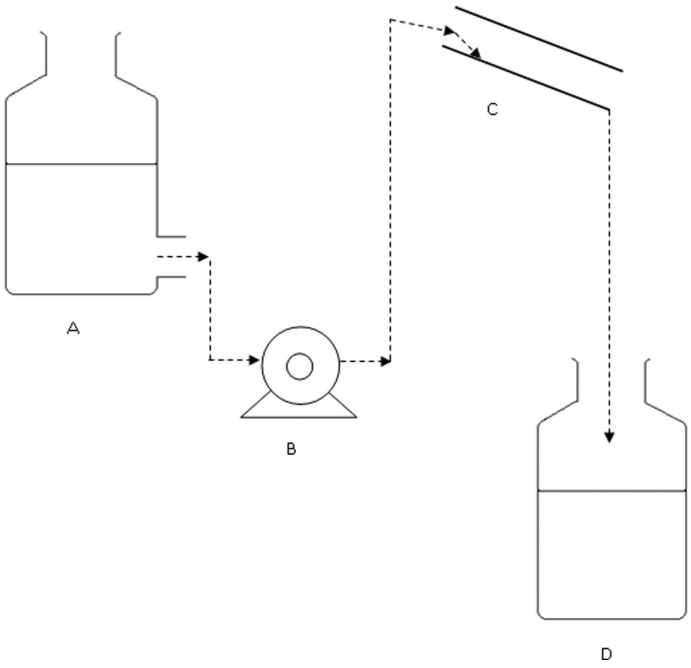
Neigungsmechanismus:

Kegelradgetriebe:

▼**M4**

*Abbildung 2*

**Fließdiagramm**




A: Zulaufgefäß

B: Peristaltikpumpe

C: Drehrohr

D: Ablaufsammelgefäß

*BEGRIFFSBESTIMMUNGEN:*

a *Prüfsubstanz:* jede nach dieser Prüfmethode getestete Substanz oder Mischung.

b *Chemische Substanzen:* „Es wird darauf hingewiesen, dass der Begriff ‚chemische Substanz' in den UNCED-Übereinkommen und Folgedokumenten im Allgemeinen Substanzen, Produkte, Gemische, Aufbereitungen oder jeden anderen Begriff einschließt, der in bestehenden Systemen möglicherweise zur Beschreibung des Prüfgegenstands verwendet wird."

▼B

C.11. **BIOLOGISCHE**

ABBAUBARKEIT BELEBTSCHLAMM: PRÜFUNG DER ATMUNGSHEMMUNG

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

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

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

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

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

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

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

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

Zur Durchführung der Prüfung sind folgende Informationen von Nutzen:

— Wasserlöslichkeit,

— Dampfdruck,

— Strukturformel,

— Reinheit der Prüfsubstanz.

*Empfehlung:*

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

1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

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

▼B

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

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{Hemmung in Prozent}$$

Hierbei sind:

$R_s$ = Sauerstoffzehrung bei der geprüften Konzentration der Prüfsubstanz,

$R_{C1}$ = Sauerstoffzehrung der Kontrolle 1,

$R_{C2}$ = Sauerstoffzehrung der Kontrolle 2.

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

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Es wird empfohlen, 3,5-Dichlorphenol, das als Hemmstoff bekannt ist, als Referenzsubstanz zu verwenden und bei jeder einzelnen Belebtschlammprobe hiermit die $EC_{10}$ zu prüfen, um eine anomale Empfindlichkeit des Schlammes festzustellen.

1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

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

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Die Prüfergebnisse sind gültig, sofern:

— die Sauerstoffzehrungen der beiden Kontrollen sich um höchstens 15 % voneinander unterscheiden;

— der $EC_{50}$-Wert (30 Minuten und/oder 3 Stunden) von 3,5-Dichlorphenol im zulässigen Bereich von 5 bis 30 mg/l liegt.

1.6. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.6.1. *Reagenzien*

1.6.1.1. Lösungen der Prüfsubstanz

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

▼B

1.6.1.2. Lösung der Kontrollsubstanz

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

1.6.1.3. Synthetisches Abwasser

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

— 16 g Pepton,

— 11g Fleischextrakt,

— 3 g Harnstoff,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$,

— 2,8 g $K_2HPO_4$.

*Anmerkung 1:* Dieses synthetische Abwasser hat die hundertfache Konzentration des im technischen Bericht der OECD vom 11. Juni 1976„Vorgeschlagenes Verfahren zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von Tensiden in synthetischen Detergenzien“ beschriebenen Abwassers und enthält außerdem Dikaliumhydrogenphosphat,

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

1.6.2. *Geräte*

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

Ergänzend zur normalen Laboratoriumsausrüstung sind insbesondere folgende Geräte erforderlich:

— Messanlage

— Belüftungseinrichtung

— pH-Elektrode

— $O_2$-Elektrode.

1.6.3. *Vorbereitung des Inokulums*

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

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

▼B

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

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

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

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

1.6.4. *Durchführung der Prüfung*

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

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

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

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

Zum Zeitpunkt „0“ werden 16 ml des synthetischen Abwassers mit Wasser auf 300 ml aufgefüllt. Dann werden 200 ml des Inokulums zugesetzt und die Gesamtmischung (500 ml) in das erste Gefäß gegeben (erste Kontrolle $C_1$).

▼B

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

Zum Zeitpunkt „15 Minuten“ (15 Minuten sind ein willkürliches, jedoch geeignetes Intervall) wird der oben beschriebene Vorgang wiederholt. Diesmal werden jedoch 100 ml der Prüfsubstanz-Stammlösung zu den 16 ml synthetischen Abwassers zugegeben und anschließend mir Wasser auf 300 ml aufgefüllt. Dann wird das Inokulum zugesetzt und das Volumen auf 500 ml aufgefüllt. Diese Mischung wird in das zweite Gefäß gegeben und wie oben beschrieben belüftet. Dieser Vorgang wird in Abständen von 15 Minuten mit unterschiedlichen Mengen der Prüfsubstanz-Stammlösung wiederholt, um eine Reihe von Gefäßen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfsubstanz zu erhalten. Schließlich wird eine zweite Kontrolle hergestellt ($C_2$).

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

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

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

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

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

2. **DATEN UND AUSWERTUNG**

Die Sauerstoffzehrung wird aus der Aufzeichnung des Messschreibers zwischen etwa 6,5 mg $O_2$/l und 2,5 mg $O_2$/l oder, bei niedriger Sauerstoffzehrung, über einen Zeitraum von 10 Minuten gemessen und als mg $O_2$/l· h berechnet.

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

Sofern die Sauerstoffzehrungen der beiden Kontrollen mehr als 15 % voneinander abweichen oder der $EC_{50}$-Wert (30 Minuten und/oder 3 Stunden) der Referenzsubstanz nicht im gültigen Bereich liegt (5 bis 30 mg/l für 3,5-Dichlorphenol), ist die Prüfung ungültig und muss wiederholt werden.

Der Prozentsatz der Hemmung wird für jede Prüfkonzentration wie oben beschrieben berechnet, auf normalem Logarithmenpapier (oder Wahrscheinlichkeitspapier) gegen die Konzentration aufgetragen und der $EC_{50}$-Wert hieraus ermittelt. 95 %-Vertrauensbereiche der $EC_{50}$-Werte werden nach Standardverfahren ermittelt.

▼B

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— Prüfsubstanz: chemische Kenndaten;

— Prüfsystem: Herkunft, Konzentration sowie sämtliche Vorbehandlungen des Belebtschlamms.

— Prüfbedingungen:

  — pH der Kulturlösung vor der Zehrungsmessung;

  — Temperatur bei der Prüfung;

  — Dauer der Prüfung;

  — Referenzsubstanz und ihr gemessener $EC_{50}$-Wert;

  — abiotische Sauerstoffzehrung (sofern diese auftritt).

— Ergebnisse

  — sämtliche gemessenen Werte;

  — Hemmkurve und Verfahren zur Berechnung des $EC_{50}$-Wertes;

  — $EC_{50}$-Wert und — falls möglich — $EC_{20}$- und $EC_{80}$-Werte mit 95 %-Vertrauensbereichen;

  — sämtliche Beobachtungen sowie Abweichungen von diesem Prüfverfahren, die möglicherweise das Ergebnis beeinflusst haben.

3.2. INTERPRETATION DER WERTE

Der $EC_{50}$-Wert sollte vornehmlich nur als Hinweis auf die mögliche Toxizität der Prüfsubstanz, entweder gegenüber dem Belebtschlamm bei der Abwasserbehandlung oder gegenüber Abwasser-Mikroorganismen, angesehen werden, da die in der Umwelt stattfindenden komplexen Wechselwirkungen bei einer Laboratoriumsprüfung nicht vollständig simuliert werden können. Weiterhin können nitrifikationshemmende Substanzen atypische Hemmkurven verursachen. Solche Kurven sollten deshalb mit Vorsicht interpretiert werden.

4. **LITERATUR**

(1) International Standard ISO 8192 — 1986

(2) Broecker, B. and Zahn, R., W*ater Research* 11, 1977, 165.

(3) Brown D., Hitz, H. R. and Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 245 (1981).

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries) R*ecommended Method No. 103,* also Described by

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, (1976), 80.

(6) Schefer, W., *Textilveredlung 6,* (1977), 247.

(7) OECDE, Paris, 1981, *Test Guideline* 209, Beschluss des Rates C(81)30 endg.

▼B

C.12 **BIOLOGISCHE**

ABBAUBARKEIT MODIFIZIERTER SCAS-TEST

1. **METHODE**

1.1. EINLEITUNG

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

Tritt eine physikalisch-chemische Adsorption der Prüfsubstanz an die suspendierten Feststoffe auf, muss dies bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden (siehe Randziffer 3.2).

Wegen der langen Verweilzeit der flüssigen Phase in der Belüftungseinheit (36 Stunden) und der zwischenzeitlichen Zugabe von Nährstoffen simuliert der Test nicht die in einer Kläranlage üblichen Bedingungen. Die für verschiedene Prüfsubstanzen vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass das biologische Abbaupotenzial des Tests hoch ist.

Die Testbedingungen sind für die Selektion und/oder Adaptation von Mikroorganismen, die die Prüfsubstanzen abzubauen vermögen, äußerst günstig, (Dieses Verfahren kann auch zur Herstellung akklimatisierten Impfguts für andere Prüfungen angewandt werden.)

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

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

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

— in Wasser löslich sind (mindestens 20 mg DOC/L);

— einen niederen Dampfdruck aufweisen;

— die Bakterien nicht hemmen;

— innerhalb des Prüfsystems nicht nennenswert adsorbieren;

— nicht durch Schäumen aus der Testlösung verloren gehen.

Der organische Kohlenstoffgehalt der Prüfsubstanz ist zu bestimmen.

▼B

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

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

1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

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

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

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

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

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

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

$D_{da}$ = Abbau/Tägliche Zugabe.

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

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

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

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

Die Indizes i und (i + 1) beziehen sich auf den Tag der Messung.

Gleichung [2a] wird empfohlen, wenn der DOC-Gehalt der entnommenen Kultursuspension täglichen Schwankungen unterworfen ist, während Gleichung [2b] benutzt werden kann, wenn der DOC-Gehalt von Tag zu Tag relativ konstant bleibt.

▼B

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

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

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

1.4. PRINZIP DER METHODE

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

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

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

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

1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

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

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

1.6. PRÜFVERFAHREN

1.6.1. *Vorbereitung*

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

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

▼B

Für jede Belüftungseinheit sind rund 150 ml Belebtschlamm erforderlich.

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

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

1.6.2. *Prüfbedingungen*

Der Test ist bei einer Temperatur von 20 bis 25 ºC durchzuführen.

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

1.6.3. *Durchführung der Prüfung*

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

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

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

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

▼B

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

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

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

## 2. DATEN UND AUSWERTUNG

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

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

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

— sämtliche Informationen über die Art des Abwassers, den Typ der benutzten Belüftungseinheit und die mit dem zu prüfenden Stoff, der Kontrolle sowie gegebenenfalls mit der Referenzsubstanz erhaltenen Versuchsergebnisse;

— Temperatur;

— Abbaukurve mit Beschreibung der Berechnungsweise (siehe 1.2);

— Datum und Ort der Entnahme des Belebtschlamms und des Abwassers;

— Stand der Adaptation, Konzentration usw.;

— wissenschaftliche Gründe für jedwede Änderung des Prüfverfahrens;

— Unterschrift und Datum.

▼B

3.2. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

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

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

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

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

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

Durch spezifische Analysemethoden oder den Einsatz $^{14}C$-markierter Prüfsubstanzen lässt sich eventuell eine höhere Empfindlichkeit erreichen. Wird $^{14}C$-markierte Prüfsubstanz verwendet, lässt sich durch Nachweis des entstehenden $^{14}CO_2$ bestätigen, dass ein biologischer Abbau stattgefunden hat.

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

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

4. **LITERATUR**

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

▼B

*Anlage 1*

**SCAS-Test: Beispiel der Ergebniseingabe**

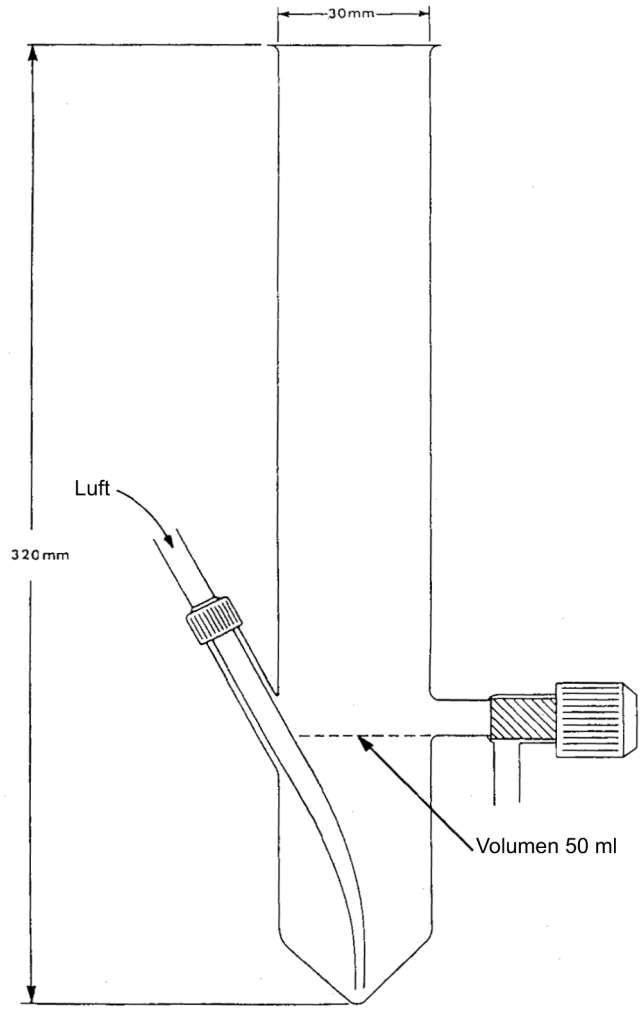
| Substanz | $C_T$ (mg/l) | $C_t - C_c$ (mg/l) | Prozent biologischer Abbau $D_{da}$ | Testdauer (Tage) |
|---|---|---|---|---|
| 4-Acetylaminobenzolsulfonat | 17,2 | 2,0 | 85 | 40 |
| Tetrapropylenbenzolsulfonat | 17,3 | 8,4 | 51,4 | 40 |
| 4-Nitrophenol | 16,9 | 0,8 | 95,3 | 40 |
| Diethylenglykol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

▼B

*Anlage 2*

**Beispiel der Testapparatur**

*Abbildung 1*



▼B

C.13. **BIOKONZENTRATION: DURCHFLUSS-FISCHTEST**

1. **METHODE**

Diese Biokonzentrationsmethode entspricht der OECD TG 305 (1996).

1.1. EINLEITUNG

Die Methode beschreibt ein Verfahren zur Charakterisierung des Potenzials verschiedener Substanzen zur Biokonzentration in Fischen unter Durchflussbedingungen. Obwohl Durchflusstests generell stark zu bevorzugen sind, sind — unter der Voraussetzung, dass die Validitätskriterien erfüllt werden — auch semistatische Methoden zulässig.

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

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

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

1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

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

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

▼B

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

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

*Biokonzentrationsfaktoren,* die direkt aus den kinetischen Geschwindigkeitskonstanten ($k_1/k_2$ berechnet werden, werden als kinetische Konzentrationsfaktoren $BCF_k$ bezeichnet.

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

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

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

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

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

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

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

▼B

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

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

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

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

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

1.4. ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

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

— a) Wasserlöslichkeit

— b) Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $P_{ow}$ (auch als $K_{ow}$ bezeichnet, ermittelt durch ein HPLC-Verfahren in A.8)

— c) Hydrolyse

— d) Phototransformation in Wasser, bestimmt unter direkter oder simulierter Sonneneinstrahlung sowie unter den Bestrahlungsbedingungen des Biokonzentrationstests (3)

▼B

— e) Oberflächenspannung (d. h. für Substanzen, bei denen der log $P_{ow}$ nicht ermittelt werden kann)

— f) Dampfdruck

— g) leichte biologische Abbaubarkeit (gegebenenfalls).

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

1.5. VALIDITÄT DES TESTS

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

— Die Temperaturschwankung beträgt weniger als ± 2 °C;

— die Konzentration an gelöstem Sauerstoff liegt nicht unter einer Sättigung von 60 %;

— die Konzentration der Prüfsubstanz in den Kammern liegt zwischen ± 20 % der während der Aufnahmephase gemessenen Durchschnittswerte;

— Mortalität oder andere schädigende Wirkungen/Krankheiten bei den Kontroll- und Versuchsfischen betragen am Ende des Tests weniger als 10 %; wenn sich der Test über mehrere Wochen oder Monate erstreckt, sollten Mortalität oder andere schädigende Wirkungen bei beiden Fischgruppen weniger als 5 % pro Monat betragen und 30 % insgesamt nicht überschreiten.

1.6. REFERENZVERBINDUNGEN

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

1.7. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.7.1. *Apparatur*

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

▼B

1.7.2. *Wasser*

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

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

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

1.7.3. *Testlösungen*

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

▼B

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

1.7.4. *Auswahl der Spezies*

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

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

1.7.5. *Haltung der Fische*

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

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

— Mortalität größer als 10 % der Population in sieben Tagen: Austausch des gesamten Besatzes;

— Mortalität zwischen 5 und 10 % der Population in sieben Tagen: weitere sieben Tage Akklimatisation;

— Mortalität weniger als 5 % der Population in sieben Tagen: Annahme des gesamten Besatzes — wenn die Mortalität innerhalb der folgenden sieben Tage bei mehr als 5 % liegt: Austausch des gesamten Besatzes.

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

▼B

1.8. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

1.8.1. *Vorversuch*

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

1.8.2. *Expositionsbedingungen*

1.8.2.1. Dauer der Aufnahmephase

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

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

1.8.2.2. Dauer der Ausscheidungsphase

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

1.8.2.3. Anzahl der Versuchsfische

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

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

▼B

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

1.8.2.4. Besatz

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

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

1.8.2.5. Fütterung

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

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

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

▼B

1.8.2.6. Licht und Temperatur

Die Photoperiode beträgt in der Regel 12 bis 16 Stunden, und die Temperatur (± 2 °C) sollte den Testspezies (siehe Anlage 2) angepasst sein. Art und Eigenschaften der Beleuchtung sollten bekannt sein. Eine mögliche Phototransformation der Prüfsubstanz unter den Bestrahlungsbedingungen der Untersuchung sollte berücksichtigt werden. Die Beleuchtung sollte so gewählt werden, dass eine Exposition der Fische gegenüber unnatürlichen Photoprodukten vermieden wird. In einigen Fällen mag die Verwendung eines Filters angebracht sein, um UV-Strahlungen unter 290 mm herauszufiltern.

1.8.2.7. Testkonzentrationen

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

Die höchste Testkonzentration kann auch ermittelt werden, indem der akute 96h-$LC_{50}$-Wert durch ein geeignetes Akut-chronisch-Verhältnis dividiert wird (bei einigen Chemikalien kann der Quotient zwischen 3 und 100 liegen). Wenn möglich, wählen Sie die andere(n) Konzentration(en) so, dass sie sich von der vorherigen um den Faktor zehn unterscheidet. Sollte das aufgrund des Kriteriums eines $LC_{50}$-Wertes von 1 % und der analytischen Grenze nicht möglich sein, sollte ein niedrigerer Faktor als zehn gewählt bzw. die Verwendung einer $^{14}C$-markierten Prüfsubstanz erwogen werden. Keine Konzentration sollte oberhalb der Löslichkeit der Prüfsubstanz liegen.

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

1.8.2.8. Kontrollen

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

1.8.3. *Häufigkeit der Wasserqualitätsmessungen*

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

▼B

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

1.8.4.1. Fisch- und Wasserprobenahmeplan

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

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

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

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

1.8.4.2 Probenahme und Probenvorbereitung

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

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

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

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

▼B

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

1.8.4.3. Qualität der Analysemethode

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

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

1.8.4.4. Analyse der Fischproben

Werden für den Test radioaktiv markierte Stoffe verwendet, können die Proben entweder auf ihre gesamte radioaktive Markierung analysiert (d. h. Ausgangsverbindung und Metaboliten) oder aber gereinigt werden, so dass die Ausgangsverbindung separat untersucht werden kann. Ebenso können die Hauptmetaboliten im Fließgleichgewicht oder gegen Ende der Aufnahmephase bestimmt werden, je nachdem, was eher eintritt. Wenn der BCF im Verhältnis zu den gesamten radioaktiv markierten Rückständen ≥ 1 000 % beträgt, ist es u. U. ratsam — und bei gewissen Chemikalien wie Pestiziden unbedingt empfehlenswert — die Abbauprodukte zu identifizieren und zu quantifizieren, die ≥ 10 % des Gesamtrückstands in Fischgeweben im Fließgleichgewicht ausmachen. Wenn die Abbauprodukte, die ≥ 10 % des gesamten radioaktiv markierten Rückstands in den Fischgeweben ausmachen, identifiziert und quantifiziert werden, dann sollten auch die Abbauprodukte im Testwasser identifiziert und quantifiziert werden.

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

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

▼B

2. **DATEN**

2.1. BEHANDLUNG DER ERGEBNISSE

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

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

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

Ebenso wird der Konzentrationsfaktor ($BCF_k$) als Quotient $k_1/k_2$ (der beiden kinetischen Konstanten erster Ordnung) ermittelt. Die Ausscheidungskonstante ($k_2$) wird in der Regel aus der Ausscheidungskurve abgeleitet (d. h. einer grafischen Darstellung der Abnahme der Prüfsubstanzkonzentration in den Fischen mit der Zeit). Die Aufnahmekonstante ($k_1$) wird dann anhand des gegebenen Wertes $k_2$ und einem $C_1$-Wert berechnet, der sich aus der Aufnahmekurve ableitet (siehe auch Anlage 5). Die bevorzugte Methode zur Berechnung des $BCF_k$ und der Geschwindigkeitskonstanten $k_1$ und $k_2$ ist eine computergestützte nichtlineare Parameterschätzung (11). Ansonsten können grafische Methoden zur Berechnung von $k_1$ und $k_2$ verwendet werden. Wenn die Ausscheidungskurve offensichtlich nicht erster Ordnung ist, sollten komplexere Modelle herangezogen werden (siehe Literaturhinweise zu Anlage 3) und der Rat eines Biostatistikers eingeholt werden.

2.2. ERGEBNISBEWERTUNG

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

Klar abgegrenzte Aufnahme- und Ausscheidungskurven weisen auf eine gute Qualität der Biokonzentrationsdaten hin. Die Schwankungen der Aufnahme-/Ausscheidungskonstanten sollten bei den beiden Testkonzentrationen weniger als 20 % betragen. Werden erhebliche Unterschiede bei den Aufnahme-Ausscheidungsgeschwindigkeiten zwischen den beiden eingesetzten Testkonzentrationen beobachtet, sollten diese dokumentiert und mögliche Erklärungen gesucht werden. Bei einem guten Versuchsaufbau nähert sich die Konfidenzgrenze der BCF im Allgemeinen ± 20 %.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

Der Testbericht muss folgende Angaben enthalten:

3.1. PRÜFSUBSTANZ

— physikalischer Zustand und gegebenenfalls physikalisch-chemische Eigenschaften

— chemische Identifizierungsdaten (einschließlich des organischen Kohlenstoffgehalts, falls angemessen)

— bei radioaktiv markierten Substanzen, die genaue Position des markierten Atoms (der Atome) und der prozentuale Anteil der auf Verunreinigungen zurückzuführenden Radioaktivität.

▼B

3.2. TESTSPEZIES

— wissenschaftlicher Name, Stamm, Herkunft, eventuelle Vorbehandlungen, Akklimatisation, Alter, Größenbereich usw.

3.3. PRÜFBEDINGUNGEN

— verwendetes Prüfverfahren (z. B. Durchflussverfahren, semistatisches Verfahren)

— Art und Eigenschatten der verwendeten Beleuchtung und Photoperiode(n)

— Versuchsaufbau (z. B. Zahl und Größe der Testkammern, Wasservolumen-Austauschrate, Zahl der Versuchswiederholungen, Zahl der Fische pro Versuchswiederholung, Zahl der Testkonzentrationen, Dauer der Aufnahme- und Ausscheidungsphase, Häufigkeit der Entnahme von Fisch- und Wasserproben)

— Vorbereitung der Stammlösungen und Erneuerungshäufigkeit (falls verwendet, müssen Angaben zum Lösungsvermittler, seiner Konzentration und seinem Beitrag zum organischen Kohlenstoffgehalt des Testwassers gemacht werden)

— die nominellen Testkonzentrationen, der Durchschnitt der gemessenen Werte sowie deren Standardabweichungen in den Testbehältnissen sowie das Verfahren, durch das diese ermittelt wurden

— Quelle des Verdünnungswassers, Beschreibung aller Vorbehandlungen, Ergebnisse aller Nachweise, dass die Versuchsfische in dem Wasser überleben können, sowie Wassereigenschaften: pH-Wert, Härte, Temperatur, Konzentration des gelösten Sauerstoffs, Restchlor (falls gemessen), TOC, suspendierte Feststoffe, Salinität des Testmediums (gegebenenfalls) sowie die Ergebnisse aller anderen durchgeführten Messungen

— Wasserqualität innerhalb der Testbehältnisse, pH-Wert, Härte, TOC, Temperatur und Konzentration des gelösten Sauerstoffs

— ausführliche Angaben zur Fütterung (z. B. Art des Futters, Herkunft, Zusammensetzung — zumindest der Lipid- und Proteingehalt — Fütterungsmenge und Häufigkeit)

— Angaben zur Behandlung der Fisch- und Wasserproben, einschließlich aller Einzelheiten über Vorbereitung, Lagerung, Extraktion und Analyseverfahren (und -genauigkeit) in bezug auf die Prüfsubstanz und den Lipidgehalt (falls gemessen).

3.4 ERGEBNISSE

— Ergebnisse aller durchgeführten Voruntersuchungen

— Mortalität der Kontrollfische und der Fische in den einzelnen Expositionskammern sowie jegliches beobachtetes anormales Verhalten

— der Lipidgehalt der Fische (falls in der Prüfung ermittelt)

— Kurven (einschließlich aller gemessenen Daten) der Aufnahme und der Ausscheidung der Prüfchemikalie durch die Fische, die Zeit bis zur Einstellung des Fließgleichgewichts

▼B

— $C_f$ und $C_w$ (gegebenenfalls mit Standardabweichung und Abweichungsbereich) für alle Probenahmen (wobei $C_f$ in µg/g Nassgewicht (ppm) des Ganzkörpers oder bestimmter Gewebeteile, z. B. Lipid und $C_w$ in µg/ml (ppm), ausgedrückt wird). Auch die $C_w$-Werte für die Kontrollreihe (Background) sollten dokumentiert werden

— der steady-state Biokonzentrationsfaktor ($BCF_{SS}$) und/oder der kinetische Konzentrationsfaktor ($BCF_k$) sowie gegebenenfalls die 95 %-Konfidenzgrenzen für die Aufnahme- und Ausscheidungskonstanten (alle ausgedrückt im Verhältnis zum Ganzkörper und zum Gesamtlipidgehalt (falls gemessen) des Tieres oder bestimmter Gewebeteile), die Konfidenzgrenzen und die Standardabweichung (sowie verfügbar) sowie Berechnungs-/Datenanalyseverfahren für jede Konzentration der verwendeten Prüfsubstanz

— wenn radioaktiv markierte Substanzen verwendet werden bzw. wenn es erforderlich ist, muss die Akkumulation aller nachgewiesenen Metaboliten angegeben werden

— alle Besonderheiten im Zusammenhang mit dem Test, alle Abweichungen von den genannten Verfahren sowie alle weiteren relevanten Informationen.

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

## 4. LITERATURHINWEISE

(1) Connell D.W. (1988). Biouccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, 117-156.

(2) Bintein S., Devillers J. and Karelier W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR und QSAR in Environmental Research, 1, 29-390.

(3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of Chemicals in Water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. Nr. 3.

(4) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

(6) US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5. A (1) Analysis of Human Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) in „The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic invironment: degradation, toxicity, bioaccumulation“ Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, the Hague, The Netherlands.

▼B

(9) Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, 1099-1105.

(10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, 1431-1436.

(11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

*Anlage 1*

**Chemische Eigenschaften eines geeigneten Verdünnungswassers**

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

▼B

*Anlage 2*

**Für den Test empfohlene Fischspezies**

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

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

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

| | |
|---|---|
| Umberfisch | Leiostomus xanthurus |
| Edelsteinkärpfling | Cyprinodon variegatus |
| Gezeiten-Ährenfisch | Menidia beryllina |
| Juwelflussbarsch | Cymatogaster aggregata |
| Englische Seezunge | Parophrys vetulus |
| Geweihgroppe | Leptocottus armatus |
| Dreistachliger Stichling | Gasterosteus aculeatus |
| Sägebarsch | Dicentracus labrax |
| Ukelei | Alburnus alburnus |

**Zusammenstellung**

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

▼B

*Anlage 3*

**Vorhersage der Dauer der Aufnahme- und der Abbauphase**

1. *Vorhersage der Dauer der Aufnahmephase*

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

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

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

Für weitere Beziehungen siehe Literaturhinweise (2).

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

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

wobei

s = Löslichkeit (Mol/l) : (n = 36)

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

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

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

oder, wenn $C_w$ konstant ist:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \, (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{(Gleichung 3)}$$

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

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ oder } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

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

Gleichung 3 kann umgeformt werden in:

$$C_f = C_{f,s} \, (1 - e^{-k_2 t}) \text{ oder } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{(Gleichung 4)}$$

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

▼B

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

Die Zeit zur Herstellung eines 50 %igen Fließgleichgewichts entspricht (Gleichung 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ oder } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{(Gleichung 5)}$$

Dementsprechend gilt für ein 95 %iges Fließgleichgewicht:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{(Gleichung 6)}$$

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

$\log_{10}k_2 = - 0,414 . (4) + 1,47 \qquad k_2 = 0,652 \text{ Tage}^{-1}$

ap (80 %) = 1,6/0,652, d. h. 2,45 Tage (59 Stunden)

oder ap (95 %) = 3.0/0,652, d. h. 4,60 Tage (110 Stunden).

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

$\log_{10} (P_{ow}) = - 0,862 . (– 5,0) + 0,710 = 5,02$

$\log_{10}k, = - 0,414 . (5,02) + 1,47$

$k_2 = 0,246 \text{ Tage}^{–1}$

ap (80 %) = 1,6/0,246, d. h. 6,5 Tage (156 Stunden)

oder ap (95 %) = 3,0/0,246, d. h. 12,2 Tage (293 Stunden)

Alternativ kann der Ausdruck:

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

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

2. *Vorhersage der Dauer der Ausscheidungsphase*

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

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

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

▼B

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

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

Dementsprechend wird eine 95 %ige Ausscheidung erreicht bei:

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

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

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

**Literaturhinweise** (zu Anlage 3)

(1) Spacie A. and Hamelink J.L. (15S2) Alternative modeis for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, 309-320.

(2) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water Systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), 4-10.

(4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), 701-707.

(5) Branson D.R.. Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), 785-792.

(6) Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic Organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4, 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

(7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, 614-622.

(8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in Fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, 3-19.

▼B

*Anlage 4*

**Theoretisches Beispiel für einen Probenahmeplan für Biokonzentrationstests bei Substanzen mit log $P_{ow}$ = 4**

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

(*) Probewasser nachdem mindestens 3 „Kammer-Inhalte“ geliefert wurden.

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

*Anm.*: Der in Vortests ermittelte Schätzwert von $k_2$ für einen log $P_{ow}$ gleich 4,0 beträgt 0,652 $Tage^{-1}$. Die Gesamtdauer des Versuchs wird auf 3 × ap = 3 × 4,6 Tage, d. h. 14 Tage festgelegt. Zur Schätzung von „ap“ siehe Anlage 3.

▼B

*Anlage 5*

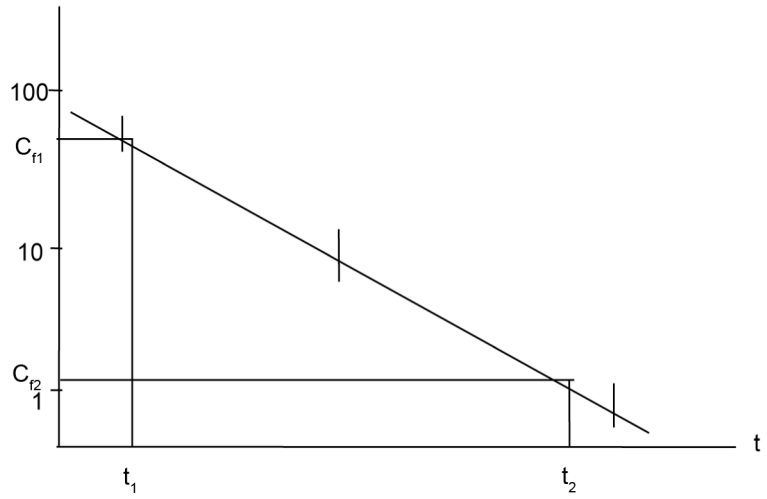
**Modelldiskriminierung**

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

**Grafische Methode zur Bestimmung der Ausscheidungskonstanten $k_2$**

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

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




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

**Grafische Methode zur Bestimmung der Aufnahmekonstanten $k_1$**

Bei gegebenem $K_2$ wird $k_1$ wie folgt berechnet:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{(Gleichung 1)}$$

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

▼B

**Computergestütztes Verfahren zur Berechnung der Aufnahme- und Ausscheidungskonstanten**

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

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{(Gleichung 2)}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > t_c \qquad \text{(Gleichung 3)}$$

wobei $t_c$ die Zeit am Ende der Aufnahmephase bezeichnet.

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

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

▼B

C.14. **WACHSTUMSTEST AN JUNGFISCHEN**

1. **METHODE**

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

1.1. EINLEITUNG

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

Siehe auch Allgemeine Einführung Teil C.

1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

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

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

$\mathbf{EC_X}$: Bei dieser Testmethode ist dies die Konzentration der Prüfsubstanz, die verglichen mit den Kontrollen eine Veränderung von x % in der Wachstumsrate der Fische hervorruft.

**Besatzrate:** Feuchtgewicht der Fische pro Volumen Wasser.

**Besatzdichte:** Zahl der Fische je Volumenteil Wasser.

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

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

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

▼B

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

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

1.4. ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

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

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

1.5. VALID1TÄT DES TESTS

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

— Am Ende der Prüfung darf die Mortalität bei der (den) Kontrollgruppe(n) 10 % nicht überschreiten.

— Das mittlere Gewicht der Fische in der (den) Kontrollgruppe(n) muss in einem solchen Maß zugenommen haben, dass die für signifikant erachtete Mindestveränderung der Wachstumsrate nachgewiesen werden kann. Ein Ringtest (2) hat ergeben, dass bei Regenbogenforellen das mittlere Gewicht der Fische in den Kontrollgruppen im Laufe von 28 Tagen um mindestens die Hälfte (d. h. 50 %) des mittleren Ausgangsgewichts zugenommen haben muss. Beispiel: 1 g/Fisch (= 100 %), Abschlussgewicht nach 28 Tagen: > 1,5 g/Fisch (> 150 %).

— Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff muss für die gesamte Dauer des Tests mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswerts betragen.

— Für die Dauer des Tests dürfen sich die Wassertemperaturen im Vergleich zwischen den Testkammern zu keiner Zeit um mehr als ± 1 °C unterscheiden und innerhalb des für die Testspezies festgelegten Temperaturbereichs um höchstens 2 °C schwanken (Anlage 1).

1.6. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.6.1. **Apparatur**

Normale Laborgeräte, darunter insbesondere folgende:

— a) Sauerstoff- und pH-Messgerät;

▼B

— b) Geräte zur Bestimmung von Wasserhärte und -alkalität;

— c) geeignete Geräte zur Temperaturregelung und vorzugsweise zur fortlaufenden Überwachung;

— d) Behältnisse aus chemisch inertem Material und mit einem dem empfohlenen Besatz und der Besatzdichte entsprechenden Fassungsvermögen (siehe Abschnitt 1.8.5 und Anlage 1);

— e) Waage mit ausreichender Genauigkeit (d. h. auf ± 0,5 % genau).

1.6.2. **Wasser**

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

1.6.3. **Testlösungen**

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

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

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

▼B

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

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

1.6.4. **Auswahl der Spezies**

Empfohlen wird für diesen Test die Regenbogenforelle *(Oncorhynchus mykiss),* da beim Ringtest mit dieser Spezies die meisten Erfahrungen gesammelt wurden (1) (3). Es kommen auch andere gut dokumentierte Spezies in Frage, wobei jedoch das Testverfahren möglicherweise abgewandelt werden muss, um geeignete Testbedingungen zu schaffen. Beispielsweise liegen auch Erfahrungen mit dem Zebrabärbling *(Danio rerio*) (4)(5) und dem Reiskärpfling (Medaka, *Oryzias latipes*) (6) (7) (8) vor. Die Gründe für die Auswahl der Spezies und der Versuchsmethode sind in diesem Fall genau zu dokumentieren.

1.6.5. **Haltung der Fische**

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

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

— Mortalität größer als 10 % der Population in sieben Tagen: Austausch aller Fische;

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

— Mortalität weniger als 5 % der Population in sieben Tagen: Verwendung aller Fische für den Test.

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

▼B

1.7. VERSUCHSAUFBAU

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

— a) Ziel der Studie;

— b) vorgesehene Methode der statistischen Analyse;

— c) Verfügbarkeit und Kosten der experimentellen Ressourcen.

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

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

Aus Gründen, die von Stephan und Rogers (9) erörtert werden, ist in den meisten Fällen die Regressionsanalyse der Varianzanalyse vorzuziehen. Falls jedoch kein geeignetes Regressionsmodell zur Verfügung steht ($r^2 < 0{,}9$), ist die NOEC/LOEC zu verwenden.

1.7.1. **Versuchsaufbau für die Regressionsanalyse**

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

— a) Die im Test verwendeten Konzentrationen müssen in jedem Falle die Wirkungskonzentration (z. B. $EC_{10,20,30}$) und den Konzentrationsbereich, in dem die Wirkung der Prüfsubstanz von Interesse ist, einschließen. Bei der Bestimmung von Wirkungskonzentrationen wird die größte Genauigkeit dann erzielt, wenn die Wirkungskonzentration in der Mitte des Bereichs der getesteten Konzentrationen liegt. Ein Vorversuch kann die Auswahl geeigneter Testkonzentrationen erleichtern.

— b) Im Interesse einer zufrieden stellenden statistischen Modellierung sind bei dem Test mindestens ein Kontrollansatz und fünf weitere Gefäße mit unterschiedlichen Konzentrationen zu verwenden. Gegebenenfalls ist bei Verwendung eines Lösungsvermittlers zusätzlich zur Testreihe ein Kontrollansatz mitzuführen, der den Lösungsvermittler in der höchsten eingesetzten Konzentration enthält (siehe 1.8.3 und 1.8.4).

— c) Es kann eine geeignete geometrische Reihe oder logarithmische Reihe (10) (siehe Anlage 3) verwendet werden. Ein logarithmischer Abstand zwischen den Testkonzentrationen ist zu bevorzugen.

▼B

— d) Stehen mehr als sechs Prüfgefäße zur Verfügung, so sind die überzähligen Gefäße entweder für Paralleltests zu verwenden oder so über den Konzentrationsbereich zu verteilen, dass sich der Abstand zwischen den Konzentrationen verringert. Beide Maßnahmen sind gleichermaßen zu empfehlen.

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

Vorzugsweise sollten bei allen Konzentrationen Parallelansätze vorhanden sein, und die statistische Analyse sollte für die einzelnen Prüfgefäße vorgenommen werden (11). Ohne Parallelansätze ist es nicht möglich, die Variabilität zwischen den Prüfgefäßen über das auf die einzelnen Fische zurückzuführende Maß hinaus zu berücksichtigen. Bei einer Untersuchung (12) wurde jedoch die Erfahrung gemacht, dass die Variabilität zwischen den Gefäßen im Vergleich zur Variabilität innerhalb der Prüfgefäße (d. h. zwischen den Fischen) sehr gering war. Daher besteht eine durchaus vertretbare Alternative darin, eine statistische Analyse für die einzelnen Fische vorzunehmen.

In der Regel werden mindestens fünf Testkonzentrationen in einer geometrischen Reihe verwendet, wobei der Faktor vorzugsweise nicht größer als 3,2 ist.

Wird der Test mit Parallelansätzen durchgeführt, so gilt im Allgemeinen, dass die Zahl der zur Kontrolle verwendeten Parallelgefäße und damit die Zahl der Fische jeweils doppelt so groß sein soll wie bei den einzelnen Testkonzentrationen, bei denen die Zahl wiederum jeweils gleich sein soll (13) (14) (15). Werden dagegen keine Parallelgefäße verwendet, so soll die Zahl der Fische in der jeweiligen Kontrollgruppe mit der Zahl der Fische in der jeweiligen Testkonzentration übereinstimmen.

Wenn die Varianzanalyse für die Prüfgefäße und nicht auf die einzelnen Fische bezogen durchgeführt werden soll (wobei Letzteres entweder eine Markierung der einzelnen Fische oder die Verwendung „pseudo“-spezifischer Wachstumsraten voraussetzen würde (siehe 2.1.2)), müssen so viele Prüfgefäße für Paralleltests vorhanden sein, dass die Standardabweichung der „Gefäße innerhalb der einzelnen Konzentrationen“ bestimmt werden kann. Dies bedeutet, dass die Freiheitsgrade für Fehler in der Varianzanalyse mindestens 5 (11) betragen sollten. Bei alleiniger Replikation der Kontrollen besteht die Gefahr einer Beeinflussung der Fehlervariabilität, da sie zusammen mit dem mittleren Wert der fraglichen Wachstumsrate ansteigen kann. Da die Wachstumsrate aller Wahrscheinlichkeit nach mit steigender Konzentration abnimmt, hat dies zur Folge, dass die Variabilität zu hoch eingeschätzt wird.

1.8. VERFAHREN

1.8.1. **Auswahl und Wiegen der Versuchsfische**

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

▼B

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

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

1.8.2. **Expositionsbedingungen**

1.8.2.1. *Dauer*

Die Testdauer beträgt 28 Tage.

1.8.2.2. *Besatzrate und Besatzdichte*

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

1.8.2.3. *Fütterung*

Die Fische sind mit geeignetem Futter (Anlage 1) in einer Menge zu füttern, die eine annehmbare Wachstumsrate ermöglicht. Das Wachstum von Mikroorganismen sowie Wassertrübungen sind sorgfältig zu vermeiden. Bei Regenbogenforellen dürfte dies mit einer täglichen Futterration von 4 % des Körpergewichts zu erreichen sein (3) (16) (17) (18). Die Tagesration kann in zwei gleiche Teile aufgeteilt und den Fischen in zwei Fütterungen pro Tag im Abstand von mindestens fünf Stunden verabreicht werden. Die Ration richtet sich nach dem jeweiligen Gesamt-Ausgangsgewicht der Fische in den einzelnen Testbehältnissen. Werden die Fische am 14. Tag erneut gewogen, so erfolgt die Neuberechnung der Ration zu diesem Zeitpunkt. Die Fütterung ist 24 Stunden vor dem Wiegen auszusetzen.

▼B

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

1.8.2.4. *Licht und Temperatur*

Fotoperiode und Wassertemperatur sind der Testspezies anzupassen (Anlage 1).

1.8.3. **Testkonzentrationen**

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

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

1.8.4. **Kontrollen**

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

1.8.5. **Häufigkeit der analytischen Bestimmungen und Messungen**

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

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

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

▼B

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

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

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

1.8.6. **Anmerkungen**

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

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

2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

2.1. BEHANDLUNG DER ERGEBNISSE

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

▼B

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

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

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

wobei

$r_1$ = individuelle spezifische Wachstumsrate des Fisches

$r_2$ = durchschnittliche spezifische Wachstumsrate je Gefäß

$r_3$ = „pseudo“-spezifische Wachstumsrate

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

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

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

$\log_e W_1$ = Durchschnitt der Logarithmen der Werte $w_1$ für die Fische im Gefäß am Anfang des Untersuchungszeitraums

$\log_e W_2$ = Durchschnitt der Logarithmen der Werte $w_2$ für die Fische im Gefäß am Ende des Untersuchungszeitraums

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

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

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

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

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

▼B

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

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

Die Methode der Modellanpassung muss beispielsweise eine Schätzung der $EC_{20}$ und ihrer Streuung (entweder Standardfehler oder Vertrauensintervall) ermöglichen. Die Abbildung des angepassten Modells ist im Verhältnis zu den Daten zu zeigen, um die Eignung der Anpassung zu verdeutlichen (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Analyse der Ergebnisse zur Bestimmung der LOEC**

Waren bei dem Test auf allen Konzentrationsstufen Parallelgefäße vorhanden, so kann die LOEC mittels Varianzanalyse der durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate je Gefäß bestimmt werden (siehe 2.1), wonach der Durchschnitt r bei jeder Konzentration anhand einer geeigneten Methode (z. B. Dunnett-Test oder Williams-Test (13) (14) (15) (22)) mit dem Durchschnitt r der Kontrollgruppen verglichen wird, um die geringste Konzentration zu ermitteln, bei der der Unterschied mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,05 signifikant ist. Sind die Voraussetzungen für eine parametrische Methode nicht gegeben (durch Nichtnormalverteilung (z. B. Shapiro-Wilk-Test) oder heterogene Varianzen (Bartlett-Test)), so sollte vor der Varianzanalyse zwecks Homogenisierung der Varianzen eine Transformation der Daten erfolgen oder aber eine gewichtete Varianzanalyse durchgeführt werden.

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

Der Durchschnitt $r_3$ für die einzelnen Testkonzentrationen kann dann mit dem Durchschnitt $r_3$ für die Kontrollgruppen verglichen werden. Anschließend wird die LOEC wie oben ermittelt. Zu beachten ist, dass es bei dieser Methode nicht möglich ist, die Variabilität zwischen den Prüfgefäßen über das auf die einzelnen Fische zurückzuführende Maß hinaus zu berücksichtigen oder sich in dieser Hinsicht abzusichern. Es wurde jedoch die Erfahrung gemacht (9), dass die Variabilität zwischen den Gefäßen im Vergleich zur Variabilität innerhalb der Gefäße (d. h. zwischen den Fischen) sehr gering war. Werden keine einzelnen Fische in die Analyse einbezogen, so ist die verwendete Methode zur Ermittlung von Ausreißern anzugeben und zu begründen.

2.2. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

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

2.3. TESTBERICHT

Der Testbericht muss folgende Angaben enthalten:

▼B

2.3.1. **Prüfsubstanz:**

— physikalischer Zustand und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Kenndaten einschließlich Reinheitsgrad und gegebenenfalls Analyseverfahren zur Quantifizierung der Prüfsubstanz.

2.3.2. **Testspezies:**

— wissenschaftliche Bezeichnung (nach Möglichkeit):

— Stamm, Größe, Herkunft, eventuelle Vorbehandlungen usw.

2.3.3. **Prüfbedingungen:**

— verwendetes Prüfverfahren (z. B. semistatisch/Erneuerung. Durchflussverfahren, Besatz. Besatzdichte usw.);

— Versuchsaufbau (z. B. Zahl der Testgefäße, der Testkonzentrationen und der Parallelansätze, Zahl der Fische pro Gefäß);

— Methode der Zubereitung der Stammlösungen und Erneuerungshäufigkeit (falls verwendet, müssen Angaben zum Lösungsvermittler und seiner Konzentration gemacht werden);

— die nominellen Testkonzentrationen, der Durchschnitt der gemessenen Werte und deren Standardabweichungen in den Testgefäßen sowie das Verfahren, durch das diese ermittelt wurden; Nachweise dafür, dass sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfsubstanz in echter Lösung beziehen;

— Eigenschaften des Verdünnungswassers: pH-Wert, Härte, Alkalität, Temperatur, Konzentration des gelösten Sauerstoffs, Restchlor (falls gemessen), gesamter organischer Kohlenstoff, suspendierte Feststoffe, Salinität des Testmediums (falls gemessen) sowie alle sonstigen durchgeführten Messungen;

— Wasserqualität innerhalb der Testgefäße: pH-Wert, Härte, Temperatur und Konzentration des gelösten Sauerstoffs;

— ausführliche Angaben zur Fütterung (z. B. Art des Futters, Herkunft, Fütterungsmenge und -häufigkeit).

2.3.4. **Ergebnisse:**

— Nachweis dafür, dass die Kontrollgruppen die Validitätskriterien für das Überleben erfüllen, sowie Daten zur Mortalität bei allen Testkonzentrationen;

— verwendete statistische Analysemethoden, statistische Angaben auf der Basis von Parallelgefäßen oder ein zelnen Fischen, Aufbereitung der Daten und Begründung der verwendeten Methoden;

— tabellarische Angaben zum individuellen und durchschnittlichen Gewicht der Fische an den Tagen 0, 14 (falls gemessen) und 28, Werte für durchschnittliche spezifische Wachstumsraten je Gefäß oder (gegebenenfalls) pseudo-spezifische Wachstumsraten für den Zeitraum 0-28 Tage bzw. 0-14 und 14-28 Tage;

— Ergebnisse der statistischen Analyse (d. h. Regressionsanalyse oder Varianzanalyse), vorzugsweise in tabellarischer und grafischer Form, sowie LOEC (p = 0,05) und NOEC oder nach Möglichkeit $EC_X$, gegebenenfalls mit Standardfehlern;

▼B

— festgestellte ungewöhnliche Reaktionen der Fische und erkennbare Auswirkungen der Prüfsubstanz.

3. LITERATUR

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

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

(3) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(4) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, 1855-1870.

(5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, 157-164.

(6) Yamamoto, Tokio. (197 5). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(7) Holcombe. G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson. R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, 287-297.

(8) Benoit. D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency. Duluth, Minnesota.

(9) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 328-338.

(10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or Atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS l/RM/28, 81 S.

(11) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(13) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, 1096-1121.

▼B

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

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

(16) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, 123-133.

(17) Quinton J. C. and Blake R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* Journal of Fish Biology, 37, 33-41.

(18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 S.

(19) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485-1494.

(20) DeGraeve G. M., Cooney J. M., Pollock T. L, Reichenbach J. H., Dean, Marcus M. D. and McIntyre D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 S.

(22) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 510-531.

▼B

*Anlage 1*

**FÜR DIE PRÜFUNG EMPFOHLENE FISCHSPEZIES UND GEEIGNETE PRÜFBEDINGUNGEN**

| Spezies | Empfohlener Testtemperaturbereich ( °C) | Fotoperiode (Stunden) | Empfohlener Bereich für das erforderliche Ausgangsgewicht der Fische | Messgenauigkeit (g) | Besatzrate (g/l) | Besatzdichte (pro Liter) | Futter | Testdauer (Tage) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Empfohlene Spezies** | | | | | | | | |
| *Oncorhynchus mykiss* Regenbogenforelle | 12,5-16,0 | 12-16 | 1-5 | Auf 100 mg genau | 1,2-2,0 | 4 | Marken-Trockenfutter für Salmonidenbrut | > 28 |
| **Sonstige gut dokumentierte Spezies** | | | | | | | | |
| *Danio rerio* Zebrabärbling | 21-25 | 12-16 | 0,050-0,100 | Auf 1 mg genau | 0,2-1,0 | 5-10 | Lebendfutter (*Brachionus Artemia*) | > 28 |
| *Oryzias latipes* Reiskärpfling (Medaka) | 21-25 | 12-16 | 0,050-0,100 | Auf 1 mg genau | 0,2-1,0 | 5-20 | Lebendfutter (*Brachionus Artemia*) | > 28 |

2008R0440 — DE — 22.03.2014 — 004.001 — 1018

▼B

*Anlage 2*

**EINIGE CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN VON GEEIGNETEM VERDÜNNUNGSWASSER**

| Substanz | Konzentrationen |
|---|---|
| Schwebstoffe | < 20 mg/l |
| Gesamter organischer Kohlenstoff | < 2 mg/l |
| Nichtionisiertes Ammoniak | < 1 µg/l |
| Restchlorgehalt | < 10 µg/l |
| Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden | < 50 ng/l |
| Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden und polychlorierten Biphenylen | < 50 ng/l |
| Gesamtgehalt an organischem Chlor | < 25 ng/l |

▼B

*Anlage 3*

**Logarithmische Reihe geeigneter Konzentrationen für den Toxizitätstest (9)**

Spalte (Anzahl der Konzentrationen zwischen 100 und 10 oder zwischen 10 und 1) ([1])

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32 | 46 | 56 | 63 | 68 | 72 | 75 |
| 10 | 22 | 32 | 40 | 46 | 52 | 56 |
| 3,2 | 10 | 18 | 25 | 32 | 37 | 42 |
| 1,0 | 4,6 | 10 | 16 | 22 | 27 | 32 |
| | 2,2 | 5,6 | 10 | 15 | 19 | 24 |
| | 1,0 | 3,2 | 6,3 | 10 | 14 | 18 |
| | | 1,8 | 4,0 | 6,8 | 10 | 13 |
| | | 1,0 | 2,5 | 4,6 | 7,2 | 10 |
| | | | 1,6 | 3,2 | 5,2 | 7,5 |
| | | | 1,0 | 2,2 | 3,7 | 5,6 |
| | | | | 1,5 | 2,7 | 4,2 |
| | | | | 1,0 | 1,9 | 3,2 |
| | | | | | 1,4 | 2,4 |
| | | | | | 1,0 | 1,8 |
| | | | | | | 1,3 |
| | | | | | | 1,0 |

([1]) Es können fünf (oder mehr) aufeinander folgende Konzentrationen aus einer Spalte gewählt werden. Die Mittelpunkte zwischen den Konzentrationen in Spalte (x) sind Spalte (2x + 1) zu entnehmen. Die aufgeführten Konzentrationen können Volumen- oder Gewichtsprozent (mg/l oder µg/l) darstellen. Die Werte können gegebenenfalls mit jeder beliebigen Zehnerpotenz multipliziert bzw. durch sie dividiert werden. Spalte 1 kann verwendet werden, wenn erhebliche Unsicherheit hinsichtlich des Toxititätsgrads besteht.

▼B

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

### 1. METHODE

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

### 1.1. EINLEITUNG

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

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

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

Vor der Veröffentlichung dieser Prüfung lagen die meisten Erfahrungen mit Fischembryonen und Dottersackjungfischen des Süßwasserfischs *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae — allgemeinsprachlicher Name: Zebrabärbling) vor. Detailliertere Angaben zur Versuchsdurchführung bei dieser Fischart finden sich daher in Anlage 1. Dadurch wird die Verwendung von anderen Fischarten, mit denen ebenfalls Erfahrungen vorliegen (Tabellen 1A und 1B), nicht ausgeschlossen.

### 1.2. DEFINITIONEN

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

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

▼B

1.3. PRINZIP DER METHODE

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

1.4. INFORMATIONEN ÜBER DIE PRÜFSUBSTANZ

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

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

1.5. VALIDITÄTSKRITERIEN

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

— Die gesamte Überlebensrate von befruchteten Eiern in den Kontrollen und, soweit zutreffend, in den Gefäßen, in denen sich ausschließlich Lösemittel befindet, muss größer oder gleich den in den Anlagen 2 und 3 definierten Grenzwerten sein.

— Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff muss während der gesamten Prüfung zwischen 60 und 100 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes liegen.

— Die Wassertemperatur darf zwischen den Prüfkammern oder zwischen aufeinander folgenden Tagen zu keiner Zeit während der Prüfung um mehr als ± 1,5 °C schwanken und sollte innerhalb der für die geprüfte Fischart festgelegten Temperaturbereiche liegen (Anlagen 2 und 3).

▼B

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1. **Prüfkammern**

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

1.6.2. **Auswahl der Fischarten**

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

1.6.3. **Haltung der Zuchtfische**

Nähere Angaben, wie man die Zuchtfische unter zufriedenstellenden Bedingungen hält, lassen sich in der OECD TG 210 ([1]) und in den Literaturhinweisen (2) (3) (4) (5) (6) finden.

1.6.4. **Handhabung von Embryonen und Larven**

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

Werden Eierbehälter, Gitter oder Siebe verwendet, um die Eier innerhalb des Hauptprüfgefäßes zu halten, sollten diese Rückhaltevorrichtungen nach dem Schlüpfen der Larven entfernt werden ([1]); Siebe sollten nur bleiben, um die Fische an der Flucht zu hindern. Sofern die Larven umgesetzt werden müssen, sollten sie nicht der Luft ausgesetzt werden, und es sollten keine Netze verwendet werden, um Fische aus Eierbehältern herauszuholen (derartige Vorsicht ist bei weniger anfälligen Arten wie beispielsweise Karpfen gegebenenfalls nicht erforderlich). Der Zeitpunkt für diese Umsetzung ist von Art zu Art unterschiedlich, und ein Umsetzen ist auch nicht immer erforderlich. Für das semistatische Verfahren können Bechergläser oder flache Behälter verwendet werden, die bei Bedarf mit einem leicht über dem Boden des Becherglases erhöhten Sieb versehen sind. Ist das Fassungsvermögen dieser Behälter für die Besatzanforderungen (siehe 1.7.1.2) ausreichend, brauchen die Embryonen oder Larven gegebenenfalls nicht umgesetzt zu werden.

([1]) OECD. Paris, 1992, Test Guideline 210, Fish. Early-life Stage Toxicity Test.

▼B

1.6.5. **Wasser**

Jedes Wasser, das die chemischen Eigenschaften eines annehmbaren Verdünnungswassers entsprechend der Auflistung in Anlage 4 erfüllt und bei dem die zu prüfende Fischart eine Kontrollüberlebensrate aufweist, die zumindest so gut wie in den Anlagen 2 und 3 beschrieben ist, kommt als Prüfwasser in Frage. Das Wasser sollte während des Prüfzeitraums von gleich bleibender Qualität sein. Der pH-Wert sollte in einem Bereich von ± 0,5 pH-Einheiten bleiben. Um sicherzustellen, dass das Verdünnungswasser das Prüfergebnis nicht übermäßig beeinflusst (beispielsweise durch Komplexbildung mit der Prüfsubstanz) oder sich nachteilig auf die Leistung des Zuchtbestands auswirkt, sollten in Abständen Proben zur Analyse entnommen werden. Messungen von Schwermetallen (z. B. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd und Ni), größeren Anionen und Kationen (z. B. Ca, Mg, Na, K, Cl und $SO_4$), Pestiziden (z. B. gesamte phosphororganische und gesamte chlororganische Pestizide), des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) und der Schwebstoffe sollten beispielsweise alle 3 Monate ermittelt werden, wenn bekanntermaßen ein Verdünnungswasser von relativ gleich bleibender Qualität vorliegt. Hat sich die Wasserqualität über einen Zeitraum von mindestens einem Jahr als relativ konstant erwiesen, können Bestimmungen seltener durchgeführt und die Abstände verlängert werden (z. B. alle 6 Monate).

1.6.6. **Prüflösungen**

Prüflösungen der gewählten Konzentrationen werden durch Verdünnung eines Stammansatzes hergestellt.

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

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

▼B

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

1.7. VORGEHENSWEISE

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

1.7.1. **Expositionsbedingungen**

1.7.1.1. *Dauer*

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

1.7.1.2. *Besatz*

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

1.7.1.3. *Licht und Temperatur*

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

▼B

1.7.2. **Prüfkonzentrationen**

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

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

1.7.3. **Kontrollen**

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

1.7.4. **Häufigkeit von analytischen Bestimmungen und Messungen**

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

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

Bei Prüfungen, bei denen nicht damit zu rechnen ist, dass die Konzentration der Prüfsubstanz innerhalb von ± 20 % der Nominalkonzentration (d. h., der Grundlage von Stabilitätsdaten der Substanz) konstant bleibt, ist es notwendig, alle Prüfkonzentrationen, frisch hergestellt und beim Austausch, zu analysieren, jedoch unter gleichen Verhältnissen (d. h. bei mindestens drei Gelegenheiten, die gleichmäßig über die Prüfung verteilt sind). Die Bestimmung von Konzentrationen der Prüfsubstanz vor dem Austausch braucht nur an einem Wiederholungsgefäß bei jeder Prüfkonzentration durchgeführt zu werden. Konzentrationen sollten im Abstand von nicht mehr als 7 Tagen bestimmt werden. Es wird empfohlen, dass Ergebnisse dabei auf gemessenen Konzentrationen basieren. Kann jedoch nachgewiesen werden, dass die Konzentration der Prüfsubstanz während der gesamten Prüfung zufriedenstellend innerhalb von ± 20 % der nominalen Konzentration oder gemessenen Anfangskonzentration gehalten wurde, dann können Ergebnisse auf nominalen oder gemessenen Anfangswerten basieren.

Bei Durchflussprüfungen ist ein ähnliches Probenahmeverfahren, wie für semistatische Prüfungen beschrieben, angebracht (die Messung der „alten“ Lösungen gilt in diesem Falle jedoch nicht). Dauert die Prüfung allerdings länger als 7 Tage, ist es unter Umständen ratsam, die Anzahl an Probenahmen in der ersten Woche zu erhöhen (d. h. drei Messreihen), um sicherzugehen, dass die Prüfkonzentrationen stabil bleiben.

▼B

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

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

1.7.5. **Beobachtungen**

1.7.5.1. *Stadium der Embryonalenwicklung*

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

1.7.5.2. *Schlüpfen und Überleben*

Beobachtungen zum Schlüpfen und Überleben sollten zumindest einmal pro Tag erfolgen, und die jeweiligen Zahlen sollten protokolliert werden. Zu Beginn der Prüfung können häufigere Beobachtungen (z. B. alle 30 Minuten in den ersten 3 Stunden) wünschenswert sein, da in einigen Fällen Überlebenszeiten aussagefähiger sein können als nur die Anzahl von Todesfällen (z. B. bei akuten toxischen Wirkungen). Sobald tote Embryonen und Larven festgestellt werden, sollten diese unmittelbar entfernt werden, da sie sich rasch zersetzen können. Äußerste Sorgfalt sollte bei der Entfernung von einzelnen toten Individuen aufgewendet werden, um benachbarte Eier/Larven nicht zu stoßen oder körperlich zu beschädigen, da diese äußerst zart und empfindlich sind. Je nach Entwicklungsstadium gelten unterschiedliche Kriterien zur Bestimmung des Todes:

— **bei Eiern:** insbesondere in den frühen Stadien ein deutlich erkennbarer Verlust an Lichtdurchlässigkeit und eine Veränderung der Färbung, hervorgerufen durch Gerinnung und/oder Ausfällung von Eiweiß, was zu einem weiß-opaken Aussehen führt;

— **bei Embryonen:** fehlende Körperbewegung und/oder fehlender Herzschlag und/oder opake Verfärbung bei Arten, bei denen die Embryonen im Normalfall durchsichtig sind;

— **bei Larven:** Bewegungslosigkeit und/oder fehlende Atmung und/oder fehlender Herzschlag und/oder weiß-opake Färbung des zentralen Nervensystems und/oder mangelnde Reaktion auf mechanische Reize.

▼B

1.7.5.3. *Abnormes Aussehen*

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

1.7.5.4. *Abnormes Verhalten*

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

1.7.5.5. *Länge*

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

1.7.5.6. *Gewicht*

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

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

— kumulative Mortalität;

— Anzahl von gesunden Larven am Ende der Prüfung;

— Zeit des Schlüpfbeginns und des Schlüpfendes (d. h. 90 % Schlüpfen in jeder Wiederholung);

— Anzahl von Larven, die jeden Tag schlüpfen;

— Länge (und Gewicht) der am Ende der Prüfung überlebenden Tiere;

— Anzahl an Larven, die deformiert sind oder ein abnormes Aussehen aufweisen;

— Anzahl von Larven, die abnormes Verhalten zeigen.

▼B

2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

2.1. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

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

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

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

2.2. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

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

2.3. ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

2.3.1. **Prüfsubstanz**

— Physikalische Beschaffenheit und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Daten zur chemischen Identifizierung, einschließlich Reinheitsgrad und analytisches Verfahren zur Quantifizierung der Prüfsubstanz, soweit zutreffend.

▼B

2.3.2. **Geprüfte Fischart**

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

2.3.3. **Prüfbedingungen**

— Zum Einsatz kommendes Prüfverfahren (z. B. semistatisches oder Durchflussverfahren, Zeitraum von der Befruchtung bis zum Beginn der Prüfung, Besatz usw.);

— Belichtungszeit(en);

— Auslegung der Prüfung (z. B. Anzahl der Prüfkammern und Wiederholungen, Anzahl an Embryonen je Wiederholung);

— Methode zur Herstellung von Stammansätzen und Häufigkeit der Erneuerung (sollte ein Lösungsmittel verwendet werden, sind dieses Mittel und dessen Konzentration anzugeben);

— die nominalen Prüfkonzentrationen, die Messwerte, deren Mittelwerte und deren Standardabweichungen in den Prüfbehältern sowie das Verfahren, nach dem diese erzielt wurden, und, sofern die Prüfsubstanz in Wasser bei Konzentrationen unterhalb der Prüfkonzentrationen löslich ist; es sollte der Nachweis geführt werden, dass sich die Messungen auf die Konzentrationen der Prüfsubstanz in der Lösung beziehen;

— Eigenschaften des Verdünnungswassers: pH-Wert, Härte, Temperatur, gelöste Sauerstoffkonzentration, Restchlorgehalt (soweit gemessen), gesamter organischer Kohlenstoff (TOC), Schwebstoffe, Salzgehalt des Prüfmediums (soweit gemessen) und eventuelle andere vorgenommene Messungen;

— Wasserqualität innerhalb der Prüfgefäße: pH-Wert, Härte, Temperatur und gelöste Sauerstoffkonzentration.

2.3.4. **Ergebnisse**

— Ergebnisse von eventuellen vorhergehenden Untersuchungen zur Stabilität der Prüfsubstanz;

— Nachweis, dass die Kontrollen den allgemeinen Standard bezüglich der Annehmbarkeit der Überlebensraten für die geprüfte Fischart erfüllen (Anlagen 2 und 3);

— Daten zu Mortalität/Überleben im Embryo- und Larvenstadium sowie Gesamtmortalität/-überleben;

— Tage bis zum Schlüpfen und Anzahl geschlüpfter Tiere;

— Angaben zur Länge (und zum Gewicht);

— Vorkommen und Beschreibung morphologischer Abnormitäten, soweit zutreffend;

— Vorkommen und Beschreibung von Auswirkungen auf das Verhalten, soweit zutreffend;

— statistische Auswertung und Datenaufbereitung;

— bei Tests, in denen zur Auswertung die ANOVA zum Einsatz kommt, die geringste Dosiskonzentration, bei der eine Wirkung beobachtet wird (LOEC). bei $p = 0,05$ und die höchste Dosiskonzentration, bei der keine Wirkung beobachtet wird (NOEC), für jede bewertete Reaktion, einschließlich einer Beschreibung der herangezogenen statistischen Verfahren und eine Angabe zum Umfang der Wirkung, die ermittelt werden konnte;

▼B

— bei Tests, die unter Zuhilfenahme von Regressionsverfahren ausgewertet werden, die $LC/EC_X$ und Vertrauensbereiche sowie ein Graf des angepassten Modells, das für deren Berechnung benutzt wurde;

— Erklärung für eine eventuelle Abweichung von dieser Prüfmethode.

3. **LITERATURHINWEISE**

(1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 S.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121-173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, 61-71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, 807-821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. 111. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri)*. J. Aquatic Toxicology, 9, 129-145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 S.

(12) Dunnett C. W. (195 5). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, 1096-1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992. 81 S.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio.* Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish *(Danio rerio).* a model System in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231-236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C, Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels. of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes.* EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (Oryzias latipes). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. 0., Poccocic T. L, Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the Performance of the seven-day Fathead minnow *(Pimephales promelas)* larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 S.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, 1-58.

*Tabelle 1A*

**Für die Prüfung empfohlene Fischarten**

| Süßwasserfische |
|---|
| *Oncorhynchus mykiss* |
| Regenbogenforelle (9) (16) |
| *Danio rerio* |
| Zebrabärbling (7) (17) (18) |
| *Cyprinus caprio* |
| Gemeiner Karpfen (8) (19) |
| *Oryzias latipes* |
| Japankärpfling/Medaka (20) (21) |
| *Pimephales* |
| *promelas* Dickkopfelritze (8) (22) |

▼B

*Tabelle 1B*

**Beispiele für andere hinreichend dokumentierte Arten, die ebenfalls verwendet wurden**

| Süßwasserfische | Salzwasserfische |
|---|---|
| *Carassius auratus*<br>Goldfisch (8)<br>*Lepomis macrochirus*<br>Blauer Sonnenbarsch (8) | *Menidia peninsulae*<br>Gezeiten-Ährenfisch (23) (24) (25)<br>*Clupea*<br>*harengus* Hering (24) (25)<br>*Gadus*<br>*morhua* Kabeljau (24) (25)<br>*Cyprinodon*<br>*variegatus* Edelsteinkärpfling (23) (24) (25) |

▼B

*Anlage 1*

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

EINFÜHRUNG

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

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

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

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

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

BEDINGUNGEN FÜR ELTERNFISCHE, FORTPFLANZUNG UND FRÜHE ENTWICKLUNGSSTADIEN

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

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

i) 8 Weibchen und 16 Männchen werden in einen Behälter mit 50 Litern Verdünnungswasser gesetzt, der vor direktem Licht geschützt und nach Möglichkeit mindestens 48 Stunden lang ungestört gelassen wird. Auf den Boden des Aquariums wird am Nachmittag des Tages, bevor die Prüfung beginnt, eine Laichschale gesetzt. Die Laichschale besteht aus einem Rahmen (aus Plexiglas oder einem anderen geeigneten Material) und ist 5 bis 7 cm hoch; am oberen Ende ist ein grobes Netz mit einer Maschenweite von 2 bis 5 mm befestigt, unten auf dem Boden ein feines Netz mit einer Maschenweite von 10 bis 30 μm. An dem groben Netz des Rahmens wird eine Reihe von „Laichbäumen“, die aus ungedrehtem Nylonfaden bestehen, befestigt. Nachdem die Fische 12 Stunden lang im Dunkeln gelassen wurden, wird ein schwaches Licht eingeschaltet, welches das Laichen in Gang setzen wird. 2 bis 4 Stunden nach dem Laichen wird die Laichschale entfernt, und die Eier werden eingesammelt. Die Laichschale hindert die Fische daran, die Eier aufzufressen, und ermöglicht gleichzeitig ein einfaches Einsammeln der Eier. Die Fischgruppe sollte zumindest einmal vor dem Laich, von dem Eier für die Prüfung verwendet werden, gelaicht haben.

▼B

ii) 5 bis 10 Männchen und Weibchen werden mindestens 2 Wochen vor dem beabsichtigten Laichen einzeln gehalten. Nach 5 bis 10 Tagen sind die Bäuche der Weibchen gebläht und ihre Genitalpapillen sichtbar. Männliche Fische besitzen keine Papillen. Das Laichen erfolgt in Laichbehältern, die mit einem eingeschobenen Gitterboden ausgerüstet sind (wie oben). Der Behälter wird mit Verdünnungswasser gefüllt, so dass das Wasser 5 bis 10 cm über dem Gitter steht. Am Tag vor dem beabsichtigten Laichen werden 1 Weibchen und 2 Männchen in den Behälter gesetzt. Die Wassertemperatur wird schrittweise 1 Grad über die Eingewöhnungstemperatur erhöht. Das Licht wird ausgeschaltet, und der Behälter wird so ungestört wie möglich gelassen. Am Morgen wird ein schwaches Licht eingeschaltet, welches das Laichen in Gang setzen wird. Nach 2 bis 4 Stunden werden die Fische entfernt und die Eier eingesammelt. Werden größere Chargen von Eiern benötigt, als von einem Weibchen gewonnen werden können, kann eine hinreichende Anzahl von Laichbehältern parallel aufgestellt werden. Dadurch, dass man den Reproduktionserfolg der einzelnen Weibchen vor der Prüfung festhält (Größe der Charge und Qualität), können die Weibchen mit dem höchsten Reproduktionserfolg für die Zucht ausgewählt werden.

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

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

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

Die für die frühen Entwicklungsstufen geltenden Prüfbedingungen sind in Anlage 2 aufgeführt. Optimal als pH-Wert und Härte für das Verdünnungswasser sind 7,8 beziehungsweise 250 mg $CaCO_3$/l.

BERECHNUNGEN UND STATISTIK

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

▼B

BESTIMMUNG DER $LC_{50}$ UND $EC_{50}$

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

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

Dabei gilt:

P = korrigierter prozentualer Anteil an überlebenden Eiern und Larven

P' = beobachteter prozentualer Anteil an überlebenden Eiern und Larven in der Prüfkonzentration

C = prozentualer Anteil an überlebenden Eiern und Larven in der Kontrolle

Soweit möglich, wird die $LC_{50}$ am Ende der Prüfung mittels einer geeigneten Methode bestimmt.

Wird die Berücksichtigung von morphologischen Abnormitäten in der $EC_{50}$-Statistik gewünscht, finden sich dazu bei Stephan (5) entsprechende Hinweise.

SCHÄTZUNG DER LOEC UND NOEC

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

LITERATURHINWEISE

(1) Laale H. \V. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review). Fish Biol. 10, 121-173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio (*Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 S.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling *(Brachyidanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, 173-181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, 1-333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, 69-81,

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, 103-117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, 519-531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

*Anlage 2*

**PRÜFBEDINGUNGEN, DAUER UND ÜBERLEBENSKRITERIEN FÜR EMPFOHLENE FISCHARTEN**

| Fischart | Temperatur ( °C) | Salzgehalt (0/00) | Belichtungs-dauer (Std.) | Dauer der Stadien (Tage) | | Typische Dauer der Prüfung | Überlebensrate in der Kontrolle (min.- %) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Embryonen | Jungfische mit Dottersack | | Schlüpferfolg | Nach dem Schlüpfen |
| SÜSSWASSERFISCHE | | | | | | | | |
| *Brachydanio rerio*<br>Zebrabärbling | 25 ± 1 | — | 12-16 | 3-5 | 8-10 | So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 5 Tage nach dem Schlüpfen (8-10 Tage) | 80 | 90 |
| *Oncorhynchus mykiss*<br>Regenbogenforelle | 10 ± 1 (1)<br>12 ± 1 (2) | — | 0 (a) | 30-35 | 25-30 | So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 20 Tage nach dem Schlüpfen (50-55 Tage) | 66 | 70 |
| *C.yprinus carpio*<br>Gemeiner Karpfen | 21-25 | — | 12-16 | 5 | > 4 | So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 4 Tage nach dem Schlüpfen (8-9 Tage) | 80 | 75 |
| *Oryzias latipes*<br>Japankärpfling/Medaka | 24 ± 1 (1)<br>23 ± 1 (2) | — | 12-16 | 8-11 | 4-8 | So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 5 Tage nach dem Schlüpfen (13-16 Tage) | 80 | 80 |
| *Pimephales promelas*<br>Fettköpfige Elritze | 25 ± 2 | — | 16 | 4-5 | 5 | So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 4 Tage nach dem Schlüpfen (8-9 Tage) | 60 | 70 |

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

*Anlage 3*

**Prüfbedingungen, Dauer und Überlebenskriterien für andere hinreichend dokumentierte Fischarten**

| Fischart | Temperatur ( °C) | Salzgehalt (0/00) | Belichtungsdauer (Std.) | Dauer der Stadien (Tage) | | Typische Dauer der Prüfung an Embryonen und Jungfischen mit Dottersack | Überlebensrate in der Kontrolle (min.- %) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Embryonen | Jungfische mit Dottersack | | Schlüpferfolg | Nach dem Schlüpfen |
| SÜSSWASSERFISCHE | | | | | | | | |
| *Carassius auratus*<br>Goldfisch | 24 ± 1 | — | — | 3-4 | > 4 | So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 4 Tage nach dem Schlüpfen (7 Tage) | — | 80 |
| *Leopomis macrochirus*<br>Blauer Sonnenbarsch | 21 ± 1 | — | 16 | 3 | > 4 | So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 4 Tage nach dem Schlüpfen (7 Tage) | — | 75 |
| SALZWASSERFISCHE | | | | | | | | |
| *Menidia peninsulae*<br>Gezeiten-Ährenfisch | 22-25 | 15-22 | 12 | 1,5 | 10 | So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 5 Tage nach dem Schlüpfen (6-7 Tage) | 80 | 60 |
| *Clupea harengus*<br>Hering | 10 ± 1 | 8-15 | 12 | 20-25 | 3-5 | So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 3 Tage nach dem Schlüpfen (23-27 Tage) | 60 | 80 |
| *Gadus morhua*<br>Kabeljau | 5 ± 1 | 5-30 | 12 | 14-16 | 3-5 | So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 3 Tage nach dem Schlüpfen (18 Tage) | 60 | 80 |
| *Cyprinodon variegatus*<br>Edelsteinkärpfling | 25 ± 1 | 15-30 | 12 | — | — | So bald wie möglich nach der Befruchtung (frühes Gastrula-Stadium) bis 4-7 Tage nach dem Schlüpfen (28 Tage) | > 75 | 80 |

▼B

*Anlage 4*

**VERSCHIEDENE CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN EINES ANNEHMBAREN VERDÜNNUNGSWASSERS**

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

▼B

## C.16. HONIGBIENEN — AKUTE ORALE TOXIZITÄTSPRÜFUNG

### 1. METHODE

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

### 1.1. EINLEITUNG

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

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

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

### 1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

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

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

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

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

### 1.3. PRINZIP DER METHODE

Erwachsene Arbeitshonigbienen (*Apis mellifera*) werden einem Bereich von Dosen der in einer Zuckerlösung dispergierten Prüfsubstanz ausgesetzt. Die Bienen werden dann mit derselben Lösung, jedoch ohne die Prüfsubstanz, gefüttert. Die Mortalität wird täglich im Verlauf von zumindest 48 Stunden protokolliert und mit Kontrollwerten verglichen. Wenn die Mortalitätsrate in der Zeit zwischen 24 Stunden und 48 Stunden zunimmt, während die Kontrollmortalität auf einem akzeptierten Stand bleibt, d. h. < 10 %, ist es angebracht, die Dauer der Prüfung auf maximal 96 Stunden zu verlängern. Die Ergebnisse werden ausgewertet, um die $LD_{50}$ für 24 Stunden und 48 Stunden und, sofern die Untersuchung verlängert wurde, für 72 Stunden und 96 Stunden zu berechnen.

▼B

1.4. VALIDITÄTSKRITERIEN

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

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

— die $LD_{50}$ der toxischen Bezugsnormale entspricht dem festgelegten Bereich.

1.5. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.5.1. **Sammlung der Bienen**

Es sollten junge erwachsene Arbeiterinnen derselben Rasse verwendet werden, d. h. Bienen gleichen Alters, gleichen Ernährungszustands usw. Die Bienen sollten aus angemessen gefütterten, gesunden, möglichst krankheitsfreien Völkern mit Königin stammen, deren Vorgeschichte und physiologischer Zustand bekannt ist. Sie könnten am Morgen der Verwendung oder am Abend vor der Prüfung gesammelt und bis zum nächsten Tag unter Prüfbedingungen gehalten werden. Bienen, die von Rähmchen ohne Brut gesammelt werden, sind geeignet. Eine Sammlung im frühen Frühjahr oder Spätherbst sollte vermieden werden, da die Bienen in dieser Zeit eine veränderte Physiologie aufweisen. Müssen Prüfungen im frühen Frühjahr oder Spätherbst durchgeführt werden, können Bienen in einem Brutschrank zum Schlüpfen gebracht und eine Woche lang mit „Bienenbrot“ (aus der Wabe gesammelte Pollen) und Zuckerlösung aufgezogen werden. Bienen, die mit chemischen Substanzen behandelt wurden, wie z. B. Antibiotika, Anti-Varroa-Produkten usw., sollten nach dem Ende der letzten Behandlung 4 Wochen nicht für Toxizitätsprüfungen eingesetzt werden.

1.5.2. **Unterbringungs- und Fütterungsbedingungen**

Verwendet werden einfach zu säubernde und gut belüftete Käfige. Dabei kann jedes geeignete Material verwendet werden, beispielsweise Edelstahl-, Drahtgitter-, Kunststoff- oder Einwegholzkäfige usw. Es sollten möglichst Gruppen von jeweils 10 Bienen pro Käfig zum Einsatz kommen. Die Größe der Prüfkäfige sollte der Anzahl der Bienen entsprechen, d. h. angemessenen Platz bieten.

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

1.5.3. **Vorbereitung der Bienen**

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

▼B

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

1.5.4. **Herstellung der Dosen**

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

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

1.6. VORGEHENSWEISE

1.6.1. **Prüf- und Kontrollgruppen**

Die Anzahl an geprüften Dosen und Wiederholungen sollte die statistischen Anforderungen für eine Bestimmung der $LD_{50}$ mit einem 95 %igen Vertrauensbereich erfüllen. Im Normalfall sind für die Prüfung fünf Dosen in einer geometrischen Reihe, die sich um einen Faktor von nicht mehr als 2,2 unterscheiden und den Bereich für die $LD_{50}$, abdecken, erforderlich. Der Verdünnungsfaktor und die Anzahl an Konzentrationen für die Dosierung müssen jedoch im Verhältnis zur Steigung der Toxizitätskurve (Dosis im Verhältnis zu Mortalität) unter Berücksichtigung der für die Auswertung der Ergebnisse herangezogenen statistischen Methode bestimmt werden. Mit Hilfe einer Vorprüfung zur Bestimmung des Konzentrationsbereichs lassen sich die angemessenen Konzentrationen für die Dosierung auswählen.

Mindestens drei Wiederholungsprüfgruppen von jeweils 10 Bienen sollten jeder Prüfkonzentrationsdosis ausgesetzt werden. Zusätzlich zu den Prüfreihen sollten mindestens drei Kontrollgruppen von jeweils 10 Bienen zum Einsatz kommen. Kontrollgruppen sollten auch für die verwendeten Lösemittel/Trägersubstanzen einbezogen werden (siehe 1.5.4).

1.6.2. **Toxischer Standard**

In die Prüfreihen ist ein toxischer Standard aufzunehmen. Zumindest drei Dosen sollten ausgewählt werden, die den erwarteten $LD_{50}$-Wert abdecken. Für jede Prüfdosis sollten mindestens drei Wiederholungskäfige mit jeweils 10 Bienen verwendet werden Der bevorzugte toxische Standard ist Dimethoat; für diesen Stoff liegt die nachgewiesene orale $LD_{50}$ für 24 Stunden im Bereich von 0,10 bis 0,35 µg Wirkstoff/Biene (2). Andere toxische Standards wären jedoch annehmbar, soweit hinreichende Daten zur Überprüfung der erwarteten Dosisreaktion vorgelegt werden können (z. B. Parathion).

▼B

1.6.3. **Exposition**

1.6.3.1. *Verabreichung der Dosen*

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

1.6.3.2. *Dauer*

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

1.6.4. **Beobachtungen**

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

Die Menge an aufgenommenem Futter pro Gruppe muss gemessen werden. Ein Vergleich zwischen den Anteilen an verzehrtem behandeltem und unbehandeltem Futter innerhalb der vorgegebenen 6 Stunden kann Aufschluss über die Genießbarkeit des behandelten Futters geben.

Alle anormalen Verhaltensweisen während des Prüfzeitraums müssen protokolliert werden.

1.6.5. **Limit-Test**

in einigen Fällen (z. B. wenn man erwartet, dass die Prüfsubstanz eine geringe Toxizität besitzt) kann ein Limit-Test mit 100 µg Wirkstoff/Biene durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass die $LD_{50}$ höher als dieser Wert ist. Dabei sollte das gleiche Verfahren zum Einsatz kommen, einschließlich drei Wiederholungsprüfgruppen für die Prüfdosis, die betreffenden Kontrollen, die Messung der Menge an verzehrtem behandeltem Futter und die Verwendung des toxischen Standards. Sofern Mortalitäten auftreten, sollte eine vollständige Untersuchung durchgeführt werden. Eventuell beobachtete subletale Wirkungen (siehe 1.6.4) müssen dokumentiert werden.

▼B

2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

2.1. DATEN

Daten sollten in tabellarischer Form zusammengefasst werden, wobei für jede Behandlungsgruppe sowie für die Kontrollgruppe und die Gruppe mit dem toxischen Standard die Anzahl an eingesetzten Bienen, die Mortalität für jede Beobachtungszeit und die Anzahl an Bienen mit beeinträchtigtem Verhalten auszuweisen sind. Die Mortalitätsdaten sind mit angemessenen statistischen Verfahren zu analysieren (z. B. Probit-Analyse, gleitender Durchschnitt, binomiale Wahrscheinlichkeit) (3) (4). Die Dosis-Reaktions-Kurven sind für jede empfohlene Beobachtungszeit darzustellen, und die Steigungen der Kurven und die mittleren letalen Dosen ($LD_{50}$) sind mit einem 95 % Vertrauensbereich zu berechnen. Korrekturen an der Kontrollmortalität könnten mit Hilfe der Abbott'schen Korrektur vorgenommen werden (4) (5). Sofern das behandelte Futter nicht vollständig verzehrt wurde, sollte die Prüfsubstanzdosis, die von jeder Gruppe aufgenommen wurde, ermittelt werden. Die $LD_{50}$ sollte in µg Prüfsubstanz je Biene angegeben werden.

2.2. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

2.2.1. **Prüfsubstanz**

— Physikalische Beschaffenheit und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. Stabilität in Wasser, Dampfdruck);

— Daten zur chemischen Identifikation, einschließlich Strukturformel, Reinheit (d. h., für Pflanzenschutzmittel die Identität und Konzentration des/der Wirkstoffs(e).

2.2.2. **Geprüfte Bienenart**

— Wissenschaftlicher Name, Rasse, ungefähres Alter (in Wochen), Sammlungsverfahren, Datum der Sammlung;

— Angaben über die Völker, die für die Sammlung der Prüfbienen eingesetzt wurden, einschließlich Gesundheitszustand, eventuelle Krankheiten von erwachsenen Bienen, eventuelle Vorbehandlungen usw.

2.2.3. **Prüfbedingungen**

— Temperatur und relative Feuchte des Versuchsraums;

— Unterbringungsbedingungen einschließlich Art, Größe und Material der Käfige;

— Verfahren für die Herstellung der Stamm- und Prüflösungen (sofern ein Lösemittel verwendet wird, müssen dieses Mittel und seine Konzentration angegeben werden);

— Versuchsanlage, z. B. Anzahl und eingesetzte Prüfkonzentrationen, Anzahl an Kontrollen; für jede Prüfkonzentration und Kontrolle Anzahl an Wiederholungskäfigen und Anzahl an Bienen pro Käfig;

— Datum der Prüfung.

▼B

2.2.4. **Ergebnisse**

— Ergebnisse von eventuellen Vorversuchen zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs;

— Rohdaten: Mortalität bei jeder geprüften Dosis zu jeder Beobachtungszeit;

— Darstellung der Dosisreaktionskurven am Ende der Prüfung;

— $LD_{50}$-Werte mit 95 %igem Vertrauensbereich für jede empfohlene Beobachtungszeit, jede Prüfsubstanz und den toxischen Standard;

— zur Bestimmung der $LD_{50}$ herangezogene statistische Verfahren;

— Mortalität in Kontrollen;

— sonstige beobachtete oder gemessene biologische Wirkungen, z. B. abnormes Verhalten der Bienen (einschließlich Ablehnung der Prüfdosis), Anteil an verzehrtem Futter in behandelten und unbehandelten Gruppen;

— eventuelle Abweichungen von den hier beschriebenen Prüfverfahren und sonstige relevante Informationen.

3. **LITERATURHINWEISE**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

▼B

## C.17. HONIGBIENEN — AKUTE KONTAKTTOXIZITÄTSPRÜFUNG

### 1. METHODE

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

### 1.1. EINLEITUNG

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

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

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

### 1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

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

**Dosis:** Dies ist die aufgebrachte Menge an Prüfsubstanz. Die Dosis wird als Menge (µg) Prüfsubstanz je Prüftier angegeben (µg/Biene).

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

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

### 1.3. PRINZIP DER METHODE

Erwachsene Arbeitshonigbienen (*Apis mellifera*) werden einem Bereich von Dosen der in einem entsprechenden Träger gelösten Prüfsubstanz durch direktes Aufbringen auf den Thorax (Tröpfchen) ausgesetzt. Die Dauer der Prüfung beträgt 48 Stunden. Wenn die Mortalitätsrate in der Zeit zwischen 24 Stunden und 48 Stunden zunimmt, während die Kontrollmortalität auf einem akzeptierten Stand bleibt, d. h. $< 10$ %, ist es angebracht, die Dauer der Prüfung auf maximal 96 Stunden zu verlängern. Die Mortalität wird täglich protokolliert und mit Kontrollwerten verglichen. Die Ergebnisse werden ausgewertet, um die $LD_{50}$ für 24 Stunden und 48 Stunden und, sofern die Untersuchung verlängert wurde, für 72 Stunden und 96 Stunden zu berechnen.

▼B

1.4. VALIDITÄTSKRITERIEN

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

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

— die $LD_{50}$ des toxischen Standards entspricht dem festgelegten Bereich.

1.5. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.5.1. **Sammlung der Bienen**

Es sollten junge erwachsene Arbeiterinnen verwendet werden, d. h. Bienen gleichen Alters, gleichen Ernährungszustands, gleicher Rasse usw. Die Bienen sollten aus angemessen gefütterten, gesunden, möglichst krankheitsfreien Völkern mit Königin stammen, deren Vorgeschichte und physiologischer Zustand bekannt ist. Sie könnten am Morgen der Verwendung oder am Abend vor der Prüfung gesammelt und bis zum nächsten Tag unter Prüfbedingungen gehalten werden. Bienen, die von Rähmchen ohne Brut gesammelt werden, sind geeignet. Eine Sammlung im frühen Frühjahr oder Spätherbst sollte vermieden werden, da die Bienen in dieser Zeit eine veränderte Physiologie aufweisen. Müssen Prüfungen im frühen Frühjahr oder Spätherbst durchgeführt werden, können Bienen in einem Brutschrank zum Schlüpfen gebracht und eine Woche lang mit „Bienenbrot“ (aus der Wabe gesammelte Pollen) und Zuckerlösung aufgezogen werden. Bienen, die mit chemischen Substanzen behandelt wurden wie z. B. Antibiotika, Anti-Varroa-Produkten usw., sollten nach dem Ende der letzten Behandlung 4 Wochen nicht für Toxizitätsprüfungen eingesetzt werden.

1.5.2. **Unterbringungs- und Fütterungsbedingungen**

Verwendet werden einfach zu säubernde und gut belüftete Käfige. Dabei kann jedes geeignete Material benutzt werden, beispielsweise Edelstahl-, Drahtgitter-, Kunststoff- oder Einwegholzkäfige usw. Die Größe der Prüfkäfige sollte der Anzahl der Bienen entsprechen, d. h. angemessenen Platz bieten. Es sollten möglichst Gruppen von jeweils 10 Bienen pro Käfig zum Einsatz kommen.

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

1.5.3. **Vorbereitung der Bienen**

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

1.5.4. **Herstellung der Dosen**

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

▼B

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

1.6. VORGEHENSWEISE

1.6.1. **Prüf- und Kontrollgruppen**

Die Anzahl an geprüften Dosen und Wiederholungen sollte die statistischen Anforderungen für eine Bestimmung der $LD_{50}$ mit einem 95 %igen Vertrauensbereich erfüllen. Im Normalfall sind für die Prüfung fünf Dosen in einer geometrischen Reihe, die sich um einen Faktor von nicht mehr als 2,2 unterscheiden und den Bereich für die $LD_{50}$, abdecken, erforderlich. Die Anzahl an Dosen muss jedoch im Verhältnis zur Steigung der Toxizitätskurve (Dosis im Verhältnis zu Mortalität) unter Berücksichtigung der für die Auswertung der Ergebnisse herangezogenen statistischen Methode bestimmt werden. Mit Hilfe einer Vorprüfung zur Bestimmung des Konzentrationsbereichs lassen sich die angemessenen Dosen auswählen.

Mindestens drei Wiederholungsprüfgruppen von jeweils 10 Bienen sollten jeder Prüfkonzentrationsdosis ausgesetzt werden.

Zusätzlich zu den Prüfreihen sollten mindestens drei Kontrollgruppen von jeweils 10 Bienen zum Einsatz kommen. Wird ein organisches Lösemittel oder ein Benetzungsmittel verwendet, müssen drei zusätzliche Kontrollgruppen mit jeweils 10 Bienen für das Löse- oder Benetzungsmittel mit einbezogen werden.

1.6.2. **Toxischer Standard**

In die Prüfreihen ist ein toxischer Standard aufzunehmen. Zumindest drei Dosen sollten ausgewählt werden, die den erwarteten $LD_{50}$-Wert abdecken. Für jede Prüfdosis sollten mindestens drei Wiederholungskäfige mit jeweils 10 Bienen verwendet werden. Der bevorzugte toxische Standard ist Dimethoat: Für diesen Stoff liegt die nachgewiesene Kontakt-$LD_{50}$ für 24 Stunden im Bereich von 0,10 bis 0,30 µg Wirkstoff/Biene (2). Andere toxische Standards wären jedoch annehmbar, soweit hinreichende Daten zur Überprüfung der erwarteten Dosisreaktion vorgelegt werden können (z. B. Parathion).

1.6.3. **Exposition**

1.6.3.1. *Verabreichung der Dosen*

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

1.6.3.2. *Dauer*

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

▼B

1.6.4. **Beobachtungen**

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

Alle anormalen Verhaltensweisen während des Prüfzeitraums müssen protokolliert werden.

1.6.5. **Limit-Test**

In einigen Fällen (z. B. wenn man erwartet, dass die Prüfsubstanz eine geringe Toxizität besitzt) kann ein Limit-Test mit 100 µg Wirkstoff/Biene durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass die $LD_{50}$ höher als dieser Wert ist. Dabei sollte das gleiche Verfahren zum Einsatz kommen, einschließlich drei Wiederholungsprüfgruppen für die Prüfdosis, die betreffenden Kontrollen und die Verwendung des toxischen Standards. Sofern Mortalitäten auftreten, sollte eine vollständige Untersuchung durchgeführt werden. Eventuell beobachtete subletale Wirkungen (siehe 1.6.4) sind zu dokumentieren.

2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

2.1. DATEN

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

2.2. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

2.2.1. **Prüfsubstanz**

— Physikalische Beschaffenheit und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. Stabilität in Wasser, Dampfdruck);

— Daten zur chemischen Identifikation, einschließlich Strukturformel, Reinheit (d. h. für Pflanzenschutzmittel die Identität und Konzentration des bzw. der Wirkstoffe).

2.2.2. **Geprüfte Bienenart**

— Wissenschaftlicher Name, Rasse, ungefähres Alter (in Wochen), Sammlungsverfahren, Datum der Sammlung:

— Angaben über die Völker, die für die Sammlung der Prüfbienen eingesetzt wurden, einschließlich Gesundheitszustand, eventuelle Krankheiten von erwachsenen Bienen, eventuelle Vorbehandlungen usw.

▼B

2.2.3. **Prüfbedingungen**

— Temperatur und relative Feuchte des Versuchsraums;

— Unterbringungsbedingungen einschließlich Art, Größe und Material der Käfige;

— Verfahren für die Verabreichung der Prüfsubstanz, z. B. verwendete Trägerlösung, aufgebrachtes Prüflösungsvolumen, verwendetes Betäubungsmittel;

— Versuchsanlage, z. B. Anzahl und eingesetzte Prüfdosen, Anzahl an Kontrollen; für jede Prüfdosis und Kontrolle Anzahl an Wiederholungskäfigen und Anzahl an Bienen pro Käfig;

— Datum der Prüfung.

2.2.4. **Ergebnisse**

— Ergebnisse von eventuellen Vorversuchen zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs;

— Rohdaten: Mortalität bei jeder geprüften Konzentration zu jeder Beobachtungszeit;

— Darstellung der Dosisreaktionskurven am Ende der Prüfung;

— $LD_{50}$-Werte mit 95 %igem Vertrauensbereich für jede empfohlene Beobachtungszeit, jede Prüfsubstanz und den toxischen Standard;

— zur Bestimmung der $LD_{50}$ herangezogene statistische Verfahren;

— Mortalität in Kontrollen;

— sonstige beobachtete oder gemessene biologische Wirkungen und eventuelle abnorme Reaktionen der Bienen;

— eventuelle Abweichungen von den hier beschriebenen Prüfverfahren und sonstige relevante Informationen.

3. **LITERATURHINWEISE**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, 119-125.

(3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for Computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, 265-267.

▼B

## C.18. ADSORPTION/DESORPTION NACH EINER SCHÜTTEL-METHODE

### 1. METHODE

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

### 1.1. EINLEITUNG

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

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

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

Siehe auch Allgemeine Einleitung.

### 1.2. ANWENDUNGSBEREICH

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

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

▼B

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

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

**Stufe 1**: Voruntersuchung zur Bestimmung

— des Boden-Lösungs-Verhältnisses;

— der Gleichgewichtszeit für die Adsorption und der bei Gleichgewicht adsorbierten Menge an Testsubstanz;

— der Adsorption der Testsubstanz an der Oberfläche der Testgefäße und der Stabilität der Testsubstanz während des Testzeitraums.

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

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

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

1.3. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND EINHEITEN

| Symbol | Begriffsbestimmung | Einheit |
|---|---|---|
| $A_{t_i}$ | Adsorptionsanteil zur Zeit $t_i$ | % |
| $A_{eq}$ | Adsorptionsanteil bei Adsorptionsgleichgewicht | % |
| $m_s^{ads}(t_i)$ | Masse der zur Zeit $t_i$ am Boden adsorbierten Testsubstanz | µg |
| $m_s^{ads}(\Delta t_i)$ | Masse der während des Zeitintervalls $\Delta t_i$ am Boden adsorbierten Testsubstanz | µg |
| $m_s^{ads}(eq)$ | Masse der bei Adsorptionsgleichgewicht am Boden adsorbierten Testsubstanz | µg |
| $m_0$ | Masse der Testsubstanz im Reagenzglas am Beginn des Adsorptionstests | µg |
| $m_m^{ads}(t_i)$ | Masse der Testsubstanz, gemessen in einer Aliquote ($v_a^A$) zum Zeitpunkt $t_j$ | µg |
| $m_{aq}^{ads}(eq)$ | Masse der Substanz in der Lösung bei Adsorptionsgleichgewicht | µg |
| $m_{Boden}$ | = $m_{soil}$ = Menge der Bodenphase, ausgedrückt als Boden-Trockenmasse | g |

▼B

| Symbol | Begriffsbestimmung | Einheit |
|---|---|---|
| $C_{st}$ | Massenkonzentration der Vorratslösung der Substanz | µg $cm^{-3}$ |
| $C_0$ | Ausgangsmassenkonzentration der Testlösung in Kontakt mit dem Boden | µg $cm^{-3}$ |
| $C_{aq}^{ads}(t_i)$ | Massenkonzentration der Substanz in der wässrigen Phase zur Zeit $t_i$ wenn die Analyse durchgeführt ist | µg $cm^{-3}$ |
| $C_s^{ads}(eq)$ | Gehalt der bei Adsorptionsgleichgewicht am Boden adsorbierten Substanz | µg $g^{-1}$ |
| $C_{aq}^{ads}(eq)$ | Massenkonzentration der Substanz in der wässrigen Phase bei Adsorptionsgleichgewicht | µg $cm^{-3}$ |
| $V_0$ | Anfangsvolumen der wässrigen Phase in Kontakt mit dem Boden während des Adsorptionstests | $cm^3$ |
| $v_a{}^A$ | Volumen der Aliquote, in der die Testsubstanz gemessen wird | $cm^3$ |
| $K_d$ | Verteilungskoeffizient für die Adsorption | $cm^3$ $g^{-1}$ |
| $K_{oc}$ | Auf organischen Kohlenstoff normierter Adsorptionskoeffizient | $cm^3$ $g^{-1}$ |
| $K_{om}$ | Auf organisches Material normierter Verteilungskoeffizient | $cm^3$ $g^{-1}$ |
| $K_F^{ads}$ | Freundlich-Adsorptionskoeffizient | µg $^{1-1/n}$ $(cm^3)$ $^{1/n}$ $g^{-1}$ |
| l/n | Freundlich-Exponent | |
| $D_{t_i}$ | Desorptionsanteil zum Zeitpunkt $t_i$ | % |
| $D_{\Delta t_i}$ | Desorptionsanteil im Zeitintervall $\Delta t_j$ | % |
| $K_{des}$ | Scheindesorptionskoeffizient | $cm^3$ $g^{-1}$ |
| $K_F^{ads}$ | Freundlich-Desorptionskoeffizient | µg $^{1-1/n}$ $(cm^3)$ $^{1/n}$ $g^{-1}$ |
| $m_{aq}^{ads}(t_i)$ | Masse der aus Boden während der Zeit $t_i$ desorbierten Testsubstanz | µg |
| $m_m^{ads}(\Delta t_i)$ | Masse der aus Boden während des Zeitintervalls $\Delta t_j$ desorbierten Testsubstanz | µg |
| $m_m^{ads}(eq)$ | Analytisch bestimmte Masse Substanz in der wässrigen Phase bei Desorptionsgleichgewicht | µg |
| $m_{aq}^{ads}(eq)$ | Gesamtmasse der bei Desorptionsgleichgewicht desorbierten Testsubstanz | µg |
| $m_s^{ads}(\Delta t_i)$ | Masse der nach dem Zeitintervall $\Delta t_i$ am Boden adsorbiert bleibenden Substanz | µg |
| $m_{aq}{}^A$ | Masse der nach Adsorptionsgleichgewichtseinstellung infolge unvollständigen Volumenaustauschs verbliebenen Substanz | µg |
| $C_s^{ads}(eq)$ | Gehalt der bei Desorptionsgleichgewicht am Boden adsorbiert bleibenden Testsubstanz | µg $g^{-1}$ |

▼B

| Symbol | Begriffsbestimmung | Einheit |
|---|---|---|
| $C_{aq}^{ads}(eq)$ | Massenkonzentration der Testsubstanz in der wässrigen Phase bei Desorptionsgleichgewicht | µg $cm^{-3}$ |
| $V_T$ | Gesamtvolumen der wässrigen Phase in Kontakt mit dem Boden während des nach der Aliquotenbeprobungsmethode durchgeführten Desorptionskinetikversuchs | $cm^3$ |
| $V_R$ | Volumen des nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts aus dem Glas abgenommenen und durch das gleiche Volumen einer 0,01 M $CaCl_2$-Lösung ersetzten Überstands | $cm^3$ |
| $v_a^D$ | Volumen der während des nach der Aliquotenbeprobungsmethode durchgeführten Desorptionskinetikversuchs ab der Zeit (i) als Probe zu Analysezwecken abgenommenen Aliquote | $cm^3$ |
| $V_r^r$ | Volumen der im Desorptionskinetikversuch (Gesamtbeprobungsmethode) aus dem Glas (i) zur Messung der Testsubstanz abgenommenen Lösung | $cm^3$ |
| $V_r^F$ | Volumen der bei Desorptionsgleichgewicht aus dem Glas zur Messung der Testsubstanz abgenommenen Lösung | $cm^3$ |
| MB | Massenbilanz | % |
| $m_E$ | Gesamtmasse der aus Boden und von Wänden des Testgefäßes in zwei Schritten extrahierten Testsubstanz | µg |
| $V_{rec}$ | Volumen des nach Adsorptionsgleichgewicht erhaltenen Überstands | $cm^3$ |
| $P_{ow}$ | Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient | |
| pKa | Dissoziationskonstante | |
| $S_w$ | Wasserlöslichkeit | g $l^{-1}$ |

1.4. PRINZIP DER TESTMETHODE

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

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

▼B

1.5. ANGABEN ZUR TESTSUBSTANZ

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

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

a) Wasserlöslichkeit (A.6);

b) Dampfdruck (A.4) und/oder Henry-Konstante;

c) abiotischer Abbau: Hydrolyse als Funktion des pH (C.7);

d) Verteilungskoeffizient (A.8);

e) leichte biologische Abbaubarkeit (C.4) bzw. aerobe und anaerobe Umwandlung im Boden;

f) pKa von ionisierbaren Substanzen;

g) Direktfotolyse in Wasser (d. h. UV-Vis-Absorptionsspektrum in Wasser, Quantenausbeute) und fotochemischer Abbau an Boden.

1.6. ANWENDBARKEIT DES TESTS

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

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

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

1.7. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.7.1. **Geräte und chemische Reagenzien**

Standardlaborausstattung, insbesondere Folgendes:

a) Reagenzgläser oder Gefäße zur Versuchsdurchführung. Vor allem müssen diese Reagenzgläser oder Gefäße

— genau in die Zentrifuge passen, um Handhabungs- und Umsetzfehler weitestgehend auszuschließen;

— aus inertem Material bestehen, damit es möglichst nicht zur Adsorption der Testsubstanz an der Oberfläche kommt;

▼B

b) Schüttelwerk: Überkopfschüttler oder gleichwertige Vorrichtung; der Schüttler sollte den Boden während des Schüttelns in Suspension halten;

c) Zentrifuge: vorzugsweise Hochleistungsgerät, z. B. mit Zentrifugalkräften > 3 000 g, temperaturgeregelt, fähig zur Abtrennung von Partikeln mit einem Durchmesser über 0,2 μm aus wässriger Lösung. Die Behälter sollten während des Rührens und Zentrifugierens abgedeckt sein, um Volatilitäts- und Wasserverluste zu vermeiden; um einer Adsorption daran möglichst vorzubeugen, sollte auf inaktivierte Abdeckungen, beispielsweise teflonbeschichtete Schraubkappen, zurückgegriffen werden;

d) fakultativ: Filtriervorrichtung; sterile Einweg-Filter mit einer Porosität von 0,2 μm. Mit besonderer Umsicht ist bei der Auswahl des Filtermaterials vorzugehen, um jegliche Verluste der Testsubstanz daran zu vermeiden; bei schwerlöslichen Testsubstanzen wird empfohlen, kein organisches Filtermaterial zu verwenden;

e) analytische Instrumente, mit denen die Konzentration der Testchemikalie gemessen werden kann;

f) Laborofen, mit dem sich eine Temperatur von 103 °C bis 110 °C halten lässt.

1.7.2. **Charakterisierung und Auswahl von Böden**

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

Die für eine Bodencharakterisierung verwendeten Methoden sind von großer Bedeutung und können einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse ausüben. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, den Boden-pH-Wert in einer Lösung von 0,01 M $CaCl_2$ (der im Adsorptions-/Desorptionstest verwendeten Lösung) gemäß der entsprechenden ISO-Methode (ISO-10390-1) zu messen. Weiterhin wird empfohlen, die übrigen relevanten Bodenmerkmale nach Standardverfahren zu bestimmen (z. B. ISO Handbook of soil analysis). Diese Vorgehensweise gestattet es, die Analyse von Sorptionsdaten anhand international einheitlicher Bodenparameter vorzunehmen. Einige Anleitungen zu vorhandenen Standardverfahren der Bodenanalyse und -Charakterisierung sind den Literaturangaben zu entnehmen (50) (51) (52). Zur Kalibrierung von Bodentestmethoden wird die Verwendung von Referenzböden empfohlen.

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

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

▼B

*Tabelle 1*

**Anleitung zur Auswahl von Bodenproben zur Adsorption/Desorption**

| Bodentyp | pH-Bereich (in 0,01 M $CaCl_2$) | Organischer Kohlenstoffgehalt ( %) | Tongehalt ( %) | Bodentextur ([1]) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4,5-5,5 | 1,0-2,0 | 65-80 | Ton |
| 2 | > 7,5 | 3,5-5,0 | 20-40 | Toniger Lehm |
| 3 | 5,5-7,0 | 1,5-3,0 | 15-25 | Schluffiger Lehm |
| 4 | 4,0-5,5 | 3,0-4,0 | 15-30 | Lehm |
| 5 | < 4,0-6,0 ([2]) | < 0,5-1,5 ([2]) ([3]) | < 10-15 ([2]) | Lehmiger Sand |
| 6 | >7,0 | < 0,5-1,0 ([2]) ([3]) | 40-65 | Toniger Lehm/Ton |
| 7 | < 4,5 | > 10 | < 10 | Sand/lehmiger Sand |

([1]) Gemäß FAO und dem US-amerikanischen System (85).
([2]) Die Werte der jeweiligen Variablen sollten vorzugsweise in dem angegebenen Bereich liegen. Sollten jedoch Schwierigkeiten bei der Suche nach geeignetem Bodenmaterial auftreten, sind auch Werte unterhalb des angezeigten Minimums zulässig.
([3]) Böden mit einem organischen Kohlenstoffgehalt unter 0,3 % können die Korrelation zwischen organischem Gehalt und Adsorption stören. Daher ist es ratsam, Böden mit einem organischer. Kohlenstoffgehalt von mindestens 0,3 % einzusetzen.

1.7.3. **Sammlung und Lagerung von Bodenproben**

1.7.3.1. *Sammlung*

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

Folgendes ist zu beachten:

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

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

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

▼B

1.7.3.2. *Lagerung*

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

1.7.3.3. *Handhabung und Vorbereitung von Bodenproben auf den Test*

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

1.7.4. **Vorbereitung der Testsubstanz zur Anwendung auf Boden**

Die Testsubstanz wird in einer Lösung von 0,01 M $CaCl_2$ in destilliertem oder entionisiertem Wasser gelöst. Die $CaCl_2$-Lösung dient als wässrige Lösungsmittelphase zur Verbesserung der Zentrifugation und Minimierung des Kationenaustauschs. Die Konzentration der Vorratslösung sollte die Nachweisgrenze der verwendeten analytischen Methode vorzugsweise um den Faktor 3 übersteigen. Diese Schwelle gewährleistet genaue Messungen in Bezug auf die diesem Verfahren zugrunde liegende Methodik. Darüber hinaus sollte die Konzentration der Vorratslösung die Wasserlöslichkeit der Testsubstanz unterschreiten.

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

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

Eine andere Alternative bei schwerlöslichen Substanzen besteht darin, die Testsubstanz durch Untermischen in ein Testsystem zu geben: Die Testsubstanz wird in einem organischen Lösungsmittel gelöst, von dem eine Aliquote zu dem System von Boden und 0,01 M $CaCl_2$-Lösung in destilliertem oder entionisiertem Wasser gegeben wird. Der Gehalt an organischem Lösungsmittel in der wässrigen Phase sollte so niedrig wie möglich gehalten werden und im Regelfall 0,1 % nicht übersteigen. Beim Untermischen aus einer organischen Lösung kann das Problem der Volumen-Nichtreproduzierbarkeit auftreten. Dadurch kann sich ein zusätzlicher Fehler ergeben, da die Konzentrationen von Testsubstanz und Hilfslösungsmittel nicht in allen Tests gleich hoch ausfallen dürften.

▼B

1.8. VORAUSSETZUNGEN FÜR DIE DURCHFÜHRUNG DES ADSORPTIONS-/DESORPTIONSTESTS

1.8.1. **Analysenmethode**

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

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

Ein angemessenes Volumen 0,01 M $CaCl_2$, z. B. 100 $cm^3$, wird mit einer Masse Boden, z. B. 20 g, hoher Adsorptionsfähigkeit, d. h. mit hohem organischen Kohlenstoff- und Tongehalt 4 Stunden geschüttelt. Diese Massen und Volumen können je nach Analysenanforderung variieren, doch ist ein Boden-Lösungs-Verhältnis von 1:5 ein geeigneter Ausgangswert. Das Gemisch wird zentrifugiert, und die wässrige Phase kann filtriert werden. Diese wird dann mit einem bestimmten Volumen der Testsubstanz-Vorratslösung versetzt, so dass eine Nennkonzentration innerhalb des für den Testverlauf wahrscheinlichen Konzentrationsbereichs erreicht wird. Dieses Volumen sollte 10 % des Endvolumens der wässrigen Phase nicht überschreiten, um den Charakter der Lösung vor Einstellung des Gleichgewichts so wenig wie möglich zu verändern. Die Lösung wird analysiert.

Es ist ein Leerdurchlauf, bestehend aus dem System Boden + $CaCl_2$-Lösung (ohne Testsubstanz), anzusetzen, um unerwünschte Pseudoergebnisse in der Analysenmethode und durch den Boden hervorgerufene Matrixeffekte zu entdecken.

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

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

▼B

1.8.2. **Auswahl optimaler Boden-Lösungs-Verhältnisse**

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

Ein passender Ansatz für die Wahl geeigneter Boden-Wasser-Verhältnisse basiert auf einer Schätzung des $K_d$-Werts entweder mittels Voruntersuchungen oder durch etablierte Abschätzungsverfahren (Anlage 3). Die Wahl eines geeigneten Verhältnisses kann auf der Basis einer grafischen Darstellung des Boden-Lösungs-Verhältnisses in Abhängigkeit von $K_d$ für festgelegte Adsorptionsanteile erfolgen (Abbildung 1). Bei dieser Darstellung wird angenommen, dass die Adsorptionsgleichung linear ist ([1]). Die anwendbare Beziehung wird durch Umstellung der Gleichung (4) des $K_d$ in Form der Gleichung (1) erhalten:

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

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

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

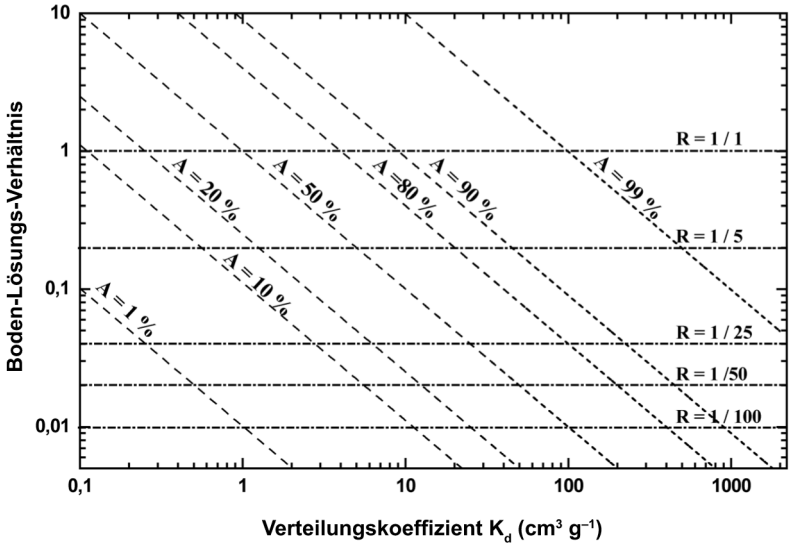



**Abbildung 1:** Beziehung zwischen Boden-Lösungs-Verhältnissen und $K_d$ bei verschiedenen Anteilen adsorbierter Testsubstanz

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

▼B

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

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

1.9. DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1.9.1. **Testbedingungen**

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

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

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

1.9.2. **Stufe 1 — Voruntersuchung**

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

1.9.2.1. *Auswahl optimaler Boden-Lösungs-Verhältnisse*

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

— 50 g Boden und 50 $cm^3$ wässrige Lösung der Testsubstanz (Verhältnis 1:1);

▼B

— 10 g Boden und 50 $cm^3$ wässrige Lösung der Testsubstanz (Verhältnis 1:5);

— 2 g Boden und 50 $cm^3$ wässrige Lösung der Testsubstanz (Verhältnis 1:25).

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

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

Ein Leerdurchlauf je Boden mit der gleichen Menge Boden und einem Gesamtvolumen von 50 $cm^3$ 0,01 M $CaCl_2$-Lösung (ohne Testsubstanz) wird dem gleichen Testverfahren unterzogen. Dies dient während der Analyse als Leerkontrolle zum Nachweis störender Substanzen oder kontaminierter Böden.

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

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

Die lufttrockenen Proben werden durch Schütteln mit einem Mindestvolumen von 45 $cm^3$ 0,01 M $CaCl_2$ über Nacht (12 Stunden) vor dem Versuchstag ins Gleichgewicht gebracht. Anschließend wird mit einem bestimmten Volumen der Vorratslösung der Testsubstanz auf das Endvolumen von 50 $cm^3$ aufgefüllt. Das zugesetzte Volumen der Vorratslösung sollte a) 10 % des Endvolumens von 50 $cm^3$ der wässrigen Phase nicht überschreiten, um den Charakter der Lösung vor Einstellung des Gleichgewichts möglichst wenig zu verändern; und b) vorzugsweise in einer Anfangskonzentration der in Kontakt mit dem Boden befindlichen Testsubstanz ($C_0$) resultieren, die die Nachweisgrenze der analytischen Methode mindestens um den Faktor 2 überschreitet — diese Schwelle gewährleistet auch bei einer starken Adsorption genaue Messungen (> 90 %) sowie später die Bestimmung der Adsorptionsisothermen. Die Anfangskonzentration der Substanz ($C_0$) sollte möglichst nicht höher sein als die Hälfte ihrer Löslichkeitsgrenze.

Nachstehend wird ein Beispiel für die Art und Weise der Berechnung der Konzentration der Vorratslösung ($C_{st}$) beschrieben. Angenommen wird eine Nachweisgrenze von 0,01 µg $cm^{-3}$ und 90 %ige Adsorption. Daher sollte die Anfangskonzentration der Testsubstanz in Kontakt mit dem Boden vorzugsweise 1 µg $cm^{-3}$ betragen (zwei Größenordnungen über der Nachweisgrenze). Unter der Voraussetzung, dass das empfohlene Höchstvolumen der Vorratslösung zugesetzt wird, d. h. 5 bis 45 $cm^3$ 0,01 M $CaCl_2$-Gleichgewichtseinstellungslösung (= 10 % der Vorratslösung zum Gesamtvolumen der wässrigen Phase von 50 $cm^3$), sollte die Konzentration der Vorratslösung 10 µg $cm^{-3}$ betragen, d. h., die Nachweisgrenze der analytischen Methode um den Faktor 3 überschreiten.

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

▼B

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

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

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

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

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

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

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

([1]) Einträge der Konzentration der Testsubstanz in der wässrigen Phase ($\left(C_{aq}^{ads}\right)$) in Abhängigkeit von der Zeit könnten ferner zur Abschätzung des Erreichens des Gleichgewichtsplateaus verwendet werden (siehe Abbildung 2 in Anlage 5).

▼B

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

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

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

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

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

▼B

1.9.3. *Stufe 2 — Adsorptionskinetik bei einer Konzentration der Testsubstanz*

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

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

Jedes Experiment (ein Boden und eine Lösung) wird mindestens doppelt ausgeführt, um die Varianz der Resultate abschätzen zu können. Bei jedem Versuch wird eine Leerprobe untersucht. Sie besteht aus dem Boden und 0,01 M $CaCl_2$-Lösung ohne Testsubstanz und ist hinsichtlich Gewicht und Volumen mit den Versuchsproben identisch. Zu Absicherung gegen unerwartete Ergebnisse wird eine Kontrollprobe mit lediglich der Testsubstanz in 0,01 M $CaCl_2$-Lösung (ohne Boden) dem gleichen Testverfahren unterzogen.

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

Ergebnisse des Adsorptionskinetiktests:

Der lineare $K_d$-Wert ist im Allgemeinen zur Beschreibung des Sorptionsverhaltens in Boden hinreichend genau (35) (78) und ist ein Ausdruck für die inhärente Mobilität von Chemikalien in Boden. Beispielsweise gelten Chemikalien mit $K_d \leq 1$ $cm^3$ $g^{-1}$ in der Regel als qualitativ mobil. In ähnlicher Weise haben MacCall et al. (16) eine Mobilitätssystematik auf der Basis von $K_{oc}$-Werten aufgestellt. Ferner gibt es Auswaschsystematiken auf der Grundlage einer Beziehung zwischen $K_{oc}$ und DT-50 ([1]) (32) (79).

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

([1]) DT-50: Abbauzeit für 50 % der Testsubstanz.

▼B

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

1.9.4. *Stufe 3 — Adsorptionsisothermen und Desorptionskinetik/-Desorptionsisothermen*

1.9.4.1. Adsorptionsisothermen

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

Ergebnisse aus dem Adsorptionsisothermenexperiment:

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

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

1.9.4.2. Desorptionskinetik

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

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

▼B

a) Gesamtbeprobungsmethode: Für jeden Boden, der zur Fortführung der Desorptionsstudie ausgewählt wurde, werden so viele Proben mit dem gleichen Boden-Lösungs-Verhältnis vorbereitet, wie Zeitintervalle zur Untersuchung der Desorptionskinetik vorgesehen sind. Vorzugsweise sollten die gleichen Zeitintervalle wie beim Adsorptionskinetikversuch Anwendung finden, doch kann die Gesamtzeit auch ausgedehnt werden, falls dies zum Erreichen des Desorptionsgleichgewichts im System erforderlich ist. Bei jedem Versuch (ein Boden, eine Lösung) wird eine Leerprobe untersucht. Diese besteht aus dem Boden und 0,01 M $CaCl_2$-Lösung, ohne Testsubstanz, und ist hinsichtlich Gewicht und Volumen mit denen des Experiments identisch. Als Kontrollprobe wird die Testsubstanz in 0,01 M $CaCl_2$-Lösung (ohne Boden) dem gleichen Testverfahren unterzogen. Alle Gemische des Bodens mit der Lösung werden bis zum Erreichen des Adsorptionsgleichgewichts geschüttelt (wie zuvor in Stufe 2 bestimmt). Anschließend werden die Phasen mittels Zentrifugieren getrennt und die wässrigen Phasen so weit wie möglich abgenommen. Für das abgenommene Volumen Lösung wird mit einem gleichen Volumen 0,01 M $CaCl_2$ ohne Testsubstanz aufgefüllt, und die neuen Gemische werden wieder geschüttelt. Die wässrige Phase des ersten Glases wird möglichst vollständig aufgefangen und nach beispielsweise 2 Stunden gemessen, die des zweiten Glases nach 4 Stunden, die des dritten nach 6 Stunden usw., bis das Desorptionsgleichgewicht eingestellt ist.

b) Aliquotenbeprobungsmethode: Nach dem Adsorptionskinetikversuch wird das Gemisch zentrifugiert und die wässrige Phase so weit wie möglich abgenommen. Für das abgenommene Lösungsvolumen wird mit einem gleichen Volumen 0,01 M $CaCl_2$ ohne Testsubstanz aufgefüllt. Das neue Gemisch wird bis zur Einstellung des Desorptionsgleichgewichts geschüttelt. Während dieses Zeitraums wird das Gemisch in festgelegten Zeitintervallen zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Eine kleine Aliquote der wässrigen Phase wird sofort auf die Testsubstanz analysiert. Anschließend läuft der Versuch mit dem ursprünglichen Gemisch weiter. Das Volumen jeder einzelnen Aliquote sollte geringer sein als 1 % des Gesamtvolumens. Zur Aufrechterhaltung des Verhältnisses Boden/Lösung wird in das Gemisch die gleiche Menge frischer 0,01-M-$CaCl_2$-Lösung gegeben. Das Schütteln wird bis zum darauf folgenden Zeitintervall fortgesetzt.

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

Ergebnisse aus dem Desorptionskinetikversuch:

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

1.9.4.3. Desorptionsisothermen

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

▼B

2. **DATEN UND ABSCHLUSSBERICHT**

Die Zusammenstellung der Analysendaten erfolgt in Tabellenform (siehe Anlage 6). Es werden einzelne Messungen und errechnete Mittelwerte angegeben. Von Adsorptionsisothermen werden grafische Darstellungen vorgelegt. Die Berechnungen werden wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

Für die Zwecke des Tests wird davon ausgegangen, dass das Gewicht von 1 $cm^3$ wässriger Lösung 1 g beträgt. Das Boden-Lösungs-Verhältnis kann in den Darstellungen mit den Einheiten w/w bzw. w/vol ausgedrückt werden.

2.1. ADSORPTION

Die Adsorption ($A_{t_i}$) wird als der Anteil von unter den Testbedingungen am Boden adsorbierter Substanz bezogen auf die zu Beginn des Tests vorhandene Menge definiert. Ist die Testsubstanz stabil und adsorbiert nicht signifikant an der Behälterwand, so wird $A_{t_i}$ zu jedem Zeitpunkt $t_i$ nach folgender Gleichung berechnet:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

Hierin bedeuten:

$A_{t_i}$ = Adsorptionsanteil zum Zeitpunkt $t_i$ ( %)

$m_s^{ads}(t_i)$ = Masse der am Boden zur Zeit $t_i$ adsorbierten Testsubstanz (µg)

$m_0$ = Masse der Testsubstanz im Reagenzglas zu Beginn des Tests (µg)

Detaillierte Angaben zur Vorgehensweise bei der Berechnung des Adsorptionsanteils $A_{t_i}$ für die Gesamtbeprobungs- und die Aliquotenbeprobungsmethode enthält Anlage 5.

Der Verteilungskoeffizient $K_d$ ist der Quotient aus dem Gehalt der Substanz in der Bodenphase und der Massenkonzentration der Substanz in der wässrigen Lösung unter den Testbedingungen, wenn das Adsorptionsgleichgewicht erreicht wird.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (4)$$

Hierin bedeuten:

$C_s^{ads}(eq)$ = Gehalt der am Boden bei Adsorptionsgleichgewicht adsorbierten Substanz (µg $g^{-1}$)

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = Massenkonzentration der Substanz in der wässrigen Phase bei Adsorptionsgleichgewicht (µg $cm^{-3}$). (Diese Konzentration wird analytisch unter Berücksichtigung der durch die Leerversuche erhaltenen Werte bestimmt.)

$m_s^{ads}(eq)$ = Masse der am Boden bei Adsorptionsgleichgewicht adsorbierten Substanz (µg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = Masse der Substanz in der Lösung bei Adsorptionsgleichgewicht (µg)

$m_{Boden} = m_{soil}$ = Menge der Bodenphase, ausgedrückt in Trockenmasse Boden (g)

$V_0$ = Ausgangsvolumen der wässrigen Phase in Kontakt mit dem Boden ($cm^3$)

Die Beziehung zwischen $A_{eq}$ und $K_d$ wird wie folgt dargestellt:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

Hierin bedeutet:

$A_{eq}$ = Adsorptionsanteil bei Adsorptionsgleichgewicht ( %).

Der auf organischen Kohlenstoff normierte Adsorptionskoeffizient $K_{oc}$ setzt den Verteilungskoeffizienten $K_d$ in Beziehung zum Gehalt an organischem Kohlenstoff in der Bodenprobe:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \, (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (6)$$

Hierin bedeutet:

% oc = Anteil an organischem Kohlenstoff in der Bodenprobe ($g \ g^{-1}$).

Der $K_{oc}$-Koeffizient steht für einen einzigen Wert, der die Verteilung hauptsächlich von nichtpolaren organischen Chemikalien zwischen organischem Kohlenstoff im Boden oder Sediment und Wasser charakterisiert. Die Adsorption dieser Chemikalien wird in Korrelation zum organischen Gehalt des sorbierenden Feststoffs gesetzt (7). Folglich sind $K_{oc}$-Werte abhängig von den spezifischen Eigenschaften der Huminfraktionen, die hinsichtlich der Sorptionskapazität aufgrund von Unterschieden in Herkunft, Entstehung usw. erheblich voneinander abweichen.

2.1.1. **Adsorptionsisothermen**

Die Freundlich-Adsorptionsisothermen-Gleichung setzt die Menge der adsorbierten Testsubstanz in Beziehung zur Konzentration der Testsubstanz in Lösung bei Gleichgewicht (Gleichung 8).

Die Daten werden wie unter dem Punkt „Adsorption“ beschrieben behandelt, und für jedes Reagenzglas wird der Gehalt der nach dem Adsorptionstest am Boden adsorbierten Testsubstanz ($C_s^{ads}(eq)$, an anderer Stelle als x/m bezeichnet) berechnet. Es wird angenommen, dass ein Gleichgewicht eingestellt worden ist und dass $C_s^{ads}(eq)$ für den Gleichgewichtswert steht:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \ . \ V_0}{m_{soil}} \, (\mu g \ g^{-1}) \qquad (7)$$

Die Freundlich'sche Adsorptionsgleichung lautet wie folgt (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \, (\mu g \ g^{-1}) \qquad (8)$$

bzw. in der linearen Form:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} \ + \ 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \qquad (9)$$

Hierin bedeuten:

$K_F^{ads}$ = Freundlich-Adsorptionskoeffizient; seine Dimension ist $cm^3 \ g^{-1}$, jedoch nur wenn l/n = 1; in allen anderen Fällen wird die Neigung l/n in die Dimension von $K_F^{ads}$ ($\mu g^{1-1/n} \ (cm^3)^{1/n} \ g^{-1}$) eingeführt:

n = Regressionskonstante; l/n liegt im Allgemeinen im Bereich von 0,7 bis 1,0 und zeigt an, dass Sorptionsdaten oft leicht nichtlinear sind.

Die Gleichungen 8 und 9 werden grafisch aufgetragen, und die Werte von $K_F^{ads}$ und l/n werden mittels Regressionsanalyse nach der Gleichung 9 berechnet. Der Korrelationskoeffizient $r^2$ der log-Gleichung wird ebenfalls berechnet. Abbildung 2 zeigt ein Beispiel für solche grafischen Darstellungen.

▼B

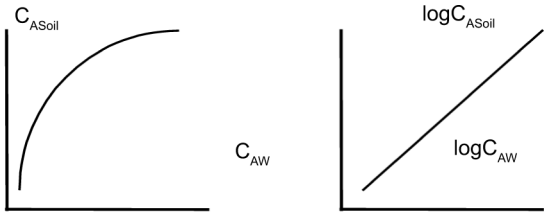



**Abbildung 2:** Freundlich-Adsorptionskurve, normal und linearisiert

2.1.2. **Massenbilanz**

Die Massenbilanz (MB) wird definiert als der Anteil der Substanz, der nach einem Adsorptionstest gegenüber der nominalen Substanzmenge am Beginn des Tests analytisch erhalten werden kann.

Die Behandlung von Daten hängt davon ab, inwieweit das Lösungsmittel vollständig mit Wasser mischbar ist. Im Fall eines wassermischbaren Lösungsmittels kann die unter Punkt „Desorption" beschriebene Behandlung von Daten angewendet werden, um die durch Lösungsmittelextraktion rückgewonnene Substanzmenge zu bestimmen. Ist das Lösungsmittel nicht so gut mit Wasser mischbar, muss die Bestimmung der erhaltenen Menge erfolgen.

Die Massenbilanz MB wird für die Adsorption wie folgt berechnet: Es wird angenommen, dass der Term ($m_E$) der Summe der Massen der Testchemikalien entspricht, die mit einem organischen Lösungsmittel aus dem Boden und von den Oberflächen des Testgefäßes extrahiert wurden:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \ (\%) \qquad (10)$$

Hierin bedeuten:

MB = Massenbilanz ( %)

$m_E$ = Gesamtmasse von aus dem Boden und von Wänden des Testgefäßes in zwei Schritten extrahierter Testsubstanz (μg)

$C_0$ = Anfangsmassenkonzentration der Testlösung in Kontakt mit dem Boden (μg $cm^{-3}$)

$V_{rec}$ = Volumen des nach dem Adsorptionsgleichgewicht erhaltenen Überstandes ($cm^{-3}$).

2.2. DESORPTION

Die Desorption (D) wird als Anteil der unter Testbedingungen desorbierten Testsubstanz bezogen auf die Menge der zuvor adsorbierten Substanz definiert:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

Hierin bedeuten:

$D_{t_i}$ = Desorptionsanteil zum Zeitpunkt $t_i$ ( %)

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = Masse der aus Boden zum Zeitpunkt $t_i$ desorbierten Testsubstanz (µg)

$m_s^{ads}(eq)$ = Masse der bei Adsorptionsgleichgewicht an Boden adsorbierten Testsubstanz (µg)

Detaillierte Angaben zur Vorgehensweise bei der Berechnung des Desorptionsanteils $D_i$ für die Gesamtbeprobungs- und die Aliquotenbeprobungsmethode enthält Anlage 5.

Der Scheindesorptionskoeffizient ($K_{des}$) ist unter den Testbedingungen der Quotient aus dem Gehalt der in der Bodenphase verbleibenden Substanz und der Massenkonzentration der in der wässrigen Lösung desorbierten Substanz bei Erreichen des Desorptionsgleichgewichts:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)\ V_T}{m_{aq}^{des}(eq) \qquad m_{soil}} \ (cm^3\ g^{-1}) \tag{12}$$

Hierin bedeuten:

$K_{des}$ = Desorptionskoeffizient ($cm^3\ g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = Gesamtmasse der bei Desorptionsgleichgewicht aus Boden desorbierten Testsubstanz (µg)

$V_T$ = Gesamtvolumen der wässrigen Phase in Kontakt mit dem Boden während des Desorptionskinetiktests ($cm^3$).

Eine Anleitung zur Berechnung von $m_{aq}^{des}(eq)$ wird in Anlage 5 im Abschnitt „Desorption“ gegeben.

*Hinweis*:

Wurde der vorausgehende Adsorptionstest nach der Gesamtbeprobungsmethode durchgeführt, so gilt: Das Volumen $V_T$ in der Gleichung 12 ist gleich $V_0$.

2.2.1. **Desorptionsisothermen**

Die Freundlich-Desorptionsisothermen-Gleichung setzt den Gehalt der am Boden adsorbiert bleibenden Testsubstanz in Beziehung zur Konzentration der Testsubstanz in Lösung bei Desorptionsgleichgewicht (Gleichung 16).

Für jedes Reagenzglas wird der Gehalt der an Boden bei Desorptionsgleichgewicht adsorbiert bleibenden Substanz wie folgt berechnet:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \ (\mu g\ g^{-1}) \tag{13}$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ wird definiert als:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A \ (\mu g) \tag{14}$$

Hierin bedeuten:

$C_s^{des}(eq)$ = Gehalt der bei Desorptionsgleichgewicht am Boden adsorbiert bleibenden Testsubstanz (µg $g^{-1}$)

$m_m^{des}(eq)$ = analytisch bestimmte Masse Substanz in der wässrigen Phase bei Desorptionsgleichgewicht (µg)

▼B

$m_{aq}^{A}$ = Masse der nach Adsorptionsgleichgewichtseinstellung infolge unvollständigen Volumenaustauschs verbliebenen Testsubstanz (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = Masse der Substanz in der Lösung bei Adsorptionsgleichgewicht (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left( \frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15)$$

$V_r^F$ = Volumen der aus dem Glas zur Messung der Testsubstanz bei Desorptionsgleichgewicht abgenommenen Lösung ($cm^3$)

$V_R$ = Volumen des nach Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts aus dem Glas abgenommenen und durch das gleiche Volumen einer 0,01-M-$CaCl_2$-Lösung ersetzten Überstandes ($cm^3$)

Die Desorptionsgleichung nach Freundlich lautet wie folgt (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g \ g^{-1}) \quad (16)$$

bzw. in der linearen Form:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

Hierin bedeuten:

$K_F^{des}$ = Freundlich-Desorptionskoeffizient

n = Regressionskonstante

$C_{aq}^{des}(eq)$ = Massenkonzentration der Substanz in der wässrigen Phase bei Desorptionsgleichgewicht (μg $cm^{-3}$)

Die Gleichungen 16 und 17 können grafisch aufgetragen werden, und die Werte von $K_F^{des}$ und l/n werden mittels Regressionsanalyse nach der Gleichung 17 berechnet.

*Hinweis*:

Ist der Freundlich-Adsorptions- bzw. Desorptionsexponent l/n gleich 1, so wird die Freundlich-Adsorptions- bzw. Desorptionsbindungskonstante ($K_F^{ads}$ und $K_F^{des}$) gleich der Adsorptions- bzw. der Desorptionsgleichgewichtskonstante ($K_d$ bzw. $K_{des}$) sein, und die Kurven von $C_s$ in Abhängigkeit von $C_{aq}$ werden linear verlaufen. Sind die Exponenten nicht gleich 1, so verlaufen die Kurven $C_s$ in Abhängigkeit von $C_{aq}$ nicht linear, und die Adsorptions- und die Desorptionskonstante werden entlang der Isothermen variieren.

2.2.2. **Testbericht**

Der Testbericht sollte folgende Angaben enthalten:

— vollständige Angaben zu den verwendeten Bodenproben, darunter:

— geografische Angaben zum Standort (Breite, Länge),

— Datum der Probenahme,

▼B

— Einsatzstruktur (z. B. landwirtschaftlich genutzter Boden, Forst usw.),

— Probenahmetiefe,

— Sand-/Schluff-/Tongehalt,

— pH-Werte (in 0,01 M $CaCl_2$),

— organischer Kohlenstoffgehalt,

— organischer Substanzgehalt,

— Stickstoffgehalt,

— C/N-Verhältnis,

— Kationenaustauschkapazität (mmol/kg),

— sämtliche Informationen zur Sammlung und Lagerung von Bodenproben,

— gegebenenfalls alle für die Interpretation der Adsorption/-Desorption der Testsubstanz relevanten Informationen,

— Angaben zu den für die Bestimmung der einzelnen Parameter verwendeten Methoden;

— Informationen zur Testsubstanz, wenn erforderlich;

— Temperatur der Experimente;

— Zentrifugierbedingungen;

— zur Analyse der Testsubstanz herangezogenes analytisches Verfahren;

— Begründung der eventuellen Verwendung eines Solubilisierungsmittels bei der Herstellung der Vorratslösung der Testsubstanz;

— Erläuterung zu Korrekturen an den Berechnungen, falls relevant;

— Daten gemäß Formular (Anlage 6) und grafische Darstellungen;

— sämtliche Informationen und Beobachtungen, die für die Auslegung der Testergebnisse hilfreich sind.

3. **LITERATURANGABEN**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L. (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection. Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme. Final Report of the OECD Workshop on Selection of Solls/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines. Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 16 3-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention. Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/ Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048. April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant ($K_{oc}$) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R. (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils“, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R. (1980), „Adsorption-Desorption Phenomena“ in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, 83-122.

(14) Hasset J. J. and Banwart W.L. (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments“ in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, 31-44.

(15) Van Genuchten M. Th., Davidson J. M. and Wierenga P. J. (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media“. Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 29-35.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L. and Dishburger H. J. (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis“, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M., Porter P. E. and Schieferrstein R. H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil“. Weeds, 1 3, 185-190.

(18) Rhodes R. C, Belasco I. J., and Pease H. L, (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils“. J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.

(19) Russell M. H. (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil“ in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides“, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

▼B

(21) Guth J. A., Burkhard N. and D. O. Eberle (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils“. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L and Osgerby J. M. (1967), „Persistence of herbicides in soil“. J. Sci. Fd Agric, 18, 269-273.

(23) Burkhard N. and Guth J. A. (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption“. Pestic. Sci. 12, 45-52.

(24) Guth J. A., Gerber H. R. and Schlaepfer T. (1977), „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides“. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.

(25) Osgerby J. M. (1973), „Process affecting herbicide action in soil“. Pestic. Sci., 4, 247-258.

(26) Guth J. A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden“. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 143-154.

(27) Hamaker J. W. (1975), „The interpretation of soil leaching experiments“, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), 135-172. Plenum Press, NY.

(28) Helling C. S. (1971), „Pesticide mobility in soils“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, 732-210.

(29) Hamaker J. W. (1972), „Diffusion and volatilization“ in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A. (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system“. Pestic. Sci. 12, 37-44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M, Carsel R.F. and Enfield C.G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability“. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 339-357.

(33) Leistra M. and Dekkers W. A. (1976), „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils“. J. of Soil Sci., 28, 340-350.

(34) Bromilov R. H. and Leistra M. (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils“. Pest. Sci., 11, 389-395.

(35) Green R. E. and Karickoff S. W., (1990), „Sorption estimates for modeling“, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. h.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, 80-101.

(36) Lambert S. M. (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure“. J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.

▼B

(37) Hance R. J. (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils“.). Agri. Food Chem., 17, 667-668.

(38) Briggs G. G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils“. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor“. J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.

(40) Sabljic A. (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology“. J. Agric. Food Chem., 32, 243-246.

(41) Bailey G. W. and White J. L. (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption and movement of pesticides in soil“. Residue Rev., 32, 29-92.

(42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg. (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32, 222-234.

(43) Karickhoff S. W. (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere 10, 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B. (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners“. Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.

(45) Hamaker J. W. and Thompson J. M. (1972), „Adsorption in organic chemicals“ in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, 49-143.

(46) Deli J. and Warren G. F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils“. Weed Sci. 19, 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils“. Weed Science, Vol. 23, 454-457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M. and Thompson J. M. (1968), „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations“ in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B. and Deangelis R. J. (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase“, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects: chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F. and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L, Ensminger L. E. and Clark F. E., eds., „Methods of Soil Analysis“, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) 1SO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Pan 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E. and Yamane V. K. (1970), „Precision in pesticide adsorption measurements“. Soil Sci. Am. Proc, 34, 353-354.

(60) Grover R. and Hance R. J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine“. Soil Sci., 109-138.

(61) Boesten, J. J. T. I, „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system“. Pest. Sci. 1990, 30, 31-41.

(62) Boesten, J. J. T. I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106“. Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulator)' aspects, Brussels, 26-29. April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J. M. et Coste C. (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique“. Weed Res. 21, 227-231.

(64) Brown D. S. and Flagg E. W. (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments“. J. Environ.Qual, 10(3), 382-386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water“. Environ. Sci. Technol., 17(4), 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U. (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments“. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), 297-312.

(67) Vowles P. D. and Mantoura R. F. C. (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons“. Chemosphere, 16(1), 109-116.

(68) Lyman W. J. , Reehl W. F. and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota“ in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), 78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds“. Science, Vol. 206, 831-832.

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G. and Means J. C. (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption“. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 38-42.

(72) Karickhoff S. W. (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere, Vol. 10(8), 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilite-reactivité“. Revue de l'Agric, 34 (4), 319-322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil“. Chemosphere, 32(12), 2493-2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995). „HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test“. Chemosphere 30 (7), 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases“. Chemosphere 27 (12), 2341-2352.

(77) Hance, R. J. (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides“. Weed Research, Vol. 7, 29-36.

(78) Koskinen W. C and Harper S. S. (1990), „The retention processes: mechanisms“ in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. h.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F. and Enfield C. G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, 297-325, ACS Symp. Ser, 259, American Chemical Society, Washington DC.

(80) Giles C. H. (1970), „Interpretation and use of Sorption isotherms“ in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograf No. 37, 14-32.

(81) Giles C. H., McEwan J. H., Nakhwa S.N. and Smith D. (1960), „Studies in adsorption: XI. A System of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils“. J. Chem. Soc, 3973-93.

(82) Calvet R., Terce M. and Arvien J. C. (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caracteristiques générales de l'adsorption“. Ann. Agron. 31, 239-251.

(83) Bedbur E. (1996), Anomalies in the Freundlich equation', Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

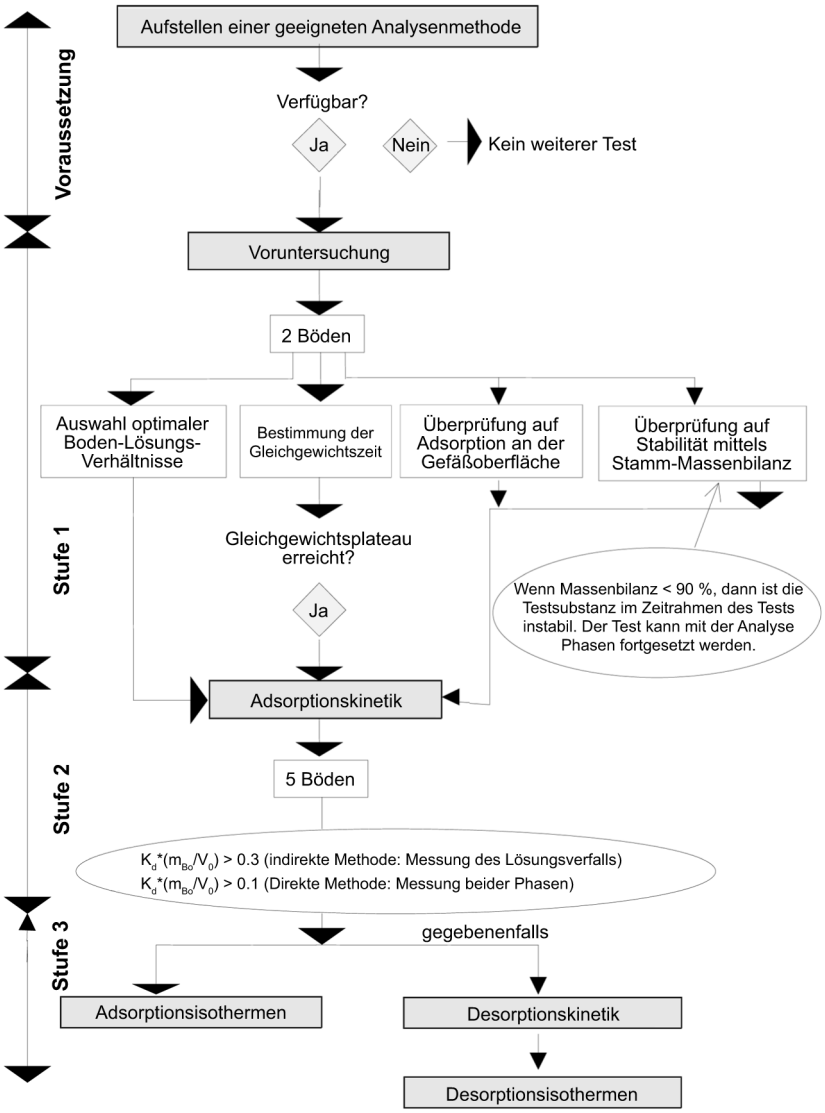
(84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption“, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO Systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

▼B

*Anlage 1*

**Testplan**



▼B

*Anlage 2*

**EINFLUSS DER GENAUIGKEIT DER ANALYSENMETHODE UND DER KONZENTRATIONSVERÄNDERUNG AUF DIE GENAUIGKEIT VON ADSORPTIONSERGEBNISSEN**

Wie die nachstehende Tabelle (84) verdeutlicht, führt dann, wenn die Differenz zwischen der Anfangsmasse ($m_0$ = 110 µg) und der Gleichgewichtsmasse ($m_{aq}^{ads}(eq)$) der Testsubstanz sehr gering ist, eine Abweichung von 5 % bei der Messung der Gleichgewichtskonzentration zu einer Abweichung von 50 % bei der Berechnung des Gehalts der an Boden adsorbierten Substanz ($m_s^{ads}(eq)$) und von 52,4 % bei der Berechnung von $K_d$.

Menge des Bodens $m_{Boden}$ = 10 g

Volumen der Lösung $V_0$ = 100 $cm^3$

| | $m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg) | $C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg $cm^{-3}$) | R | $m_s^{ads}(eq)$* (µg) | $C_s^{ads}(eq)$* (µg $g^1$) | R‡ | $K_d$* | R‡ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **FÜR A = 9 %** | | | | | | | |
| $m_0$ = 110 µg oder $C_0$ = 1 100 µg/$cm^3$ | 100 | 1,000 | wahrer Wert | 10 | 1,00 | wahrer Wert | 1 | |
| | 101 | 1,010 | 1 % | 9 | 0,90 | 10 % | 0,891 | 10,9 % |
| | 105 | 1,050 | 5 % | 5 | 0,50 | 50 % | 0,476 | 52,4 % |
| | 109 | 1,090 | 9 % | 1 | 0,10 | 90 % | 0,092 | 90,8 % |
| | **FÜR A = 55 %** | | | | | | | |
| $m_0$ = 110 µg oder $C_0$ = 1 100 µg/$cm^3$ | 50,0 | 0,500 | wahrer Wert | 6,00 | 6,00 | wahrer Wert | 12,00 | |
| | 50,5 | 0,505 | 1 % | 59,5 | 5,95 | 0,8 % | 1,78 | 1,8 % |
| | 52,5 | 0,525 | 5 % | 57,5 | 5,75 | 4,0 % | 10,95 | 8,8 % |
| | 55,0 | 0,550 | 10 % | 55,0 | 5,50 | 8,3 % | 10,00 | 16,7 % |
| | **FÜR A = 99 %** | | | | | | | |
| $m_0$ = 110 µg oder $C_0$ = 1 100 µg/$cm^3$ | 1,100 | 0,011 | wahrer Wert | 108,9 | 10,89 | wahrer Wert | 990 | |
| | 1,111 | 0,01111 | 1 % | 108,889 | 10,8889 | 0,01 % | 980 | 1,0 % |
| | 1,155 | 0,01155 | 9 % | 108,845 | 10,8845 | 0,05 % | 942 | 4,8 % |
| | 1,21 | 0,0121 | 10 % | 108,790 | 10,8790 | 0,10 % | 899 | 9,2 % |

Hierin bedeuten:

$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq),\ C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{soil}} \cdot Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$

$m_s^{ads}(eq)$ = Masse der Testsubstanz in der Bodenphase bei Gleichgewicht, µg;

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = Masse der Testsubstanz in der wässrigen Phase bei Gleichgewicht, µg;

$C_s^{ads}(eq)$ = Gehalt der Testsubstanz in der Bodenphase bei Gleichgewicht, µg $g^{-1}$;

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = Massenkonzentration der Testsubstanz in der wässrigen Phase bei Gleichgewicht, µg $cm^{-3}$;

R = Analysenfehler bei der Bestimmung der $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = rechnerische Abweichung als Folge des Analysenfehlers R.

▼B

*Anlage 3*

## ABSCHÄTZUNGSVERFAHREN FÜR $K_d$

1. Abschätzungsverfahren gestatten eine Vorhersage von $K_d$ ausgehend von Korrelationen mit beispielsweise $P_{ow}$-Werten (12) (39) (63-68), Wasserlöslichkeitsdaten (12) (19) (21) (39) (68-73) oder Polaritätsdaten, die mittels Anwendung von HPLC auf die entgegengesetzte Phase erhalten wurden (74-76). Wie aus den Tabellen 1 und 2 hervorgeht, ist der $K_{oc}$ bzw. $K_{om}$ der nach diesen Gleichungen berechnete und dann — indirekt — der $K_d$ aus den Gleichungen:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

2. Das Konzept dieser Korrelationen stützt sich auf zwei Annahmen: (1) Der größte Einfluss auf die Adsorption einer Substanz geht von den organischen Substanzen des Bodens aus, und (2) die beteiligten Wechselbeziehungen verlaufen überwiegend nichtpolar. Daraus folgt, dass diese Korrelationen (1) nicht oder nur in gewissem Umfang auf polare Substanzen anwendbar sind und (2) nicht anwendbar sind, wenn der organische Substanzgehalt des Bodens sehr klein ist (12). Darüber hinaus sind zwar zufrieden stellende Korrelationen zwischen $P_{ow}$ und Adsorption (19) festgestellt worden, doch für die Beziehung zwischen der Wasserlöslichkeit und dem Umfang der Adsorption ist dies nicht der Fall (19) (21): in diesem Punkt kommen die Studien zu äußerst widersprüchlichen Aussagen.

3. Beispielhafte Korrelationen zwischen dem Adsorptionskoeffizienten und dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten sowie die Wasserlöslichkeit sind in Tabelle 1 bzw. 2 aufgeführt.

*Tabelle 1.*

**Beispielhafte Korrelationen zwischen dem Adsorptionsverteilungskoeffizienten und dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten; weitere Beispiele siehe (12) (68).**

| Substanzen | Korrelationen | Verfasser |
|---|---|---|
| Substituierte Harnstoffe | $\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$ | Briggs (1981) (39) |
| Aromatische chlorierte Substanzen | $\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$ | Chiou *et al*. (198 3) (6 5) |
| Verschiedene Pestizide | $\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$ | Gerstl und Mingelgrin (1984) (66) |
| Aromatische Kohlenwasserstoffe | $\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$ | Vowles und Mantoura (1987) (67) |

*Tabelle 2.*

**Beispielhafte Korrelationen zwischen dem Adsorptionsverteilungskoeffizienten und der Wasserlöslichkeit: weitere Beispiele siehe (68) (69).**

| Verbindungen | Korrelationen | Verfasser |
|---|---|---|
| Verschiedene Pestizide | $\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$ | Gerstl und Mingelgrin (1984) (66) |
| Aliphatische, aromatische chlorierte Substanzen | $\log K_{om} = (4,040 +/- 0,038) - (0,557 +/- 0,012) \log S_w$ | Chiou *et al*. (1979) (70) |
| a-Naphtol | $\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$ | Hasset et al. (1981) (71) |
| Cyclische, aliphatische aromatische Substanzen | $\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953$ (mp–25) | Karickhoff (1981) (72) |
| Verschiedene Verbindungen | $\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$ | Moreale van Blade (1982) (73) |

▼B

*Anlage 4*

**BERECHNUNGEN ZUR FESTLEGUNG DER ZENTRIFUGATIONS-BEDINGUNGEN**

1. Die Zentrifugationszeit ergibt sich nach der folgenden Formel, wobei kugelförmige Partikel angenommen werden:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Zur Vereinfachung sind alle Parameter in Nicht-SI-Einheiten beschrieben (g, cm).

Hierin bedeuten:

$\omega$ = die Drehzahl (= 2 π Upm/60), rad $s^{-1}$;

rpm = Umdrehungen pro Minute;

$\eta$ = Viskosität der Lösung, g $s^{-1}$ $cm^{-1}$;

$r_p$ = Partikelradius, cm;

$\rho_s$ = Lösungsdichte, g $cm^{-3}$;

$\rho_{aq}$ = solution density, g $cm^{-3}$;

$R_t$ = Abstand vom Zentrum des Zentrifugenrotors zum oberen Ende der Lösung im Zentrifugenglas, cm;

$R_b$ = Abstand vom Zentrum des Zentrifugenrotors zum unteren Ende des Zentrifugenglases, cm;

$R_b$-$R_t$ = Länge des Boden-Lösungs-Gemischs im Zentrifugenrohr

In der Praxis wird zur Gewährleistung einer vollständigen Trennung üblicherweise das Doppelte der berechneten Zeiten angesetzt.

2. Die Gleichung 1 kann noch weiter vereinfacht werden, wenn man die Viskosität ($\eta$) und die Dichte ($\rho_{aq}$) der Lösung gleich der Viskosität und der Dichte von Wasser bei 25 °C setzt. Daraus folgt $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g $s^{-1}$ $cm^{-1}$ und $\rho_{aq} = 1{,}0$ g.$cm^{-3}$.

Daraus ergibt sich die Zentrifugationszeit nach folgender Gleichung (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho_s - 1)} \ln\frac{Rb}{Rt} \quad (2)$$

3. Aus Gleichung 2 wird ersichtlich, dass für die Festlegung der Zentrifugationsbedingungen, d. h. Zeit (t) und Geschwindigkeit (Upm), zwei Parameter von Bedeutung sind, um die Abtrennung von Partikeln mit einer bestimmten Größe zu erreichen (in unserem Fall 0,1 um Radius); (1) die Dichte des Bodens und (2) die Länge des Gemischs im Zentrifugenglas ($R_b$–$R_t$), d. h. der Abstand, den ein Bodenpartikel vom oberen Ende der Lösung zum unteren Ende des Glases abdeckt; offenkundig hängt bei einem feststehenden Volumen die Länge des Gemischs im Glas vom Quadrat des Radius des Glases ab.

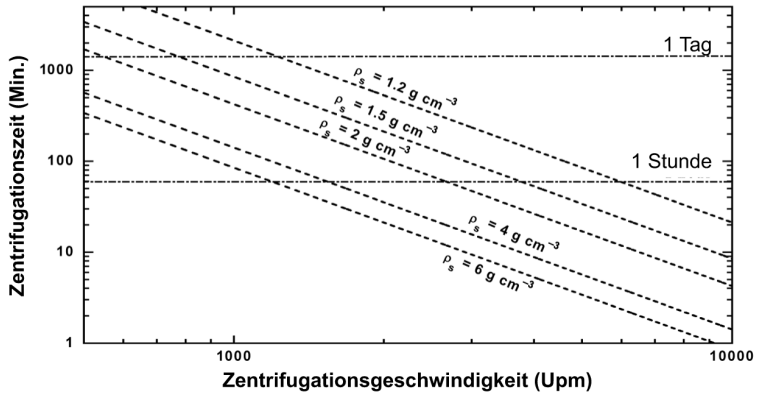
4. in Abb. 1 sind verschiedene Zentrifugationszeiten (t) in Abhängigkeit von der Zentrifugiergeschwindigkeit (Upm) für unterschiedliche Bodendichten ($\rho_s$) (Abb. 1a) und unterschiedliche Längen des Gemischs in den Zentrifugengläsern (Abb. 2a) dargestellt. Aus Abb. 1a geht der klare Einfluss der Bodendichte hervor. So beträgt die Zentrifugationszeit bei einer herkömmlichen Zentrifugation von 3 000 Upm für 1,2 g $cm^3$ Bodendichte annähernd 240 min, bei 2,0 g $cm^3$ hingegen nur 50 min. Ebenso lässt sich an Abb. 1b ablesen, dass die Zentrifugationszeit für eine Länge des Gemischs von 10 cm etwa 50 min beträgt, bei einer Länge von 1 cm dagegen nur 7 min. In jedem Fall kommt es darauf an, ein optimales Verhältnis zwischen Zentrifugation, die die kleinstmögliche Länge erfordert, und einer einfachen Handhabung für den Experimentator bei der Abtrennung der Phase nach der Zentrifugation zu finden.

▼B

5. Darüber hinaus muss bei der Festlegung der Versuchsbedingungen für die Trennung von Boden/Lösung-Phasen vor allem das mögliche Vorhandensein einer dritten „Pseudophase“, der Kolloide, in Betracht gezogen werden. Diese Partikel, deren Größe unter 0,2 μm liegt, können einen erheblichen Einfluss auf den gesamten Adsorptionsmechanismus einer Substanz in einer Bodensuspension ausüben. Wird die Zentrifugation wie vorstehend beschrieben durchgeführt, verbleiben Kolloide in der wässrigen Phase und werden gemeinsam mit der wässrigen Phase analysiert. Dadurch gehen die Informationen über ihren Einfluss verloren.

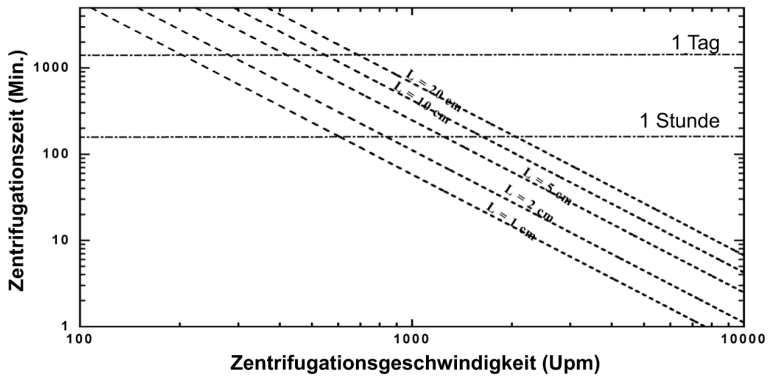
   Verfügt das ausführende Labor über Ultrazentrifugier- oder Ultrafiltriereinrichtungen, könnte die Adsorption/Desorption einer Substanz in Boden eingehender untersucht werden, z. B. die Adsorption der Substanz an den Kolloiden. In diesem Fall sollte eine Ultrazentrifugation von 60 000 Upm/-min bzw. eine Ultrafiltration mit einer Filterporosität von 100 000 Dalton zur Anwendung kommen, um die drei Phasen Boden, Kolloide und Lösung zu trennen. Das Testprotokoll sollte ebenfalls entsprechend modifiziert werden, damit alle drei Phasen einer Substanzanalyse unterzogen werden.

**Abb. 1a.**




Variationen der Zentrifugationszeit (t) in Abhängigkeit von der Zentrifugiergeschwindigkeit (Upm) für unterschiedliche Bodendichten ($\rho_s$). $R_t$ = 10 cm, $R_b$–$R_t$ = 10 cm, $\eta$ = 8,95 × $10^{-3}$ g $s^{-1}$ $cm^{-1}$ und $\rho_{aq}$ = 1,0 g $cm^{-3}$ und 25 °C.

**Abb. 1b.**



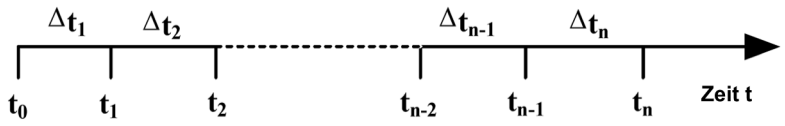

Variationen der Zentrifugationszeit (t) in Abhängigkeit von der Zentrifugiergeschwindigkeit (Upm) für unterschiedliche Längen des Gemischs im Zentrifugenglas ($R_b$–$R_t$) = L; $R_t$ = 10 cm, $\eta$ = 8,95 × $10^{-3}$ g $s^{-1}$ $cm^{-1}$, $\rho_{aq}$ = 1,0 g $cm^{-3}$ at 25 °C und $\rho_s$ = 2,0 g $cm^{-3}$.

▼B

*Anlage 5*

**BERECHNUNG VON ADSORPTION A ( %) UND DESORPTION D ( %)**

Die Zeitplanung des Ablaufs sieht wie folgt aus:




Für alle Berechnungen wird angenommen, dass die Testsubstanz stabil ist und nicht signifikant an den Behälterwänden adsorbiert.

ADSORPTION A (A %)

a) *Gesamtbeprobungsmethode*

Der Adsorptionsanteil wird für jedes Reagenzglas (i) zu jedem Zeitpunkt ($t_i$) nach folgender Gleichung berechnet:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Die Tenne dieser Gleichung lassen sich wie folgt berechnen:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

Hierin bedeuten:

$A_{t_i}$ = Adsorptionsanteil ( %) zum Zeitpunkt $t_i$;

$m_s^{ads}(t_i)$ = Masse der Testsubstanz an Boden zum Zeitpunkt $t_i$, an dem die Analyse durchgeführt wird (µg);

$m_0$ = Masse Testsubstanz im Reagenzglas zu Beginn des Tests (µg):

$C_0$ = Anfangsmassenkonzentration der Testlösung in Kontakt mit dem Boden (µg $cm^{-3}$):

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = Massenkonzentration der Substanz in der wässrigen Phase zur Zeit $t_i$, zu der die Analyse durchgeführt wird (µg $cm^{-3}$); diese Konzentration wird analytisch unter Berücksichtigung der anhand der Leerproben gewonnenen Werte bestimmt.

$V_0$ = Anfangsvolumen der Testlösung in Kontakt mit dem Boden ($cm^3$).

Die Werte des Adsorptionsanteils $A_{t_i}$ bzw. $C_{aq}^{ads}(t_i)$ werden grafisch in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen, und die Zeit, nach der das Sorptionsgleichgewicht erreicht ist, wird bestimmt. Beispiele für solche grafischen Darstellungen sind die Abb. 1 und 2.

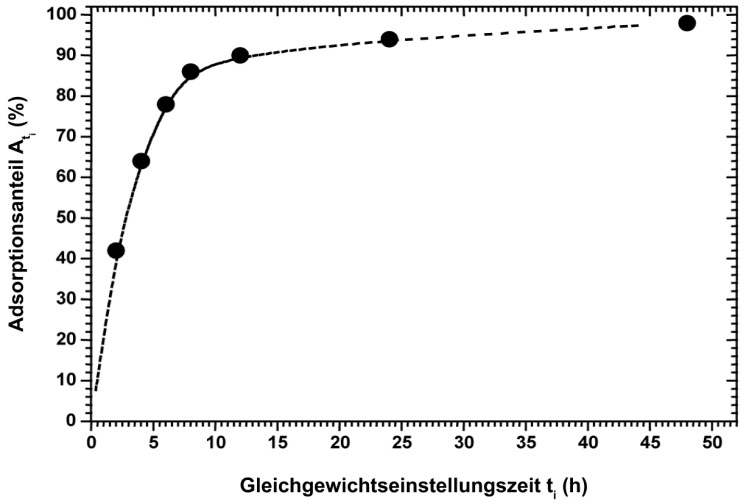



**Abb. 1.**

Grafische Darstellung eines Adsorptionsgleichgewichts

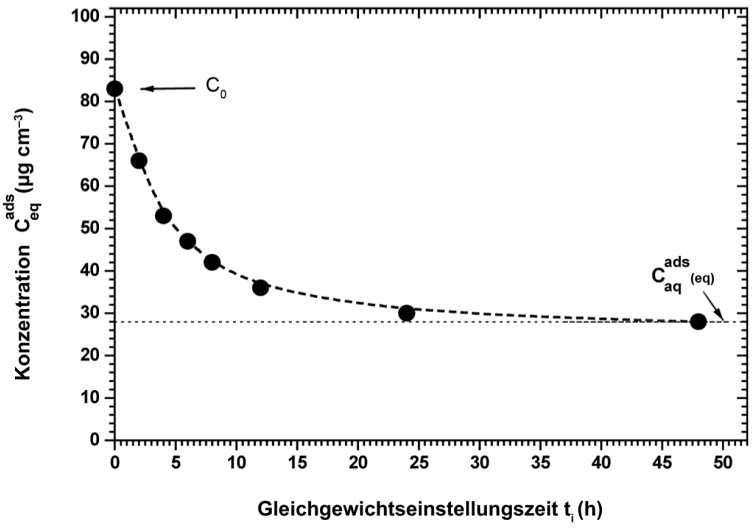



**Abb. 2.**

Massenkonzentration der Testsubstanz in der wässrigen Phase ($C_{aq}$) in Abhängigkeit von der Zeit

(1) Gleichungen sowohl auf die direkte als auch auf die indirekte Methode anwendbar. Alle anderen Gleichungen gelten nur für die indirekte Methode.

▼B

b) *Aliquotenbeprobungsmethode*

Bei den folgenden Gleichungen wird in Rechnung gestellt, dass die Adsorptionsprozedur durch Messungen der Testsubstanz in kleinen Aliquoten der wässrigen Phase in bestimmten Zeitintervallen ausgeführt wird.

— Während jedes Zeitintervalls wird die Menge der am Boden adsorbierten Substanz wie folgt berechnet:

— für das erste Zeitintervall $\Delta t_i = t_i - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left( \frac{V_0}{v_a^A} \right) \tag{4}$$

— für das zweite Zeitintervall $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left( \frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \tag{5}$$

— für das dritte Zeitintervall $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left( \frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \tag{6}$$

— für das $n^{te}$ Zeitintervall $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left( \frac{\left( V_0 - (n-1) \cdot v_a^A \right)}{v_a^A} \right) \tag{7}$$

— Der Adsorptionsanteil in jedem Zeitintervall, $A_{\Delta t_i}$ wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \tag{8}$$

wohingegen der Adsorptionsanteil ($(A_{t_i})$) zu einem Zeitpunkt $t_i$ nach folgender Gleichung erhalten wird:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \tag{9}$$

Die Werte der Adsorption $A_{t_i}$ bzw. $A_{\Delta t_i}$ (in Bezug auf die Anforderungen der Untersuchung) werden grafisch in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen, und die Zeit, nach der das Sorptionsgleichgewicht eingestellt ist, wird bestimmt.

— Nach der Gleichgewichtszeit $t_{eq}$:

— ist die Masse der am Boden adsorbierten Testsubstanz:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \tag{10}$$

▼B

— ist die Masse der Testsubstanz in der Lösung:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— und ist der Adsorptionsanteil bei Gleichgewicht:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Die vorstehend verwendeten Parameter werden wie folgt definiert:

$m_s^{ads}(\Delta t_1),\ m_s^{ads}(\Delta t_2),\ ...,\ m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = Masse der am Boden während der Zeitintervalle $\Delta t_1$, $\Delta t_2$, ..., $\Delta t_n$ adsorbierten Substanz (µg);

$m_m^{ads}(t_1),\ m_m^{ads}(t_2),\ ...,\ m_n^{ads}(t_n)$ = Masse der in einer Aliquote $v_a{}^A$ zu den Zeitpunkten $t_1$, $t_2$, ..., $t_n$ gemessenen Substanz (µg);

$m_s^{ads}(eq)$ = Masse der am Boden bei Adsorptionsgleichgewicht adsorbierten Substanz (µg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = Masse der Substanz in der Lösung bei Adsorptionsgleichgewicht (µg):

$v_a^A$ = Volumen der Aliquote, in der die Testsubstanz gemessen wird ($cm^3$);

$A_{\Delta t_i}$ = Adsorptionsanteil bei Adsorptionsgleichgewicht ( %).

$A_{eq}$ = entsprechender Adsorptionsanteil in einem Zeitintervall $\Delta t_i$ ( %);

(1) Gleichungen sowohl auf die direkte als auch auf die indirekte Methode anwendbar. Alle anderen Gleichungen gelten nur für die indirekte Methode.

DESORPTION D ( %)

Als die Zeit $t_0$, bei der das Desorptionskinetikexperiment beginnt, gilt der Augenblick, in dem das höchste erhaltene Volumen der Testsubstanzlösung (nach Einstellen des Adsorptionsgleichgewichts) durch ein identisches Volumen 0,01 M $CaCl_2$-Lösung ersetzt wird.

a) *Gesamtbeprobungsmethode*

Zu einem Zeitpunkt $t_i$ wird die Masse der Testsubstanz in der wässrigen Phase gemessen, die aus dem Glas i ($V_r^i$) abgenommen wurde, und die desorbierte Masse wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left( \frac{V_0}{v_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

ei Desorptionsgleichgewicht ist $t_i = t_{eq}$ und folglich ist $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

Die Masse der während eines Zeitintervalls ($\Delta t_i$) desorbierten Testsubstanz wird durch folgende Gleichung erhalten:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Die Berechnung des Desorptionsanteils erfolgt:

zu einem Zeitpunkt $t_i$ aus der Gleichung:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{15}$$

und während eines Zeitintervalls ($\Delta t_i$) aus der Gleichung:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{16}$$

Hierin bedeuten:

$D_{t_i}$ = Desorptionsanteil zu einem Zeitpunkt $t_i$ ( %);

$D_{\Delta t_i}$ = Desorptionsanteil entsprechend einem Zeitintervall $\Delta t_i$ ( %);

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = Masse der zu einem Zeitpunkt $t_i$ desorbierten Testsubstanz (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = Masse der während eines Zeitintervalls $\Delta t_i$ desorbierten Testsubstanz (μg):

$m_m^{des}(t_i)$ = Masse der zu einem Zeitpunkt $t_i$ in einem Lösungsvolumen $V_r^i$ analytisch gemessenen Testsubstanz, die zur Analyse abgenommen wird (μg);

$m_{aq}^{A}$ = Masse der nach Adsorptionsgleichgewichtseinstellung infolge unvollständigen Volumenaustauschs verbleibenden Testsubstanz (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \tag{17}$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = Masse der Testsubstanz in der Lösung bei Adsorptionsgleichgewicht (μg);

$V_R$ = Volumen des nach Erreichen des Adsorptionsgleichgewichts aus dem Glas abgenommenen und durch ein identisches Volumen 0,01 M $CaCl_2$-Lösung ersetzten Überstandes ($cm^3$);

$V_r^{\ i}$ = Volumen der im Desorptionskinetikversuch aus dem Glas (i) zur Messung der Testsubstanz abgenommenen Lösung ($cm^3$).

Die Desorptionswerte $D_{t^i}$ bzw. $D_{\Delta t^i}$ (gemäß den Anforderungen der Untersuchung) werden grafisch in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen, und die Zeit, nach der das Desorptionsgleichgewicht erreicht wird, wird bestimmt.

b) *Aliquotenbeprobungsmethode*

Bei den nachstehenden Gleichungen wird in Rechnung gestellt, dass die zuvor ausgeführte Adsorptionsprozedur mittels Messung der Testsubstanz in kleinen Aliquoten $\left(v_a^A\right)$ der wässrigen Phase (Aliquotenbeprobungsmethode siehe 1.9 „Durchführung des Tests“) ausgeführt wurde. Es wird angenommen, dass a) das Volumen des aus dem Glas nach dem Adsorptionskinetikversuch abgenommenen Überstands durch ein identisches Volumen 0,01 M $CaCl_2$-Lösung ($V_R$) ersetzt wurde, und dass b) das Gesamtvolumen der wässrigen Phase in Kontakt mit dem Boden ($V_T$) während des Desorptionskinetikversuchs konstant bleibt und nach folgender Gleichung erhalten wird:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

▼B

Zu einem Zeitpunkt $t_i$:

— Die Masse der Testsubstanz wird in einer kleinen Aliquote $\left(v_a^D\right)$ gemessen, und die desorbierte Masse wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \tag{19}$$

— Bei Desorptionsgleichgewicht ist $t_i = t_{eq}$ und folglich ist $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— Der Desorptionsanteil $D_{t_i}$ wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{20}$$

In einem Zeitintervall ($\Delta t_i$):

Während jedes Zeitintervalls wird die Menge der desorbierten Substanz wie folgt berechnet:

— für das erste Zeitintervall $\Delta t_1 = t_1\text{-}t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \quad \text{and} \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \tag{21}$$

— für das zweite Zeitintervall $\Delta t_2 = t_2\text{-}t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) \text{ und}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \tag{22}$$

— für das $n^{th}$ Zeitintervall $\Delta t_n = t_n\text{-}t_{n\text{-}1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,\, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \text{ und}$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \tag{23}$$

Abschließend wird der Desorptionsanteil für jedes Zeitintervall, $D_{\Delta t_i}$, nach folgender Gleichung berechnet:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{24}$$

wobei der Desorptionsanteil $D_{t_i}$ zu einem Zeitpunkt $t_i$ durch folgende Gleichung erhalten wird:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{25}$$

▼B

abei werden die vorstehend eingesetzten Parameter wie folgt definiert:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = Masse der nach den Zeitintervallen $\Delta t_i$, $\Delta t_2$, …, $\Delta t_n$ am Boden adsorbiert bleibenden Substanz (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = Masse der während der Zeitintervalle $\Delta t_1$ $\Delta t_2$, ... bzw. $\Delta t_n$ desorbierten Substanz (μg);

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = Masse der in einer Aliquote (($v^D{}_a$) zu den Zeitpunkten $t_1$, $t_2$, ... bzw. $t_n$, gemessenen Substanz (μg);

$V_T$ = Gesamtvolumen der wässrigen Phase in Kontakt mit dem Boden während des nach der Aliquotenbeprobungsmethode durchgeführten Desorptionskinetikversuchs ($cm^3$);

$m_{aq}^A$ = Masse der nach Adsorptionsgleichgewichtseinstellung infolge unvollständigen Volumenaustauschs verbliebenen Testsubstanz (μg);

$$m_{aq}^A = \left( \frac{\left( V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left( V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}\,(eq) \qquad (26)$$

$V_R$ = Volumen des aus dem Glas nach Einstellen des Adsorptionsgleichgewichts abgenommenen und durch das identische Volumen 0,01 M $CaCl_2$-Lösung ersetzten Überstands ($cm^3$);

$v_a^D$ = Volumen der während des nach der Aliquotenbeprobungsmethode durchgeführten Desorptionskinetikversuchs als Probe zu Analysenzwecken aus dem Glas abgenommenen Aliquote (i) ($cm^3$);

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

*Anlage 6*

**ADSORPTION-DESORPTION IN BÖDEN: DATENBERICHTSFORMULARE**

Getestete Substanz:

Getesteter Boden:

Trockenmassegehalt des Bodens (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

**Eignung der Analysenmethode**

| | | |
|---|---|---|
| Bodeneinwaage | g | |
| Boden: Trockenmasse | g | |
| Volumen $CaCl_2$-Lösung | $cm^3$ | |
| Nennkonzentration fertige Lösung | µg $cm^{-3}$ | |
| Analysenkonzentration fertige Lösung | µg $cm^{-3}$ | |

Prinzip der zugrunde liegenden Analysenmethode:

Kalibrierung der Analysenmethode:

Getestete Substanz:

Getesteter Boden:

Trockenmassegehalt des Bodens (105 °C, 12h): ..... %

Temperatur: ..... °C

Zugrundeliegende Analysenmethodik: Indirekt ☐ Gesamt ☐ Aliquoten ☐ Direkt ☐

**Adsorptionstest: Testproben**

| | Symbol | Einheiten | Gleichgewichts-einstellungszeit | | Gleichgewichts-einstellungszeit | | Gleichgewichts-einstellungszeit | | Gleichgewichts-einstellungszeit | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glas Nr. | | | | | | | | | | |
| Bodeneinwaage | — | g | | | | | | | | |
| Boden: Trockenmasse | $m_{Boden}$ | g | | | | | | | | |
| Wasservolumen in Bodeneinwaage (rechnerisch) | $V_{ws}$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Volumen 0,01 M $CaCl_2$-Lösung zur Gleichgewichtseinstellung des Bodens | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Volumen Vorratslösung | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Gesamtvolumen wässrige Phase in Kontakt mit Boden | $V_0$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Anfangskonzentration Testlösung | $C_0$ | µg $cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Masse Testsubstanz bei Beginn des Tests | $m_0$ | µg | | | | | | | | |

▼B

| | Symbol | Einheiten | Gleichgewichts-einstellungszeit | | Gleichgewichts-einstellungszeit | | Gleichgewichts-einstellungszeit | | Gleichgewichts-einstellungszeit | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nach Schütteln und Zentrifugieren** | | | | | | | | | | |
| INDIREKTE METHODE | | | | | | | | | | |
| Gesamtbeprobungsmethode | | | | | | | | | | |
| Konzentration Testsubstanz wässrige Phase, Leerkorrektur berücksichtigt | $C_{aq}^{ads}(t_i)$ | µg $cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Aliquotenbeprobungsmethode | | | | | | | | | | |
| Gemessene Masse Testsubstanz in der Aliquote $V_a^A$ | $m_m^{ads}(t_i)$ | µg | | | | | | | | |
| DIREKTMETHODE | | | | | | | | | | |
| Masse der an Boden adsorbierten Testsubstanz | $m_s^{ads}(t_i)$ | µg | | | | | | | | |
| Adsorptionsberechnung | | | | | | | | | | |
| Adsorption | $A_{t_i}$ | % | | | | | | | | |
| | $A_{\Delta t_i}$ | % | | | | | | | | |
| Mittel | | | | | | | | | | |
| Adsorptionskoeffizient | $K_d$ | $cm^3$ $g^{-1}$ | | | | | | | | |
| Mittel | | | | | | | | | | |
| Adsorptionskoeffizient | $K_{oc}$ | $cm^3$ $g^{-1}$ | | | | | | | | |
| Mittel | | | | | | | | | | |

Getestete Substanz:

Getesteter Boden:

Trockenmassegehalt des Bodens (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

**Adsorptionstest: Leer- und Kontrollwerte**

| | Symbol | Einheiten | Leerwert | | Leerwert | | Kontrollwert | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glas Nr. | | | | | | | | |
| Bodeneinwaage | | g | | | | | 0 | 0 |
| Wassermenge in Bodeneinwaage (rechnerisch) | | $cm^3$ | | | | | — | — |
| Volumen zugesetzter 0,01 M $CaCl_2$-Lösung | | $cm^3$ | | | | | | |
| Volumen der zugesetzten Vorratslösung der Testsubstanz | | $cm^3$ | 0 | 0 | | | | |
| Gesamtvolumen wässriger Phase (rechnerisch) | | $cm^3$ | | | | | — | — |

▼B

| | Symbol | Einheiten | Leerwert | | Leerwert | | Kontrollwert | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Anfangskonzentration der Testsubstanz in wässriger Phase | | µg $cm^{-3}$ | | | | | | |
| **Nach Schütteln und Zentrifugieren** | | | | | | | | |
| Konzentration in wässriger Phase | | µg $cm^{-3}$ | | | | | | |

Hinweis: Falls erforderlich, können weitere Spalten angefügt werden.

Getestete Substanz:

Getesteter Boden:

Trockenmassegehalt des Bodens (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

**Massenbilanz**

| | Symbol | Einheiten | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Glas Nr. | | | | | | |
| Bodeneinwaage | — | g | | | | |
| Boden: Trockenmasse | $m_{Boden}$ | g | | | | |
| Wasservolumen in Bodeneinwaage (rechnerisch) | $V_{ws}$ | ml | | | | |
| Volumen 0,01 M $CaCl_2$-Lösung zur Gleichgewichtseinstellung des Bodens | | ml | | | | |
| Volumen der Vorratslösung | | $cm^3$ | | | | |
| Gesamtvolumen wässrige Phase in Kontakt mit Boden | $v_0$ | $cm^3$ | | | | |
| Anfangskonzentration der Testlösung | $C_0$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |
| Gleichgewichtseinstellungszeit | — | h | | | | |
| **Nach Schütteln und Zentrifugieren** | | | | | | |
| Testsubstanz wässrige Phase bei Adsorptionsgleichgewicht, Leerkorrektur berücksichtigt | $C_{aq}^{ads}(eq)$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |
| Gleichgewichtseinstellungszeit | $t_{eq}$ | h | | | | |
| Erste Verdünnung mit Lösungsmittel | | | | | | |
| Abgenommenes Volumen wässrige Phase | $V_{rec}$ | $cm^3$ | | | | |
| Zugesetztes Volumen Lösungsmittel | $\Delta V$ | $cm^3$ | | | | |
| Erste Extraktion mit Lösungsmittel | | | | | | |
| Signalanalysiert in Lösungsmittel | $S_{E1}$ | var. | | | | |
| Konzentration Testsubstanz in Lösungsmittel | $C_{E1}$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |

▼B

| | Symbol | Einheiten | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Masse der aus Boden und von Gefäßwänden extrahierten Substanz | $m_{E1}$ | µg | | | | |
| Zweite Verdünnung mit Lösungsmittel | | | | | | |
| Abgenommenes Volumen Lösungsmittel | $\Delta V_S$ | $cm^3$ | | | | |
| Zugesetztes Volumen Lösungsmittel | $\Delta V'$ | $cm^3$ | | | | |
| Zweite Extraktion mit Lösungsmittel | | | | | | |
| Signal analysiert in Lösungsmittelphase | $S_{E2}$ | var. | | | | |
| Konzentration Testsubstanz in Lösungsmittel | $C_{E2}$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |
| Masse der aus Boden und von Gefäßwänden extrahierten Substanz | $m_{E2}$ | µg | | | | |
| Gesamtmasse Testsubstanz extrahiert in zwei Schritten | $m_E$ | µg | | | | |
| Massenbilanz | MB | % | | | | |

Getestete Substanz:

Getesteter Boden:

Trockenmassegehalt des Bodens (105 °C, 12 h): ..... %

Temperatur: ..... °C

**Adsorptionsisothermen**

| | Symbol | Einheiten | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glas Nr. | | | | | | | | | | |
| Bodeneinwaage | — | g | | | | | | | | |
| Boden: Trockenmasse | E | g | | | | | | | | |
| Wasservolumen in Bodeneinwaage (rechnerisch) | $V_{WS}$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Volumen 0,01 M $CaCl_2$-Lösung zur Gleichgewichtseinstellung des Bodens | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Volumen zugesetzter Vorratslösung | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Gesamtvolumen wässrige Phase in Kontakt mit Boden (rechnerisch) | $V_0$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Konzentration Lösung | $C_0$ | µg $cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Gleichgewichtseinstellungszeit | — | h | | | | | | | | |

▼B

| | Symbol | Einheiten | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nach Schütteln und Zentrifugieren** | | | | | | | | | | |
| Konzentration Substanz wässrige Phase, Leerkorrektur berücksichtigt | $C_{aq}^{ads}(eq)$ | µg $cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Temperatur | | °C | | | | | | | | |
| Adsorbierte Masse je Einheit Boden | $C_s^{ads}(eq)$ | µg $g^{-1}$ | | | | | | | | |

Regressionsanalyse:

Wert von: $K_F^{ads}$:

Wert von l/n:

Regressionskoeffizient $r^2$:

Getestete Substanz:

Getesteter Boden:

Trockenmassegehalt des Bodens (105 °C, 12 h): ..... %

Teperatur: ..... °C

Zugrunde liegende Analysenmethodik: Indirekt ☐ Gesamt ☐ Aliquoten ☐

**Desorptionstest**

| | | Symbol | Einheiten | Zeitintervall | Zeitintervall | Zeitintervall | Zeitintervall |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glas Nr. aus dem Adsorptionsschritt | | | | | | | |
| Masse von an Boden bei Adsorptionsgleichgewicht adsorbierter Substanz | | $m_s^{ads}(eq)$ | µg | | | | |
| Abgenommenes Volumen wässrige Phase, ersetzt durch 0,01 M $CaCl_2$ | | $V_R$ | $cm^3$ | | | | |
| Gesamtvolumen wässrige Phase in Kontakt mit Boden | GM | $V_0$ | $cm^3$ | | | | |
| | AM | $V_T$ | $cm^3$ | | | | |
| Masse der nach Adsorptionsgleichgewichtseinstellung infolge unvollständigen Volumenaustauschs verbliebenen Testsubstanz | | $m_{aq}^A$ | µg | | | | |

**Desorptionskinetik**

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gemessene Masse von aus Boden zur Zeit $t_i$ desorbierter Substanz | | $m_m^{ads}(t_i)$ | µg | | | | |
| Volumen der abgenommenen Lösung aus dem Glas (i) zur Messung der Testsubstanz | GM | $V_f^i$ | $cm^3$ | | | | |
| | AM | $v_a^D$ | $cm^3$ | | | | |
| Masse der aus Boden zur Zeit $t_i$ desorbierten Substanz (rechnerisch) | | $m_{aq}^{ads}(t_i)$ | µg | | | | |
| Masse der aus Boden im Zeitintervall $\Delta t_i$ desorbierten Substanz (rechnerisch) | | $m_{aq}^{ads}(\Delta t_i)$ | µg | | | | |

▼B

| | Symbol | Einheiten | Zeitinter-vall | Zeitinter-vall | Zeitinter-vall | Zeitinter-vall |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Desorptionsanteil** | | | | | | |
| Desorption zur Zeit $t_i$ | $D_{ti}$ | % | | | | |
| Desortion im Zeitintervall $\Delta t_i$ | $D_{\Delta t_i}$ | % | | | | |
| Scheindesorptionskoeffizient | $K_{des}$ | | | | | |

GM: Gesamtbeprobungsmethode

AM: Aliquotenbeprobungsmethode

▼B

## C.19. SCHÄTZUNG DES ADSORPTIONSKOEFFIZIENTEN ($K_{oc}$) IM BODEN UND IN KLÄRSCHLAMM MITTELS DER HOCHDRUCK-FLÜSSIGCHROMATOGRAFIE (HPLC)

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der OECD TG121 (2000).

### 1.1. EINLEITUNG

Das Sorptionsverhalten von Stoffen in Böden oder Klärschlämmen kann anhand von Parametern beschrieben werden, die experimentell mittels der Testmethode C.18 bestimmt werden. Ein wichtiger Parameter ist der Adsorptionskoeffizient, der als das Verhältnis zwischen der Konzentration des Stoffs im Boden/Klärschlamm und der Konzentration des Stoffs in der wässrigen Phase im Adsorptionsgleichgewicht definiert wird. Der aufgrund des Gehalts des Bodens an organischem Kohlenstoff genormte Adsorptionskoeffizient, $K_{oc}$, ist ein nützlicher Indikator für die Fähigkeit eines chemischen Stoffs zur Bindung an organischen Stoff im Boden oder Klärschlamm und gestattet Vergleiche zwischen unterschiedlichen Chemikalien. Dieser Parameter kann durch Korrelation mit der Wasserlöslichkeit und dem Verteilungskoeffizienten n-Oktanol/Wasser geschätzt werden (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Die in diesem Test beschriebene Versuchsmethode wendet für die Schätzung des Adsorptionskoeffizienten $K_{oc}$ im Boden und in Klärschlamm die HPLC an (8). Die Schätzwerte sind verlässlicher als die der QSAR-Berechnungen (9). Als Schätzmethode kann sie die in der Testmethode C.18 verwendeten *Batch equilibrium*-Experimente nicht vollständig ersetzen. Jedoch kann der geschätzte $K_{oc}$ für die Auswahl geeigneter Testparameter für Adsorptions-/Desorptionsstudien gemäß der Testmethode C.18 durch Berechnung von $K_d$ (Verteilungskoeffizient) oder $K_f$ (Adsorptionskoeffizient nach Freundlich) nach der Gleichung 3 (siehe 1.2) nützlich sein.

### 1.2. DEFINITIONEN

**$K_d$**: Der Verteilungskoeffizient Feststoff/Wasser wird als das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentrationen C einer gelösten Testsubstanz in einem zweiphasigen System, das aus einem Sorptionsmittel (Boden oder Klärschlamm) und einer wässrigen Phase besteht, definiert; er ist eine reine Zahl, wenn Konzentrationen in beiden Phasen in Gewicht/Gewicht ausgedrückt sind. Wird die Konzentration in der wässrigen Phase in Gewicht/Volumen ausgedrückt, sind die Einheiten ml· $g^{-1}$. $K_d$ kann je nach den Eigenschaften des Sorptionsmittels unterschiedlich und auch konzentrationsabhängig sein.

$$K_d = \frac{C_{Boden}}{C_{aq}} oder \frac{C_{Klärschlamm}}{C_{aq}} \quad (1)$$

dabei ist:

$C_{Boden}$ = Konzentration der Testsubstanz im Boden im Gleichgewichtszustand (µg· $g^{-1}$)

$C_{Klärschlamm}$ = Konzentration der Testsubstanz im Klärschlamm im Gleichgewichtszustand (µg· $g^{-1}$)

$C_{aq}$ = Konzentration der Testsubstanz in der wässrigen Phase im Gleichgewichtszustand (µg· $g^{-1}$, µg· $ml^{-1}$).

▼B

**$K_f$**: Der Adsorptionskoeffizient nach Freundlich wird definiert als die Konzentration der Testsubstanz im Boden oder im Klärschlamm (x/m), wenn die Gleichgewichtskonzentration $C_{aq}$ in der wässrigen Phase gleich eins ist; er wird in µg· $g^{-1}$ Sorptionsmittel ausgedrückt. Sein Wert kann je nach den Eigenschaften des Sorptionsmittels unterschiedlich sein.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log C_{aq} \quad (2)$$

dabei ist:

x/m = die im Gleichgewichtszustand an eine Menge Sorptionsmittel m (g) adsorbierte Menge der Testsubstanz x (µg)

l/n = Neigung der Adsorptionsisotherme nach Freundlich

$C_{aq}$ = Konzentration der Testsubstanz in wässriger Phase im Gleichgewichtszustand (µg $ml^{-1}$)

$$\text{At } C_{aq} = 1; \log K_f = \log\frac{x}{m}$$

**$K_{oc}$**: ist der aufgrund des organischen Kohlenstoffgehalts ($f_{oc}$) eines Sorptionsmittels genormte Verteilungskoeffizient ($K_d$) oder Adsorptionskoffizient nach Freundlich ($K_f$); dieser Koeffizient ist insbesondere für nicht ionisierte Chemikalien ein ziemlich genauer Indikator für den Grad der Adsorption eines Stoffes an das Sorptionsmittel und ermöglicht Vergleiche zwischen verschiedenen Chemikalien. Je nach den Messgrößen von $K_d$ und $K_f$ kann $K_{oc}$ eine reine Zahl sein oder in ml $g^{-1}$ oder µg $g^{-1}$ organische Stoffe ausgedrückt werden.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}(\text{dimensionlos oder ml}\cdot g^{-1})\text{oder}\frac{Kf}{foc}(\mu g\cdot g^{-1}) \quad (3)$$

Das Verhältnis zwischen $K_{oc}$ und $K_d$ ist nicht immer linear, daher können $K_{oc}$-Werte auch je nach Bodentyp variieren, doch ist ihre Variabilität im Vergleich zu den $K_d$- oder $K_f$-Werten viel geringer.

Der Adsorptionskoeffizient ($K_{oc}$) wird von dem Kapazitätsfaktor (k') mittels einer Eichkurve log k'/log $K_{oc}$ der ausgewählten Referenzverbindungen hergeleitet.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

dabei ist:

$t_R$ = HPLC-Retentionszeit der Test- und Referenzsubstanz (Minuten)

$t_0$ = HPLC-Totzeit (Minuten) (siehe Abschnitt 1.8.2).

**POW**: Der Verteilungskoeffizient Oktanol/Wasser wird definiert als das Verhältnis der Konzentrationen gelöster Stoffe in n-Oktanol und Wasser; er ist eine reine Zahl.

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq}(=Kow) \quad (5)$$

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Die Strukturformel, die Reinheit und die Dissoziationskonstante (sofern zutreffend) sollten vor Anwendung der Methode bekannt sein. Informationen über die Löslichkeit in Wasser und organischen Lösemitteln, über den Trennungskoeffizienten Oktanol/Wasser und über Hydrolyse-Merkmale sind nützlich.

▼B

Um die gemessenen HPLC-Retentionsdaten einer Testsubstanz mit ihrem Adsorptionskoeffizienten $K_{oc}$ zu korrelieren, muss eine Eichkurve log $K_{oc}$/log k' erstellt werden. Mindestens sechs Referenzpunkte sollten verwendet werden, davon zumindest einer über und einer unter dem erwarteten Wert der Testsubstanz. Die Genauigkeit der Methode wird erheblich verbessert, wenn Referenzsubstanzen verwendet werden, die von der Struktur her mit der Testsubstanz verwandt sind. Liegen derartige Daten nicht vor, muss der Anwender die geeigneten Eichsubstanzen selbst auswählen. In diesem Fall sollte eine allgemeinere Reihe von strukturell heterogenen Stoffen gewählt werden. Empfohlene Referenzsubstanzen und ihre $K_{oc}$-Werte sind in den Tabellen 1 und 3 der Anlage aufgelistet. Die Wahl anderer Eichsubstanzen ist zu begründen.

1.4. PRINZIP DER TESTMETHODE

Die HPLC wird auf Analysesäulen durchgeführt, die mit im Handel erhältlicher Cyanopropyl-Festphase mit lipophilen und polaren Anteilen gefüllt sind. Ferner wird eine gemäßigt polare stationäre Phase auf der Grundlage einer Silica-Matrix verwendet:

| | | |
|---|---|---|
| — O — Si | — $CH_2$ — $CH_2$ — $CH_2$ | — CN |
| Silica | nicht-polarer Spacer | polarer Anteil |

Das Prinzip der Testmethode ist ähnlich wie bei der Testmethode A.8 (Verteilungskoeffizient, HPLC-Methode). Während die Testsubstanz die Säule mit der mobilen Phase passiert, steht die Testsubstanz zu der stationären Phase in einer Wechselwirkung. Durch die Trennung zwischen der mobilen und der stationären Phase wird die Testsubstanz verzögert. Die Ambivalenz der stationären Phase mit polaren und nicht polaren Verbindungsstellen ermöglicht eine ähnliche Wechselwirkung zwischen polaren und nicht polaren Gruppen eines Moleküls wie bei organischen Stoffen in Boden- oder Klärschlamm-Matrizen. Dies ermöglicht die Feststellung des Verhältnisses zwischen der Retentionszeit auf der Säule und dem Koeffizienten der Adsorption durch organischen Stoff.

Der pH-Wert hat insbesondere bei polaren Substanzen einen signifikanten Einfluss auf das Sorptionsverhalten. Bei landwirtschaftlichen Böden oder Behältern von Klärschlammbehandlungsanlagen schwankt der pH-Wert normalerweise zwischen 5,5 und 7,5. Für ionisierbare Stoffe sind zwei Tests mit sowohl ionisierten als auch nicht ionisierten Formen in geeigneten Pufferlösungen durchzuführen, jedoch nur in Fällen, in denen zumindest 10 % der Testverbindung bei pH-Werten zwischen 5,5 und 7,5 dissoziiert vorliegen.

Da die Bewertung ausschließlich aufgrund der Relation zwischen der Retention in der HPLC-Säule und dem Adsorptionskoeffizienten erfolgt, ist keine quantitative Analysemethode, sondern nur eine Bestimmung der Retentionszeit erforderlich. Sofern eine Reihe geeigneter Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen und die Versuche unter Standardbedingungen durchgeführt werden können, bietet die Methode einen schnellen und wirksamen Weg zur Schätzung des Adsorptionskoeffizienten $K_{oc}$.

1.5. ANWENDBARKEIT DES TESTS

Die HPLC-Methode ist auf (markierte oder nicht markierte) Chemikalien anwendbar, für die ein geeignetes Detektionssystem (z. B. Spektrofotometer, Radioaktivitätsanzeiger) zur Verfügung steht und die für die Dauer des Tests stabil genug sind. Die Methode kann insbesondere für Chemikalien brauchbar sein, deren Untersuchung in anderen Versuchssystemen schwierig ist (d. h. flüchtige Stoffe; Stoffe, die in Wasser in einer analytisch messbaren Konzentration nicht löslich sind; Stoffe mit einer starken Affinität gegenüber der Oberfläche von Inkubationssystemen). Die Methode kann auf Mischungen angewendet werden, die nicht aufgelöste Elutionsbänder ergeben. In einem solchen Fall sind die Ober- und Untergrenzen der log $K_{oc}$-Werte der Verbindungen der Testmischung anzugeben.

▼B

Zwar können Unreinheiten zuweilen zu Problemen bei der Interpretation der HPLC-Ergebnisse führen, doch sind sie von geringerer Bedeutung, solange die Testsubstanz auf analytischem Wege identifiziert und von den Unreinheiten getrennt werden kann.

Die Methode ist mit den in Tabelle 1 der Anlage aufgelisteten Stoffen validiert worden und wurde auch auf verschiedene andere Chemikalien angewandt, die zu den folgenden Chemikalienklassen gehören:

— aromatische Amine (z. B. Trifluralin, 4-Chloroanilin, 3,5-Dinitroanilin, 4-Methylanilin, N-Methylanilin, 1-Naphthylamin;

— aromatische Carbonsäureester (z. B. Benzoesäuremethylester, 3,5-Dinitrobenzoesäureethylester);

— aromatische Kohlenwasserstoffe (z. B. Toluol, Xylol, Ethylbenzol, Nitrobenzol);

— Aryloxyphenoxypropionsäureester (z. B. Diclofop-methyl, Fenoxaprop-ethyl, Fenoxaprop-P-ethyl);

— Benzimidazol- und Imidazol-Fungizide (z. B. Carbendazim, Fuberidazol, Triazoxid);

— Carbonsäureamide (z. B. 2-Chlorbenzamid, N,N-Dimethylbenzamid, 3,5-Dinitrobenzamid, N-Methylbenzamid, 2-Nitrobenzamid, 3-Nitrobenzamid);

— Chlorkohlenwasserstoffe (z. B. Endosulfan, DDT, Hexachlorbenzol, Quintozen, 1,2,3-Trichlorbenzol);

— phosphororganische Insektizide (z. B. Azinphos-methyl, Disulfoton, Fenamiphos. Isofenphos, Pyrazophos, Sulprofos, Triazophos);

— Phenole (z. B. Phenol, 2-Nitrophenol, 4-Nitrophenol, Pentachlorphenol, 2,4,6-Trichlorphenol, 1-Naphthol):

— Phenylharnstoffderivative (z. B. Isoproturon, Monolinuron, Pencycuron);

— Pigmentfarbstoffe (z. B. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);

— polyaromatische Kohlenwasserstoffe (z. B. Acenaphthen, Naphthalin);

— 1,3,5-Triazin-Herbizide (z. B. Prometryn, Propazin, Simazin, Terbutryn);

— Triazolderivate (z. B. Tebuconazol, Triadimefon, Tradimenol, Triapenthenol).

Die Methode ist nicht auf Stoffe anwendbar, die entweder mit dem Eluenten oder der stationären Phase reagieren. Ferner ist sie nicht auf Stoffe anwendbar, die in einer spezifischen Wechselwirkung mit anorganischen Verbindungen stehen (z. B. Bildung von Clusterkomplexen mit Tonmineralien). Es ist möglich, dass sich die Methode nicht für oberflächenaktive Stoffe, anorganische Verbindungen und gemäßigt oder stark organische Säuren und Basen eignet. Log $K_{oc}$-Werte im Bereich 1,5 bis 5,0 können bestimmt werden. Ionisierbare Stoffe müssen mittels einer gepufferten mobilen Phase gemessen werden, doch ist darauf zu achten, dass eine Präzipitation von Pufferkomponenten oder der Testsubstanz vermieden wird.

▼B

1.6. QUALITÄTSKRITERIEN

1.6.1. **Genauigkeit**

Normalerweise kann der Adsorptionskoeffizient einer Testsubstanz auf +/– 0,5 log. Einheiten des Werts geschätzt werden, der nach der *Batch equilibrium*-Methode (siehe Tabelle 1 der Anlage) bestimmt wird. Größere Genauigkeit kann erzielt werden, wenn die verwendeten Referenzsubstanzen von der Struktur her mit der Testsubstanz verwandt sind.

1.6.2. **Wiederholbarkeit**

Die Bestimmungen müssen mindestens doppelt durchgeführt werden. Die von Einzelmessungen hergeleiteten log $K_{oc}$-Werte müssen innerhalb von 0,25 log. Einheiten liegen.

1.6.3. **Reproduzierbarkeit**

Die bisher mit der Methode gewonnenen Erfahrungen sprechen für ihre Validität. Eine Prüfung der HPLC-Methode, bei der 48 Stoffe (zumeist Pestizide) verwendet wurden, für die verlässliche Daten über $K_{oc}$ in Böden vorlagen, ergab einen Korrelationskoeffizienten von = 0,95 (10) (11).

Ein Ringversuch mit 11 teilnehmenden Laboratorien wurde durchgeführt, um die Methode zu verbessern und zu validieren (12). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 der Anlage enthalten.

1.7. BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.7.1. **Vorbereitende Schätzung des Adsorptionskoeffizienten**

Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient $P_{ow}$ (= $K_{ow}$) und in bestimmtem Maße die Wasserlöslichkeit können als Indikatoren für den Adsorptionsgrad, insbesondere für nicht ionisierte Stoffe, dienen und können somit zur Bereichsfindung verwendet werden. Für verschiedene Gruppen von Chemikalien wurden eine Reihe nützlicher Korrelationen veröffentlicht (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Geräte**

Erforderlich ist ein Flüssigchromatograf, der mit einer impulsfreien Pumpe und einem geeigneten Detektor ausgerüstet ist. Es wird empfohlen, ein Injektionsventil mit einer Injektionsschleife zu verwenden. Ferner ist ein im Handel erhältliches chemisch gebundenes Cyanpropylharz auf Silica-Basis (z. B. Hypersil und Zorbax CN) zu verwenden. Eine Vorsäule mit demselben Material kann zwischen dem Injektionssystem und der Analysesäule platziert werden. Säulen unterschiedlicher Lieferanten können hinsichtlich der Trennwirkung sehr unterschiedlich sein. Als Richtschnur müssen folgende Kapazitätsfaktoren k' erzielt werden: log k' > 0,0 für log $K_{oc}$ = 3,0 und log k' > 0,4 für log $K_{oc}$ = 2,0 bei Verwendung von Methanol/Wasser 55/45 % als mobile Phase.

1.7.3. **Mobile Phasen**

Von den verschiedenen mobilen Phasen, die getestet wurden, werden folgende zwei empfohlen:

— Methanol/Wasser (55/45 % v/v)

— Methanol/0,01M Citratpuffer pH 6,0 (55/45 % v/v)

▼B

Zur Herstellung der Eluierflüssigkeit sind Methanol von HPLC-Qualität und destilliertes Wasser oder Citratpuffer zu verwenden. Das Gemisch wird vor der Verwendung entgast. Es empfiehlt sich, eine isokratische Elution anzuwenden. Wenn das Methanol-Wasser-Gemisch nicht geeignet ist, können andere Gemische aus organischen Lösemitteln und Wasser, z. B. Ethanol-Wasser- oder Acetonitril-Wasser-Gemische versucht werden. Für ionisierende Verbindungen wird die Verwendung einer Pufferlösung zur pH-Stabilisierung empfohlen. Es ist darauf zu achten, dass Salzniederschlag/-Salzpräzipitation und eine Säulenverschlechterung vermieden werden, die bei einigen organische Phase-Puffer-Gemischen auftreten können.

Es dürfen keine Zusätze wie Ionenpaar-Reagenzien verwendet werden, weil sie die Sorptionseigenschaften der stationären Phase beeinträchtigen können. Derartige Veränderungen der stationären Phase können irreversibel sein. Aus diesem Grunde ist es unbedingt erforderlich, dass Versuche, bei denen Zusätze verwendet werden, an getrennten Säulen durchgeführt werden.

1.7.4. **Gelöste Stoffe**

Test- und Referenzsubstanzen sollten in der mobilen Phase gelöst werden.

1.8. DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1.8.1. **Testbedingungen**

Die Temperatur während der Messungen ist aufzuzeichnen. Für das Säulenkompartiment wird eine Temperaturregelung sehr empfohlen, um konstante Bedingungen während der Eichung und Schätzung sowie der Messung der Testsubstanz zu gewährleisten.

1.8.2. **Bestimmung der Totzeit $t_o$**

Für die Bestimmung der Totzeit $t_o$ können zwei unterschiedliche Methoden angewendet werden (siehe auch 1.2).

1.8.2.1. *Bestimmung der Totzeit $t_o$ durch eine homologe Reihe*

Es hat sich herausgestellt, dass dieses Verfahren verlässliche und standardisierte $t_o$-Werte ergibt. Für weitere Einzelheiten siehe Testmethode A.8: Verteilungskoeffizient (n-Oktanol/Wasser), HPLC-Methode.

1.8.2.2. *Bestimmung der Totzeit $t_o$ durch inerte Stoffe, bei denen keine Retention durch die Säule auftritt*

Diese Technik basiert auf der Injektion von Formamid-, Harnstoff- oder Natriumnitratlösungen. Die Messungen sollten zumindest doppelt ausgeführt werden.

1.8.3. **Bestimmung der Retentionszeiten $t_R$**

Referenzsubstanzen sind gemäß der Beschreibung in 1.3 auszuwählen. Sie können zur Bestimmung ihrer Retentionszeiten als gemischter Standard injiziert werden, sofern bestätigt worden ist, dass die Retentionszeiten der einzelnen Referenzstandards nicht durch das Vorhandensein der anderen Referenzstandards beeinflusst werden. Die Eichung muss in regelmäßigen Abständen mindestens zweimal täglich erfolgen, um unerwarteten Veränderungen in der Leistung der Säule Rechnung zu tragen. Die Injektionen sind vorzugsweise vor und nach den Injektionen der Testsubstanz durchzuführen, um sicher zu sein, dass die Retentionszeiten unverändert sind. Die Testsubstanzen werden getrennt in möglichst kleinen Dosen injiziert (um ein Überladen der Säule zu vermeiden), dann werden ihre Retentionszeiten bestimmt.

▼B

Um die Verlässlichkeit der Messung zu erhöhen, sind sie zumindest doppelt durchzuführen. Die von Einzelmessungen hergeleiteten log $K_{oc}$-Werte müssen im Bereich von 0,25 log. Einheiten liegen.

1.8.4. **Bewertung**

Die Kapazitätsfaktoren k' werden aus der Totzeit $t_o$ und den Retentionszeiten $t_R$ der gewählten Testsubstanzen nach der Formel 4 (siehe 1.2) berechnet. Die log k'-Daten der Referenzsubstanzen werden daraufhin gegen ihre in den Tabellen 1 und 3 der Anlage genannten log $K_{oc}$-Werte aus den *Batch equilibrium*-Experimenten aufgetragen. Mit Hilfe dieser Kurve wird der log k'-Wert einer Testsubstanz zur Bestimmung ihres log $K_{oc}$-Wertes verwendet. Wenn die tatsächlichen Werte zeigen, dass der log $K_{oc}$ der Testsubstanz außerhalb des Eichbereichs liegt, ist der Test unter Verwendung anderer geeigneterer Referenzsubstanzen zu wiederholen.

2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

Der Bericht muss folgende Informationen enthalten:

— Identität, Reinheit und gegebenenfalls $pK_a$-Werte von Test- und Referenzsubstanzen;

— Beschreibung der Apparatur und der Betriebsbedingungen, z. B. Typ und Abmessung der Analysesäule (sowie Vorsäule), Detektionsvorrichtung, mobile Phase (Verhältnis zwischen Bestandteilen und pH-Wert), Temperaturbereich während der Messungen;

— Totzeit und die für ihre Bestimmung angewandte Methode;

— Mengen der in die Säule eingebrachten Test- und Referenzsubstanzen;

— Retentionszeiten der für die Eichung verwendeten Referenzverbindungen;

— Einzelheiten der angepassten Regressionslinie (log k'/log $K_{oc}$) und grafische Darstellung der Regressionslinie;

— durchschnittliche Retentionsdaten und geschätzter log $K_{oc}$-Wert der Testverbindung;

— Chromatogramme.

3. **LITERATURHINWEISE**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient ($K_{oc}$) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G. G. Briggs (1981), Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and Sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of Sorption of hydrophobic pollutants on natural Sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kordel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kordel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kordel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationry phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995), HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

*Anlage*

*Tabelle 1*

**Vergleich von $K_{oc}$-Werten für Böden und Klärschlämme, und mittels der HPLC-Screeningmethode (1) (2) berechneten Werten**

| Stoffe | CAS-Nr. | Log $K_{oc}$ Klär-schlamm | Log $K_{oc}$ HPLC | Δ | Log $K_{oc}$ Böden | Log $K_{oc}$ HPLC | Δ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Atrazin | 1912-24-9 | 1,66 | 2,14 | 0,48 | 1,81 | 2,20 | 0,39 |
| Linuron | 330-55-2 | 2,43 | 2,96 | 0,53 | 2,59 | 2,89 | 0,30 |
| Fenthion | 55-38-9 | 3,75 | 3,58 | 0,17 | 3,31 | 3,40 | 0,09 |
| Monuron | 150-68-5 | 1,46 | 2,21 | 0,75 | 1,99 | 2,26 | 0,27 |
| Phenanthren | 85-01-8 | 4,35 | 3,72 | 0,63 | 4,09 | 3,52 | 0,57 |
| Benzoesäurephenylester | 93-99-2 | 3,26 | 3,03 | 0,23 | 2,87 | 2,94 | 0,07 |
| Benzamid | 55-21-0 | 1,60 | 1,00 | 0,60 | 1,26 | 1,25 | 0,01 |
| 4-Nitrobenzamid | 619-80-7 | 1,52 | 1,49 | 0,03 | 1,93 | 1,66 | 0,27 |
| Acetanilid | 103-84-4 | 1,52 | 1,53 | 0,01 | 1,26 | 1,69 | 0,08 |
| Anilin | 62-53-3 | 1,74 | 1,47 | 0,27 | 2,07 | 1,64 | 0,43 |
| 2,5-Dichloranilin | 95-82-9 | 2,45 | 2,59 | 0,14 | 2,55 | 2,58 | 0,03 |

(1) W. Kordel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121-128.
(2) W. Kordel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107-119

*Tabelle 2*

**Ergebnisse eines Ringversuchs (11 teilnehmende Laboratorien) zur Verbesserung und Validierung der HPLC-Methode (1)**

| Stoff | CAS-Nr. | Log $K_{oc}$ | $K_{oc}$ | Log $K_{oc}$ |
|---|---|---|---|---|
| | | (OECD 106) | (HPLC Methode) | |
| Atrazin | 1912-24-9 | 1,81 | 78 ± 16 | 1,89 |
| Monuron | 150-68-5 | 1,99 | 100 ± 8 | 2,00 |
| Triapenthenol | 77608-88-3 | 2,37 | 292 ± 58 | 2,47 |
| Linuron | 330-55-2 | 2,59 | 465 ± 62 | 2,67 |
| Fenthion | 55-38-9 | 3,31 | 2062 ± 648 | 3,31 |

(1) W. Kördel, G. Kotthoff. J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere. 30(7), 1373-1384.

▼B

*Tabelle 3*

**Empfohlene Referenzsubstanzen für die HPLC-Screeningmethode auf der Grundlage von Bodenadsorptionsdaten**

| Referenzsubstanz | CAS-Nr. | Durchschn. log $K_{oc}$-Werte vom Chargen-Gleichgewicht | Anzahl $K_{oc}$ Daten | Log S.D. | Quelle |
|---|---|---|---|---|---|
| Acetanilid | 103-84-4 | 1,25 | 4 | 0,48 | (a) |
| Phenol | 108-95-2 | 1,32 | 4 | 0,70 | (a) |
| 2-Nitrobenzamid | 610-15-1 | 1,45 | 3 | 0,90 | (b) |
| N, N-Dimethylbenzamid | 611-74-5 | 1,52 | 2 | 0,45 | (a) |
| 4-Methylbenzamid | 619-55-6 | 1,78 | 3 | 1,76 | (a) |
| Methylbenzoat | 93-58-3 | 1,80 | 4 | 1,08 | (a) |
| Atrazin | 1912-24-9 | 1,81 | 3 | 1,08 | (c) |
| Isoproturon | 34123-59-6 | 1,86 | 5 | 1,53 | (c) |
| 3-Nitrobenzamid | 645-09-0 | 1,95 | 3 | 1,31 | (b) |
| Anilin | 62-53-3 | 2,07 | 4 | 1,73 | (a) |
| 3,5-Dinitrobenzamid | 121-81-3 | 2,31 | 3 | 1,27 | (b) |
| Carbendazim | 10605-21-7 | 2,35 | 3 | 1,37 | (c) |
| Triadimenol | 55219-65-3 | 2,40 | 3 | 1,85 | (c) |
| Triazoxid | 72459-58-6 | 2,44 | 3 | 1,66 | (c) |
| Triazophos | 24017-47-8 | 2,55 | 3 | 1,78 | (c) |
| Linuron | 330-55-2 | 2,59 | 3 | 1,97 | (c) |
| Naphthalin | 91-20-3 | 2,75 | 4 | 2,20 | (a) |
| Endosulfan-diol | 2157-19-9 | 3,02 | 5 | 2,29 | (c) |
| Methiocarb | 2032-65-7 | 3,10 | 4 | 2,39 | (c) |
| Acid Yellow 219 | 63405-85-6 | 3,16 | 4 | 2,83 | (a) |
| 1,2,3-Trichlorobenzen | 87-61-6 | 3,16 | 4 | 1,40 | (a) |
| γ-HCH | 58-89-9 | 3,23 | 5 | 2,94 | (a) |
| Fenthion | 55-38-9 | 3,31 | 3 | 2,49 | (c) |
| Direct Red 81 | 2610-11-9 | 3,43 | 4 | 2,68 | (a) |
| Pyrazophos | 13457-18-6 | 3,65 | 3 | 2,70 | (c) |
| α-Endosulfan | 959-98-8 | 4,09 | 5 | 3,74 | (c) |
| Diclofop-methyl | 51338-27-3 | 4,20 | 3 | 3,77 | (c) |
| Phenanthren | 85-01-8 | 4,09 | 4 | 3,83 | (a) |
| Basic Blue 41 (mix) | 26850-47-5<br>12270-13-2 | 4,89 | 4 | 4,46 | (a) |
| DDT | 50-29-3 | 5,63 | 1 | — | (b) |

(a) W. Kördel. J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oepen. W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, 285-304.
(c) Von der Industrie vorgelegte Daten.

▼B

## C.20. *DAPHNIA MAGNA*, REPRODUKTIONSTEST

### 1. METHODE

Diese Methode zur Prüfung der Reproduktionstoxizität entspricht der OECD TG 211 (1998).

### 1.1. EINLEITUNG

Die primäre Zielsetzung der Prüfung besteht darin, die Wirkung von Chemikalien auf die Reproduktionsleistung der Daphnia magna zu bestimmen.

### 1.2. DEFINITIONEN UND EINHEITEN

**Elterntiere**: Dies sind diejenigen weiblichen Daphnien, die zu Beginn der Prüfung vorhanden sind und deren Reproduktionsleistung in der Prüfung untersucht werden soll.

**Nachkommen**: Dies sind die jungen Daphnien, die von den Elterntieren im Verlauf der Prüfung produziert werden.

**Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)**: Dies ist die niedrigste geprüfte Dosiskonzentration, bei der sich eine statistisch signifikante Wirkung auf die Reproduktion und die Mortalität der Elterntiere (bei $p < 0,05$) im Vergleich zu der Kontrolle innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums beobachten lässt. Alle Prüfkonzentrationen oberhalb der LOEC müssen jedoch eine schädigende Wirkung haben, die gleich den bei der LOEC beobachteten Wirkungen oder größer als diese ist. Können diese beiden Bedingungen nicht erfüllt werden, muss ausführlich erklärt werden, wie die LOEC (und damit auch die NOEC) ausgewählt wurde.

**No Observed Effect Concentration (NOEC)**: Dies ist die Prüfkonzentration unmittelbar unterhalb der LOEC, bei der im Vergleich zu der Kontrolle innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums keine statistisch signifikante Wirkung ($p < 0,05$) vorliegt.

**$EC_x$**: Dies ist die Konzentration der in Wasser gelösten Prüfsubstanz, die zu einer Verringerung der Reproduktion der Daphnia magna um x Prozent innerhalb eines angegebenen Expositionszeitraums führt.

**Immanente Wachstumsrate**: Dies ist ein Maß für das Wachstum der Population, welches die Reproduktionsleistung und die altersspezifische Mortalität mit einbezieht (20) (21) (22). In stabilen Populationen ist die immanente Wachstumsrate gleich null. Bei wachsenden Populationen ist sie positiv, und bei schrumpfenden Populationen ist sie negativ. Letztere kann eindeutig keine Erhaltung der Art ermöglichen und führt schließlich zum Aussterben.

**Nachweisgrenze**: Dies ist die niedrigste Konzentration, die nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden kann.

**Bestimmungsgrenze**: Dies ist die niedrigste Konzentration, die quantitativ gemessen werden kann.

**Mortalität**: Ein Tier wird als tot protokolliert, wenn es unbeweglich ist, d. h., wenn es nicht schwimmen kann oder sich keine Bewegungen von Anhängseln oder Postabdomen innerhalb von 15 Sekunden nach vorsichtigem Hin- und Herbewegen des Prüfbehälters beobachten lassen. (Wird eine andere Definition herangezogen, muss diese zusammen mit dem dazugehörigen Literaturhinweis angegeben werden.)

▼B

1.3. PRINZIP DER METHODE

Junge weibliche Daphnien (die Elterntiere), die zu Beginn der Prüfung weniger als 24 Stunden alt sind, werden der dem Wasser in verschiedenen Konzentrationen zugesetzten Prüfsubstanz ausgesetzt. Die Dauer der Prüfung beträgt 21 Tage. Am Ende der Prüfung wird die gesamte Anzahl an lebenden Nachkommen, die von den am Ende der Prüfung noch lebenden Elterntieren produziert wurden, bewertet. Dies bedeutet, dass Jungtiere, die von erwachsenen Tieren, welche im Verlauf der Prüfung sterben, produziert werden, aus den Berechnungen ausgeschlossen werden. Die Reproduktionsleistung von Elterntieren kann auch auf andere Art und Weise angegeben werden (z. B. Anzahl an lebenden Nachkommen, die je Tier und Tag ab dem ersten Tag, an dem Nachkommen festgestellt wurden, produziert werden), diese Angaben sollten jedoch zusätzlich zu der Gesamtanzahl an Jungtieren, bezogen auf die am Ende der Prüfung noch lebenden Elterntiere, protokolliert werden. Die Reproduktionsleistung der Tiere, die der Prüfsubstanz ausgesetzt wurden, wird mit der Leistung der Kontrolle(n) verglichen, um die niedrigste Wirkkonzentration (LOEC) und damit auch die höchste Konzentration ohne Wirkung (NOEC) zu bestimmen. Zusätzlich sind die Daten so weit wie möglich mit Hilfe eines Regressionsmodells zu analysieren, um die Konzentration zu schätzen, die zu einer x %igen Verringerung der Reproduktionsleistung führen würde (d. h. $EC_{50}$. $EC_{20}$ oder $EC_{10}$).

Das Überleben der Elterntiere und die Zeit bis zur Produktion der ersten Brut müssen ebenfalls berichtet werden. Andere sich auf die jeweilige Substanz beziehende Wirkungen auf Parameter wie das Wachstum (z. B. die Länge) und eine mögliche immanente Wachstumsrate können ebenfalls untersucht werden.

1.4. ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

Ergebnisse einer akuten Toxizitätsprüfung (siehe Methode C.2, Teil 1), die an *Daphnia magna* durchgeführt wurde, sollten zur Verfügung stehen. Das Ergebnis kann bei der Auswahl eines geeigneten Bereichs an Prüfkonzentrationen in den Reproduktionsprüfungen von Nutzen sein. Die Wasserlöslichkeit und der Dampfdruck der Prüfsubstanz sollten bekannt sein, und ein zuverlässiges analytisches Verfahren für die Quantifizierung der Prüfsubstanz in den Prüflösungen mit dokumentierter Restitutionsgüte und Nachweisgrenze sollte vorhanden sein.

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

1.5. VALIDITÄTSKRITERIEN

Damit die Validität einer Prüfung gegeben ist, sollten die folgenden Leistungskriterien in der/den Kontrolle(n) erfüllt werden:

— Die Mortalität der Elterntiere (weibliche *Daphnien)* darf am Ende der Prüfung 20 % nicht übersteigen;

— Die mittlere Anzahl an lebenden Nachkommen, die pro am Ende der Prüfung noch lebendem Elterntier produziert wurden, ist $\geq$ 60.

1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.6.1. **Prüfanordnung**

Prüfgefäße und andere Geräte, die mit den Prüflösungen in Berührung kommen, sollten ganz aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Werkstoff bestehen. Normalerweise handelt es sich bei den Prüfgefäßen um Glaskolben.

Zusätzlich werden einige oder alle der folgenden Geräte erforderlich sein:

— Sauerstoffmessgerät (mit einer Mikroelektrode oder einem anderen geeigneten Gerät zur Messung von gelöstem Sauerstoff in Proben von geringem Volumen);

▼B

— geeignetes Gerät zur Regelung der Temperatur;

— pH-Messgerät;

— Gerät zur Bestimmung der Wasserhärte;

— Gerät zur Bestimmung der gesamten organischen Kohlenstoffkonzentration (TOC) von Wasser oder Gerät zur Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (COD);

— geeignetes Gerät zur Regelung der Beleuchtungsverhältnisse und zur Messung der Lichtstärke.

1.6.2. **Prüforganismen**

In der Prüfung soll die Art Daphnia magna Straus verwendet werden. Andere Daphnien-Arten können zum Einsatz kommen, sofern sie die Validitätskriterien, soweit zutreffend, erfüllen (die Validitätskriterien hinsichtlich der Reproduktionsleistung in den Kontrollen sollten für die Daphnien-Art relevant sein). Werden andere Daphnien-Arten verwendet, müssen diese eindeutig identifiziert werden, außerdem ist ihre Verwendung zu begründen.

Der Klon sollte möglichst durch eine Genotypbestimmung identifiziert worden sein. Untersuchungen (1) haben gezeigt, dass die Reproduktionsleistung von Klon A (der aus dem IRCHA in Frankreich stammt) (3) das Validitätskriterium eines Mittelwerts von ≥ 60 Nachkommen je überlebendem Elterntier gleich bleibend erfüllt, wenn die Kultur unter den in dieser Methode beschriebenen Bedingungen erfolgt. Andere Klone sind jedoch annehmbar, sofern nachgewiesen ist, dass die Daphnien-Kultur die Validitätskriterien für eine Prüfung erfüllt.

Zu Beginn der Prüfung sollten die Tiere weniger als 24 Stunden alt sein, und sie dürfen nicht zur ersten Nachkommenschaft einer Brut gehören. Sie sollten aus einem gesunden Bestand stammen (d. h., keine Anzeichen von Stress aufweisen, beispielsweise eine hohe Mortalität, das Vorhandensein von männlichen Tieren oder Ephippien, verzögerte Produktion der ersten Brut, verfärbte Tiere usw.). Die Zuchttiere müssen unter ähnlichen Kulturbedingungen (Licht, Temperatur, Medium, Fütterung und Tiere je Volumeinheit) gehalten werden wie die Tiere, die in der Prüfung verwendet werden. Wird bei der Prüfung ein anderes Kulturmedium für die Daphnien verwendet als bei der routinemäßigen Daphnien-Kultur, empfiehlt sich eine Eingewöhnungszeit vor der Prüfung, die im Normalfall etwa 3 Wochen dauert (d. h. eine Generation), um Stress für die Elterntiere zu vermeiden.

1.6.3. **Prüfmedium**

In dieser Prüfung wird der Einsatz eines vollständig definierten Mediums empfohlen. Dadurch kann die Verwendung von Additiven (z. B. Seetang, Bodenextrakt, usw.), die sich nur schwer charakterisieren lassen, vermieden werden, und es bestehen größere Chancen auf eine Standardisierung unter den Prüfeinrichtungen. Die Medien Elendt M4 (4) und M7 (siehe Anlage 1) haben sich für diesen Zweck als geeignet erwiesen. Allerdings sind andere Medien (z. B. (5) (6)) annehmbar, sofern nachgewiesen ist, dass die Leistung der Daphnien-Kultur die Validitätskriterien für die Prüfung erfüllt.

Werden Medien verwendet, die undefinierte Additive enthalten, sollten diese Additive klar und deutlich spezifiziert werden, und es sollten in dem Prüfbericht Angaben zur Zusammensetzung enthalten sein, insbesondere im Hinblick auf den Kohlenstoffgehalt, da dies zu der gebotenen Nahrung beitragen kann. Empfohlen wird, dass der gesamte organische Kohlenstoff (TOC) und/oder der chemische Sauerstoffbedarf (COD) des Stammansatzes des organischen Additivs bestimmt und eine Schätzung des sich daraus ergebenden Beitrags zu dem TOC/COD in dem Prüfmedium vorgenommen wird. Die Empfehlung lautet, dass die TOC-Anteile in dem Medium (d. h. vor dem Zusatz von Algen) unter 2 mg/l liegen sollten (7).

▼B

Enthalten die Prüfsubstanzen Metalle, ist es wichtig, anzuerkennen, dass die Eigenschaften des Prüfmediums (z. B. Härte, Chelatbildungsvermögen) Einfluss auf die Toxizität der Prüfsubstanz haben können. Aus diesem Grunde sollte möglichst ein umfassend definiertes Prüfmedium verwendet werden. Gegenwärtig sind jedoch die einzigen umfassend definierten Medien, die bekanntermaßen für die Langzeitkultur von Daphnia magna geeignet sind, Elendt M4 und M7. Beide Medien enthalten den Chelatbildner EDTA. Untersuchungen haben gezeigt (2), dass die „scheinbare Toxizität" von Cadmium im Allgemeinen niedriger ist, wenn die Reproduktionsprüfung in den Medien M4 und M7 durchgeführt wird, als in Medien, die kein EDTA enthalten. M4 und M7 werden aus diesem Grunde nicht für Prüfsubstanzen empfohlen, die Metalle enthalten, und andere Medien, die bekannte Chelatbildner enthalten, sollten ebenfalls vermieden werden. Bei Substanzen, die Metall enthalten, kann die Verwendung eines alternativen Mediums ratsam sein, beispielsweise rekonstituiertes hartes Süßwasser (7) nach ASTM, das kein EDTA enthält und dem Seetangextrakt zugesetzt wurde (8). Diese Kombination von rekonstituiertem hartem Süßwasser nach ASTM und Seetangextrakt ist ebenfalls für die Langzeitkultur und Prüfung von Daphnia magna (2) geeignet, auch wenn sie aufgrund der organischen Komponente in dem zugesetzten Seetangextrakt immer noch eine geringfügige chelatbildende Wirkung ausübt.

Zu Beginn und im Verlauf der Prüfung sollte die gelöste Sauerstoffkonzentration über 3 mg/l liegen. Der pH-Wert sollte sich im Bereich von 6 bis 9 befinden und in jedem einzelnen Test um nicht mehr als 1,5 Einheiten schwanken. Eine Härte von mehr als 140 mg/l (als $CaCO_3$) wird empfohlen. Bei Prüfungen mit diesem und höheren Werten wurde eine Reproduktionsleistung im Einklang mit den Validitätskriterien (9) (10) nachgewiesen.

1.6.4. **Prüflösungen**

Prüflösungen der gewählten Konzentrationen werden im Allgemeinen durch Verdünnung eines Stammansatzes hergestellt. Stammansätze sollten möglichst durch Auflösung der Substanz im Prüfmedium hergestellt werden.

In einigen Fällen kann zwar der Einsatz von organischen Löse- oder Dispersionsmitteln erforderlich sein, um einen Stammansatz von geeigneter Konzentration zu erzielen, jedoch sollten alle Anstrengungen unternommen werden, um die Verwendung derartiger Stoffe zu vermeiden. Beispiele für geeignete Lösemittel sind Aceton, Ethanol, Methanol, Dimethylformamid und Triethylenglycol. Beispiele für geeignete Dispersionsmittel sind Cremophor RH40, Methylcellulose 0,01 % und HCO-40. In jedem Fall sollte die Prüfsubstanz in den Prüflösungen die Löslichkeitsgrenze im Prüfmedium nicht überschreiten.

Lösemittel werden zur Herstellung eines Stammansatzes verwendet, der genau in Wasser dosiert werden kann. Bei der empfohlenen Lösemittelkonzentration in dem endgültigen Prüfmedium (d. h. $\leq$ 0,1 ml/l) sind die oben genannten Lösemittel nicht toxisch und führen nicht zu einer höheren Wasserlöslichkeit einer Substanz.

Dispersionsmittel können bei einer genauen Dosierung und Dispersion helfen. Bei der empfohlenen Konzentration in dem endgültigen Prüfmedium ($\leq$ 0,1 ml/l) sind die oben genannten Dispersionsmittel nicht toxisch und führen nicht zu einer höheren Wasserlöslichkeit einer Substanz.

▼B

1.7. AUSLEGUNG DER PRÜFUNG

Die Behandlungen sollten den Prüfgefäßen zugeordnet werden, und die gesamte anschließende Handhabung der Prüfgefäße sollte nach dem Zufallsprinzip erfolgen. Ist dies nicht der Fall, kann dies zu einer einseitigen Ausrichtung führen, die als Konzentrationswirkung ausgelegt werden könnte. Insbesondere wenn mit Versuchseinheiten in einer Behandlungs- oder Konzentrationsreihenfolge umgegangen wird, könnten verschiedene zeitabhängige Auswirkungen wie beispielsweise die Müdigkeit des Prüfers oder andere Fehler zu größeren Wirkungen bei den höheren Konzentrationen führen. Außerdem sollte eine Blockbildung für die Prüfung in Erwägung gezogen werden, wenn die Prüfergebnisse wahrscheinlich durch eine anfängliche oder umweltbezogene Bedingung der Prüfung wie der Position in der Prüfeinrichtung beeinflusst werden.

1.8. DURCHFÜHRUNG DER PRÜFUNG

1.8.1. **Expositionsbedingungen**

1.8.1.1. *Dauer*

Die Dauer der Prüfung beträgt 21 Tage.

1.8.1.2. *Besatz*

Die Elterntiere werden jeweils einzeln in einem Prüfgefäß mit 50 bis 100 ml Prüfmedium in jedem Gefäß gehalten.

Mitunter können größere Volumina erforderlich sein, um die Anforderungen des für die Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration zum Einsatz kommenden analytischen Verfahrens zu erfüllen, auch wenn ein Poolen von Wiederholungen für die chemische Analyse ebenfalls zulässig ist. Werden größere Volumina als 100 ml verwendet, muss unter Umständen die den Daphnien verabreichte Ration erhöht werden, um ein entsprechendes Nahrungsangebot und die Einhaltung der Validitätskriterien sicherzustellen. Bei Durchflussprüfungen können aus technischen Gründen alternative Konzepte in Erwägung gezogen werden (z. B. vier Gruppen von jeweils zehn Tieren in einem größeren Prüfvolumen), dann sollten allerdings Änderungen an der Auslegung der Prüfung protokolliert werden.

1.8.1.3. *Anzahl an Tieren*

Bei semistatischen Prüfungen werden mindestens 10 Tiere einzeln bei jeder Prüfkonzentration und mindestens 10 Tiere einzeln in den Kontrollreihen gehalten.

Bei Durchflussprüfungen haben sich 40 Tiere, die in vier Gruppen von jeweils 10 Tieren bei jeder Prüfkonzentration aufgeteilt werden, als geeignet erwiesen (1). Eine geringere Anzahl an Prüforganismen kann verwendet werden, und mindestens 20 Tiere je Konzentration, die in zwei oder mehr Wiederholungen mit einer gleichen Anzahl von Tieren aufgeteilt werden (z. B. vier Wiederholungen mit jeweils fünf Daphnien), werden empfohlen. Zu beachten ist, dass es bei Prüfungen, bei denen die Tiere in Gruppen gehalten werden, nicht möglich sein wird, die Reproduktionsleistung als Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen pro am Ende der Prüfung noch lebendem Elterntier darzustellen, wenn Elterntiere sterben. In diesen Fällen sollte die Reproduktionsleistung als „Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen pro zu Beginn der Prüfung vorhandenem Elterntier“ angegeben werden.

1.8.1.4. *Fütterung*

Bei semistatischen Prüfungen sollte die Fütterung möglichst täglich, zumindest jedoch dreimal pro Woche erfolgen (d. h. entsprechend dem Wechsel des Prüfmediums). Abweichungen hiervon (z. B. bei Durchflussprüfungen) sollten protokolliert werden.

▼B

Während der Prüfung sollte die Nahrung der Elterntiere möglichst aus lebenden Algenzellen von einer oder mehreren der folgenden Arten bestehen: Chlorella sp, Selenastrum capricornutum (jetzt Pseudokirchneriella subcapitata (11)) und Scenedesmus subspicatus. Die angebotene Nahrung sollte auf der Menge an organischem Kohlenstoff (C) beruhen, die jedem Elterntier zur Verfügung gestellt wird. Untersuchungen (12) haben gezeigt, dass bei Daphnia magna Rationen zwischen 0,1 und 0,2 mg C/Daphnie/Tag hinreichend sind, um die zur Erfüllung der Validitätskriterien der Prüfung erforderliche Anzahl an Nachkommen zu erzielen. Die Ration kann entweder aus einer gleich bleibenden Gabe während des gesamten Prüfzeitraums bestehen, oder es kann, sofern gewünscht, am Anfang eine geringere Menge dargeboten werden, die dann im Verlauf der Prüfung erhöht wird, um dem Wachstum der Elterntiere Rechnung zu tragen. In diesem Falle sollte die Ration zu allen Zeiten nach wie vor innerhalb des empfohlenen Bereichs von 0,1 bis 0,2 mg C/Daphnie/-Tag bleiben.

Kommen zur Bestimmung der erforderlichen Futterration Ersatzgrößen zum Einsatz, beispielsweise die Anzahl an Algenzellen oder die Lichtextinktion (aus Gründen der Zweckmäßigkeit, weil die Messung des Kohlenstoffgehalts zeitaufwendig ist), muss jede Prüfeinrichtung ihr eigenes Nomogramm erstellen, in dem die Ersatzgröße in Bezug zum Kohlenstoffgehalt der Algenkultur gesetzt wird (Anleitung zur Erstellung von Nomogrammen siehe Anlage 2). Nomogramme sollten zumindest einmal pro Jahr oder häufiger überprüft werden, wenn sich die Bedingungen für die Algenkultur geändert haben. Dabei hat sich die Lichtextinktion als eine bessere Ersatzgröße für den Kohlenstoffgehalt als die Zellenanzahl erwiesen (13).

Den Daphnien sollte eine konzentrierte Algensuspension gefüttert werden, um das Volumen des Algenkulturmediums, das in die Prüfgefäße gelangt, auf ein Mindestmaß zu beschränken. Die Konzentration der Algen lässt sich durch Zentrifugieren mit anschließender Resuspension in destilliertem Wasser, entionsiertem Wasser oder Daphnien-Kulturmedium erreichen.

1.5.1.5. *Licht*

16 Stunden Licht mit einer Stärke von nicht mehr als 15 bis 20· µE $m^{-2}$ $s^{-1}$.

1.8.1.6. *Temperatur*

Die Temperatur der Prüfmedien sollte innerhalb eines Bereichs von 18 bis 22 °C liegen. Allerdings sollte die Temperatur bei jeder einzelnen Prüfung nach Möglichkeit um nicht mehr als 2 °C innerhalb dieser Grenzwerte schwanken (z. B. 18 bis 20, 19 bis 21 oder 20 bis 22 °C). Zur Überwachung der Temperatur kann die Verwendung eines zusätzlichen Prüfgefäßes angebracht sein.

1.8.1.7. *Belüftung*

Die Prüfgefäße dürfen während der Prüfung nicht belüftet werden.

1.8.2. **Prüfkonzentration**

Im Normalfall sollten mindestens fünf Prüfkonzentrationen verwendet werden, die in einer geometrischen Reihe angeordnet sind und sich um einen Faktor von möglichst nicht mehr als 3,2 voneinander unterscheiden, und es sollte die angemessene Anzahl an Wiederholungen für jede Prüfkonzentration eingesetzt werden (siehe 1.8.1.3). Werden weniger als fünf Konzentrationen verwendet, sollte eine Begründung dafür angegeben werden. Substanzen sollten nicht oberhalb ihrer Löslichkeitsgrenze im dem Prüfmedium getestet werden.

▼B

Bei der Festlegung des Bereichs von Konzentrationen sollte Folgendes bedacht werden:

i) Wenn das Ziel die Ermittlung der LOEC/NOEC ist, muss die niedrigste Prüfkonzentration so niedrig sein, dass die Fruchtbarkeit bei dieser Konzentration nicht signifikant niedriger als in der Kontrolle ist. Ist dies nicht der Fall, muss die Prüfung mit einer geringeren niedrigsten Konzentration wiederholt werden.

ii) Wenn das Ziel die Bestimmung der LOEC/NOEC ist, muss die höchste Prüfkonzentration so hoch sein, dass die Fruchtbarkeit bei dieser Konzentration signifikant niedriger als in der Kontrolle ist. Ist dies nicht der Fall, muss die Prüfung mit einer höheren höchsten Konzentration wiederholt werden.

iii) Wenn die $EC_x$ für Wirkungen auf die Reproduktion geschätzt wird, ist es ratsam, hinreichende Konzentrationen zur Bestimmung der $EC_x$ mit einem angemessenen Vertrauensbereich zu verwenden. Wenn die $EC_{50}$ für Wirkungen auf die Reproduktion geschätzt wird, ist es ratsam, dass die höchste Prüfkonzentration höher als diese $EC_{50}$ ist. Andernfalls ist es zwar immer noch möglich, die $EC_{50}$ zu schätzen, der Vertrauensbereich für die $EC_{50}$ ist jedoch sehr weit, und es ist vielleicht nicht möglich, die Angemessenheit des angepassten Modells zufrieden stellend zu bewerten.

iv) Der Prüfkonzentrationsbereich sollte möglichst keine Konzentration beinhalten, die eine statistisch signifikante Wirkung auf das Überleben von erwachsenen Tieren hat, da dies die Art der Prüfung von einer einfachen Reproduktionsprüfung in eine kombinierte Reproduktions- und Mortalitätsprüfung verwandeln würde, für die eine deutlich komplexere statistische Auswertung erforderlich ist.

Wenn die Toxizität der Prüfsubstanz im Vorfeld bekannt ist (z. B. aus einer akuten Toxizitätsprüfung und/oder aus Voruntersuchungen zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs), dürfte dies bei der Auswahl geeigneter Prüfkonzentrationen helfen.

Wird ein Löse- oder Dispersionsmittel zur Herstellung der Prüflösungen verwendet (siehe Abschnitt 1.6.4), sollte dessen Endkonzentration in den Prüfgefäßen 0,1 ml/l nicht übersteigen und in allen Prüfgefäßen gleich sein.

1.8.3. **Kontrollen**

Eine Kontrollreihe mit dem Prüfmedium und, sofern zutreffend, auch eine Kontrollreihe mit dem Löse- oder Dispersionsmittel sollten zusätzlich zu den Testreihen durchgeführt werden. Werden Löse- oder Dispersionsmittel verwendet, sollte deren Konzentration gleich den Konzentrationen in den Gefäßen mit der Prüfsubstanz sein. Die entsprechende Anzahl an Wiederholungen sollte zum Einsatz kommen (siehe 1.8.1.3).

Im Allgemeinen sollte in einer ordentlich durchgeführten Prüfung der Variationskoeffizient rund um die mittlere Anzahl an lebenden Nachkommen, die pro Elterntier in der/den Kontrolle(n) produziert werden, $\leq$ 25 % sein, und dies sollte bei Prüfkonzepten mit einzeln gehaltenen Tieren protokolliert werden.

1.8.4. **Erneuerung des Prüfmediums**

Die Häufigkeit, mit der das Prüfmedium erneuert wird, hängt von der Stabilität der Prüfsubstanz ab. Jedoch sollte es zumindest dreimal pro Woche ausgetauscht werden. Wenn aus vorhergehenden Stabilitätsprüfungen (siehe 1.4) bekannt ist, dass die Konzentration der Prüfsubstanz während des maximalen Erneuerungszeitraums (d. h. 3 Tage) nicht stabil ist (d. h. außerhalb des Bereichs von 80 bis 120 % der nominalen Konzentration oder Unterschreitung von 80 % der gemessenen anfänglichen Konzentration), sollte ein häufigerer Wechsel des Prüfmediums oder der Einsatz einer Durchflussprüfung in Erwägung gezogen werden.

▼B

Wird das Medium in semistatischen Prüfungen erneuert, wird eine zweite Reihe von Prüfgefäßen vorbereitet, in die die Elterntiere beispielsweise mit einer Glaspipette von geeignetem Durchmesser umgesetzt werden. Dabei sollte die Menge an Prüfmedium, die zusammen mit den *Daphnien* umgesetzt wird, so gering wie möglich sein.

1.8.5. **Beobachtungen**

Die Ergebnisse der Beobachtungen während der Prüfung sollten auf Datenblättern (siehe Beispiele in Anlage 3 und 4) protokolliert werden. Sind andere Messungen erforderlich (siehe 1.3 und 1.8.8), sind gegebenenfalls weitere Beobachtungen vonnöten.

1.8.6. **Nachkommen**

Die Nachkommen, die von jedem Elterntier produziert werden, sollten vom Auftreten der ersten Brut an möglichst täglich entfernt und gezählt werden, um zu verhindern, dass diese die für die erwachsenen Tiere bestimmte Nahrung verbrauchen. Für diese Methode braucht zwar nur die Anzahl an lebenden Nachkommen gezählt zu werden, vorhandene unreife Eier oder tote Nachkommen sollten jedoch ebenfalls festgehalten werden.

1.8.7. **Mortalität**

Sterbefälle unter den Elterntieren sollten möglichst täglich protokolliert werden; sie sollten zumindest zu den gleichen Zeiten wie die Nachkommen gezählt werden.

1.8.8. **Sonstige Parameter**

Auch wenn dieses Verfahren in der Hauptsache zur Bewertung der Wirkungen auf die Reproduktion dienen soll, besteht die Möglichkeit, dass auch andere Auswirkungen in hinreichendem Maße für eine statistische Auswertung quantifiziert werden können. Besonders wünschenswert sind dabei Wachstumsmessungen, denn sie liefern Informationen über mögliche subletale Wirkungen, die unter Umständen nützlicher als die Reproduktionsmessung alleine sind; empfohlen wird die Vermessung der Länge der Elterntiere (d. h. die Körperlänge ohne Afterstachel) am Ende der Prüfung. Weitere Parameter, die sich messen oder berechnen lassen, sind unter anderem die Zeit bis zur Produktion der ersten Brut (und folgender Bruten), Anzahl und Umfang der Bruten je Tier, Anzahl an unreifen Eiern, Vorhandensein von männlichen Tieren oder Ephippien und die immanente Populationswachstumsrate.

1.8.9. **Häufigkeit von analytischen Bestimmungen und Messungen**

Die Sauerstoffkonzentration, die Temperatur, die Härte und pH-Werte sollten zumindest einmal pro Woche gemessen werden, und zwar in frischen und alten Medien, in der/den Kontrolle(n) und in der höchsten Konzentration der Prüfsubstanz.

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

Bei semistatischen Prüfungen, bei denen erwartet wird, dass die Konzentration der Prüfsubstanz innerhalb von ± 20 % der Nominalkonzentration konstant bleibt (d. h. innerhalb des Bereichs von 80 bis 120 % — siehe Abschnitt 1.4 und 1.8.4), wird empfohlen, dass zumindest die höchste und die niedrigste Prüfkonzentration, frisch hergestellt und zum Zeitpunkt des Austauschs, einmal während der ersten Woche der Prüfung analysiert werden (d. h. Analysen sollten anhand einer Probe derselben Lösung erfolgen — wenn diese frisch hergestellt ist und beim Austausch). Diese Bestimmungen sollten anschließend zumindest in wöchentlichen Abständen wiederholt werden.

▼B

Bei Prüfungen, bei denen nicht damit zu rechnen ist, dass die Konzentration der Prüfsubstanz innerhalb von ± 20 % der Nominalkonzentration konstant bleibt, ist es notwendig, alle Prüfkonzentrationen, frisch hergestellt und beim Austausch, zu analysieren. Bei denjenigen Prüfungen jedoch, bei denen die gemessene Anfangskonzentration der Prüfsubstanz zwar nicht innerhalb von ± 20 % der nominalen Konzentration stabil bleibt, bei der jedoch hinreichend nachgewiesen werden kann, dass die Anfangskonzentrationen reproduzierbar und stabil sind (d. h. innerhalb des Bereichs von 80 bis 120 % der Anfangskonzentrationen), könnten die chemischen Bestimmungen in Woche 2 und 3 der Prüfung auf die höchste und die niedrigste Konzentration reduziert werden. In allen Fällen braucht die Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentrationen vor der Erneuerung des Prüfmediums nur an einem Wiederholungsgefäß bei jeder Prüfkonzentration vorgenommen zu werden.

Bei einer Durchflussprüfung ist ein ähnliches Probenahmeverfahren wie für semistatische Prüfungen beschrieben angebracht (die Messung der „alten“ Lösungen gilt in diesem Fall jedoch nicht). Es kann allerdings ratsam sein, die Anzahl an Probenahmen in der ersten Woche zu erhöhen (z. B. drei Messreihen), um sicherzugehen, dass die Prüfkonzentrationen stabil bleiben. Bei diesen Prüfarten sollte die Durchsatzrate des Verdünnungsmittels und der Prüfsubstanz täglich überprüft werden.

Ist nachgewiesen, dass die Konzentration der geprüften Substanz während der gesamten Prüfung zufrieden stellend innerhalb von ± 20 % der Nominalkonzentration oder der gemessenen Anfangskonzentration bleibt, können die Ergebnisse auf nominalen oder gemessenen Anfangswerten beruhen. Wenn die Abweichung von der nominalen oder gemessenen Anfangskonzentration größer als ± 20 % ist, sollten die Ergebnisse als zeitgewichtetes Mittel dargestellt werden (siehe Anlage 5).

## 2. DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

### 2.1. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Mit dieser Prüfung soll die Wirkung der Prüfsubstanz auf die Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen, die pro am Ende der Prüfung noch lebendem Elterntier produziert wurden, bestimmt werden. Dabei sollte die Gesamtanzahl an Nachkommen je Elterntier für jedes Prüfgefäß (d. h. für jede Wiederholung) berechnet werden. Wenn in einer Wiederholung das Elterntier während der Prüfung stirbt oder sich als Männchen herausstellt, dann wird die Wiederholung von der Analyse ausgeschlossen. Die Analyse beruht dann auf einer verringerten Anzahl von Wiederholungen.

Zur Schätzung der LOEC und damit auch der NOEC für Wirkungen der Chemikalie auf die Reproduktionsleistung müssen die mittlere Reproduktionsleistung unter den Wiederholungen für jede Konzentration und die gepoolte Reststandardabweichung berechnet werden; dies kann durch eine Varianzanalyse (ANOVA) erfolgen. Der Mittelwert für jede Konzentration muss dann mit Hilfe einer angemessenen Mehrfachvergleichsmethode mit dem Kontrollmittelwert verglichen werden. Von Nutzen können dabei Dunnett’sche oder Williams’sche Tests sein (14) (15) (16) (17). Überprüft werden muss, ob die ANOVA-Voraussetzung der Homogenität der Varianz zutreffend ist. Es wird empfohlen, dies eher grafisch als durch eine formale Signifikanzprüfung zu ermitteln (18); eine geeignete Alternative besteht in der Durchführung eines Bartlett’schen Tests. Gilt diese Annahme nicht, sollte überlegt werden, die Daten zur Homogenisierung von Varianzen vor der Durchführung der ANOVA zu transformieren oder eine gewichtete ANOVA durchzuführen. Der Umfang der mit der ANOVA nachweisbaren Wirkung (d. h. die geringste signifikante Differenz) sollte berechnet und protokolliert werden.

▼B

Zur Schätzung der Konzentration, die eine 50 %ige Verringerung der Reproduktionsleistung verursachen würde (d. h. die $EC_{50}$), sollte eine geeignete Kurve wie beispielsweise die logistische Kurve an die Daten unter Einsatz eines statistischen Verfahrens wie der Methode der kleinsten Quadrate angepasst werden. Die Kurve könnte so parametriert werden, dass die $EC_{50}$ und deren Standardfehler direkt abgeschätzt werden können. Dies würde die Berechnung des Vertrauensbereichs für die $EC_{50}$ deutlich erleichtern. Soweit keine guten Gründe dafür vorliegen, anderen Vertrauensbereichen den Vorzug zu geben, sollte der zweiseitige 95 %-Vertrauensbereich angegeben werden. Das Anpassungsverfahren sollte möglichst einen Weg bieten, um die Signifikanz der mangelnden Anpassung zu bewerten. Dies kann grafisch erfolgen oder indem man die Restsumme der Quadrate in „mangelnde Anpassung“ und „reine Fehlerkomponenten“ unterteilt und eine Signifikanzprüfung für die mangelnde Anpassung durchführt. Da Behandlungen, die zu einer höheren Fruchtbarkeit führen, wahrscheinlich eine größere Varianz in der Anzahl an produzierten Jungtieren aufweisen als Behandlungen, die eine niedrige Fruchtbarkeit ergeben, sollte eine Gewichtung der beobachteten Werte in Erwägung gezogen werden, um den unterschiedlichen Varianzen in den verschiedenen Behandlungsgruppen Rechnung zu tragen (Hintergrundinformationen siehe Literaturhinweis 18).

Bei der Analyse der Daten aus dem endgültigen Ringversuch (2) wurde eine logistische Kurve anhand des folgenden Modells angepasst, auch wenn andere geeignete Modelle herangezogen werden können:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

Dabei gilt:

Y = Gesamtanzahl an Jungtieren pro Elterntier, das am Ende der Prüfung noch lebt (für jedes Gefäß berechnet)

x = Konzentration der Substanz

c = Erwartete Anzahl an Jungtieren bei x = 0

$x_0$ = $EC_{50}$ in der Population

b = Steigungsparameter.

Dieses Modell kommt wahrscheinlich für eine große Anzahl von Situationen in Frage, es wird jedoch Prüfungen geben, bei denen es nicht angemessen ist. Wie oben angeregt, sollte die Validität des Modells überprüft werden. In einigen Fällen kann auch ein Hormesis-Modell, bei dem niedrige Konzentrationen zu größeren Wirkungen führen, angebracht sein (19).

Andere Wirkkonzentrationen wie die $EC_{10}$ oder $EC_{20}$ können ebenfalls geschätzt werden, auch wenn vielleicht besser eine andere Parametrierung für das Modell als bei der Schätzung der $EC_{50}$ zu verwenden ist.

2.2. ABSCHLUSSBERICHT

Der Prüfbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

2.2.1. **Prüfsubstanz**

— Physikalische Beschaffenheit und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

▼B

— Daten zur chemischen Identität, einschließlich Reinheit.

2.2.2. **Geprüfte Daphnienart**

— Der Klon (ob er einer Gentypisierung unterzogen wurde), der Lieferant oder die Bezugsquelle (sofern bekannt) und die zum Einsatz kommenden Kulturbedingungen. Wird eine andere Art als Daphnia magna eingesetzt, sollte dies protokolliert und begründet werden.

2.2.3. **Prüfbedingungen**

— Zum Einsatz kommendes Prüfverfahren (z. B. semistatisches oder Durchflussverfahren, Volumen, Besatz mit Anzahl Daphnien pro Liter);

— Belichtungsdauer und Lichtstärke;

— Auslegung der Prüfung (z. B. Anzahl an Wiederholungen, Anzahl an Elterntieren je Wiederholung);

— nähere Angaben zum verwendeten Kulturmedium:

— sofern verwendet, zugesetztes organisches Material, einschließlich Zusammensetzung, Herkunft, Herstellungsverfahren, TOC/-COD der Stammansätze, Schätzung des sich daraus ergebenden TOC/COD im Prüfmedium;

— detaillierte Informationen über die Fütterung, einschließlich Menge (in mg C/Daphnie/Tag) und Plan (z. B. Art von Futtermittel(n), einschließlich spezifischer Name (Art) bei Algen und, sofern bekannt, der Stamm, die Kulturbedingungen);

— Art der Herstellung von Stammansätzen und Häufigkeit der Erneuerung (sofern verwendet, müssen das Löse- oder Dispersionsmittel und dessen Konzentration angegeben werden).

2.2.4. **Ergebnisse**

— Ergebnisse von eventuellen vorhergehenden Untersuchungen zur Stabilität der Prüfsubstanz;

— die nominalen Prüfkonzentrationen und die Ergebnisse aller Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz in den Prüfgefäßen (siehe Beispieldatenblätter in Anlage 4); die Restitutionsgüte der Methode und die Bestimmungsgrenze sollten ebenfalls protokolliert werden;

— Wasserqualität innerhalb der Prüfgefäße (d. h. pH-Wert, Temperatur und gelöste Sauerstoffkonzentration sowie TOC und/oder COD und Härte, soweit zutreffend) (siehe Beispieldatenblatt in Anlage 3);

— die gesamte Aufzeichnung der lebenden Nachkommen für jedes Elterntier (siehe Beispieldatenblatt in Anlage 3);

— die Anzahl an Todesfällen unter den Elterntieren und der Tag, an dem diese eingetreten sind (siehe Beispieldatenblatt in Anlage 3);

— der Variationskoeffizient für die Kontrollfruchtbarkeit (anhand der Gesamtanzahl von lebenden Nachkommen je Elterntier, das am Ende der Prüfung noch lebt);

— Darstellung der Gesamtanzahl an lebenden Nachkommen je Elterntier (für jede Wiederholung), das am Ende der Prüfung noch lebt, im Verhältnis zur Prüfkonzentration der Prüfsubstanz;

— die Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) für die Reproduktion, einschließlich einer Beschreibung der eingesetzten statistischen Verfahren und einer Angabe zum Umfang der Wirkung, die nachgewiesen werden konnte, und die No Observed Effect Concentration (NOEC) für die Reproduktion; soweit zutreffend, sollten die LOEC/NOEC für die Mortalität der Elterntiere ebenfalls protokolliert werden;

▼B

— soweit zutreffend, die $EC_x$ für die Reproduktion und die Vertrauensbereiche und ein Diagramm für das angepasste Modell, das für deren Berechnung herangezogen wurde, die Steigung der Dosisreaktionskurve und deren Standardfehler;

— andere beobachtete biologische Wirkungen oder Messungen: alle anderen biologischen Wirkungen dokumentieren, die beobachtet oder gemessen wurden (z. B. Wachstum von Elterntieren), einschließlich einer angemessenen Begründung;

— eine Erklärung für eine eventuelle Abweichung von der Prüfmethode.

3. **LITERATURHINWEISE**

(1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20-21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the Daphnia *magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D. J., Barber J., Bradley M. C., Soares A. M. V. M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, pp. 257-265.

(4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, pp. 25-33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as Standard medium for culturing Daphnia *magna.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, pp. 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(8) Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H. Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), pp. 144-148.

(9) Parkhurst B. R., Forte J. L. and Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, pp. 1-8.

(10) Cowgill U. M. and Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), pp. 185-196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I. R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a Standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, pp. 2053-2058.

▼B

(13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, pp. 459-466.

(14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.

(15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

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

(17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, pp. 510-531.

(18) Draper N, R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is Stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29. pp. 93-96.

(20) Wilson E. O. and Bossen, W. H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R. W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, pp. 5 32.

(22) Meyer J. S. . Ingersoll C. G., McDonald L. L. and Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, pp. 1156-1166.

▼B

*Anlage 1*

## HERSTELLUNG DER VOLLSTÄNDIG DEFINIERTEN MEDIEN ELENDT M7 UND M4

### Gewöhnung an die Medien Elendt M7 und M4

Einige Prüfeinrichtungen haben Schwierigkeiten, *Daphnien* direkt in die Medien M4 (1) und M7 umzusetzen. Erfolg wurde jedoch mit einer schrittweisen Eingewöhnung erzielt, d. h. dem Wechsel von dem eigenen Medium in 30 %iges Elendt, dann in 60 %iges Elendt und dann in 100 %iges Elendt. Die Eingewöhnungszeiten können dabei durchaus einen Monat betragen.

HERSTELLUNG

### Spurenelemente

Zunächst werden gesonderte Stammansätze (I) einzelner Spurenelemente in Wasser mit geeignetem Reinheitsgrad, z. B. entionisiertes oder destilliertes Wasser oder Wasser aus umgekehrter Osmose, hergestellt. Aus diesen unterschiedlichen Stammansätzen (I) wird ein zweiter alleiniger Stammansatz (II) hergestellt, der alle Spurenelemente enthält (kombinierte Lösung), d. h.:

| Stammansätze I (einzelne Substanz) | Wasser zugesetzte Menge (mg/l) | Konzentration (in Verhältnis zum Medium M4) (x-fach) | Zur Herstellung des kombinierten Stammansatzes II zu Wasser die folgende Menge an Stammansatz I zugeben (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ | 57 190 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| $MnCl_2$ * 4 $H_20$ | 7 210 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| LiCl | 6 120 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| RbCl | 1 420 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| $SrCl_2$ * 6 $H_2O$ | 3 040 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| NaBr | 320 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| $Na_2MoO_4$ * 2 $H_2O$ | 1 260 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| $CuCl_2$ * 2 $H_20$ | 335 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 20 000 | 1,0 | 1,0 |
| $CoCl_2$ * 6 $H_20$ | 200 | 20 000 | 1,0 | 1,0 |
| Kl | 65 | 20 000 | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2SeO_3$ | 43,8 | 20 000 | 1,0 | 1,0 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 20 000 | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2EDTA$ * 2 $H_2O$ | 5 000 | 2 000 | — | — |
| $FeSO_4$ * $H_2O$ | 1 991 | 2 000 | — | — |

Sowohl die $Na_2EDTA$- als auch die $FeSO_4$-Lösung werden einzeln hergestellt, zusammengegossen und sofort im Autoklaven behandelt. Dies ergibt:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 21 Fe-EDTA-Lösung | | 1 000 | 20,0 | 5,0 |

▼B

**Medien M4 und M7**

Die Medien M4 und M7 werden anhand des Stammansatzes II, der Makronährstoffe und Vitamine wie folgt hergestellt:

| | Wasser zugesetzte Menge (mg/l) | Konzentration (im Verhältnis zum Medium M4) (x-fach) | Zur Herstellung des Mediums zugesetzte Menge an Stammansatz (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| Stammansatz II kombinierte Spurenelemente | | 20 | 50 | 50 |
| Makronährstoff-Stammansätze (einzelne Substanz) | | | | |
| $CaCl_2$ * 2 $H_2O$ | 293 800 | 1 000 | 1,0 | 1,0 |
| $MgSO_4$ * 7 $H_2O$ | 246 600 | 2 000 | 0,5 | 0,5 |
| KC1 | 58 000 | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1 000 | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2SiO_3$ * 9 $H_2O$ | 50 000 | 5 000 | 0,2 | 0,2 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| Kombinierter Vitaminstammansatz | — | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| Der kombinierte Vitaminstammansatz wird hergestellt, indem man die 3 Vitamine einem Liter Wasser zusetzt, wie im Folgenden angegeben: | | | | |
| Thiaminhydrochlorid | 750 | 10 000 | — | — |
| Cyanocobalamine ($B_{12}$) | 10 | 10 000 | — | — |
| Biotine | 7,5 | 10 000 | — | — |

Der kombinierte Vitaminstammansatz wird in kleinen Portionen tiefgefroren aufbewahrt. Vitamine werden den Medien kurz vor der Verwendung zugesetzt.

Hinweise Um die Ausfällung von Salzen bei der Herstellung der vollständigen Medien zu vermeiden, die Portionen von Stammansätzen in etwa 500 bis 800 ml Wasser entionisiertes Wasser geben und dann auf 1 Liter auffüllen.

Erstmals in einer Publikation erwähnt wird das Medium M4 bei Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-3 3.

▼B

*Anlage 2*

**ANALYSE DES GESAMTEN ORGANISCHEN KOHLENSTOFFS (TOC) UND ERSTELLUNG VON NOMOGRAMMEN FÜR DEN TOC-GEHALT VON ALGENFUTTER**

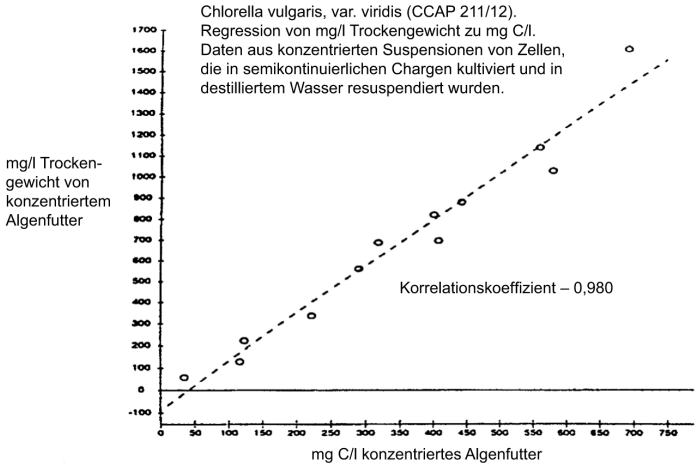
Bekanntermaßen wird der Kohlenstoffgehalt des Algenfutters normalerweise nicht direkt gemessen, sondern aus Korrelationen (d. h. Nomogrammen) mit Ersatzgrößen wie der Algenzeilenzahl oder der Lichtextinktion abgeleitet.

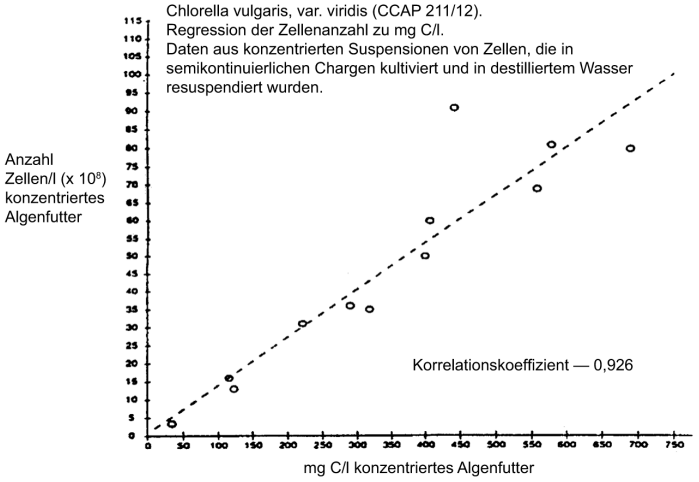
Der TOC sollte eher durch Oxidation bei hoher Temperatur als durch UV- oder Persulfatmethoden gemessen werden (siehe hierzu auch: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Für die Erstellung von Nomogrammen sollten die Algen durch Zentrifugierung von dem Wachstumsmedium getrennt werden, gefolgt von einer Resuspension in destilliertem Wasser. Den Ersatzparameter und die TOC-Konzentration in jeder Probe in einer Dreifachwiederholung messen. Es sollten Blindproben des destillierten Wassers analysiert und die TOC-Konzentration von der TOC-Konzentration in der Algenprobe abgeleitet werden.

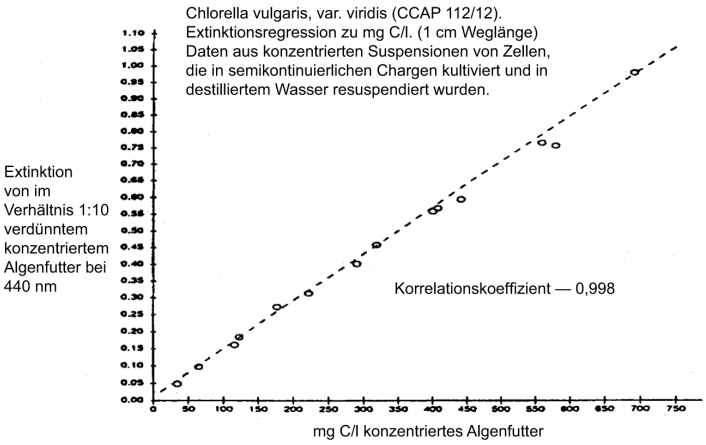
Nomogramme sollten über den geforderten Bereich von Kohlenstoffkonzentrationen linear verlaufen. Beispiele hierzu finden sich weiter unten.

Hinweis: Diese Beispiele sollten nicht für Umrechnungen herangezogen werden; wichtig ist, dass die Prüfeinrichtungen ihre eigenen Nomogramme erstellen.



▼B


Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/12).
Extinktionsregression zu mg C/l. (1 cm Weglänge)
Daten aus konzentrierten Suspensionen von Zellen, die in semikontinuierlichen Chargen kultiviert und in destilliertem Wasser resuspendiert wurden.
Extinktion von im Verhältnis 1:10 verdünntem konzentriertem Algenfutter bei 440 nm
Korrelationskoeffizient — 0,998
mg C/l konzentriertes Algenfutter

▼B

*Anlage 3*

**BEISPIELDATENBLATT ZUR PROTOKOLLIERUNG DER ERNEUERUNG DES PRÜFMEDIUMS, VON PHYSIKALISCH-CHEMISCHEN ÜBERWACHUNGSDATEN, DER FÜTTERUNG, DAPHNIEN-REPRODUKTION UND MORTALITÄT VON ERWACHSENEN TIEREN**

| Versuch Nr. | Ausgangsdaten: | | | | Klon: | | | | Medium: | | | | | Futterart: | | | | Prüfsubstanz: | | | | | Nominale Konz.: | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tag | 0 | I | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | | |
| Mediumerneuerung ankreuzen) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pH-Wert ([1]) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | neu | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | alt | |
| $O_2$ mg/l ([1]) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | neu | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | alt | |
| Temp. ( °C) ([1]) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | neu | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | alt | |
| Geb. Futter (ankreuzen) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Anz. leb. Nachkommen ([2]) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Gesamt |
| Gefäß 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

2008R0440 — DE — 22.03.2014 — 004.001 — 1124

▼B

| Versuch Nr. | Ausgangsdaten: | | | | Klon: | | | | Medium: | | | | | Futterart: | | | | Prüfsubstanz: | | | | | Nominale Konz.: | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tag | 0 | I | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Gesamt | |
| Kumulative Mortalität bei erwachs. Tieren ([3]) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

([1]) Angeben, welches Gefäß für den Versuch verwendet wurde.
([2]) Unreife Bruten als „AB“ in dem betreffenden Kästchen protokollieren.
([3]) Die Mortalität von erwachsenen Tieren als „M“ in dem betreffenden Kästchen protokollieren.

▼B

*Anlage 4*

**BEISPIELDATENBLATT ZUR PROTOKOLLIERUNG VON ERGEBNISSEN DER CHEMISCHEN ANALYSE**

a) **Gemessene Konzentrationen**

| Nominale Konz. | Woche 1 Probe | | Woche 2 Probe | | Woche 3 Probe | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Frisch | Alt | Frisch | Alt | Frisch | Alt |
| | | | | | | |

b) **Gemessene Konzentrationen in Prozent der Nominalkonzentrationen**

| Nominale Konz. | Woche 1 Probe | | Woche 2 Probe | | Woche 3 Probe | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Frisch | Alt | Frisch | Alt | Frisch | Alt |
| | | | | | | |

▼B

*Anlage 5*

## BERECHNUNG EINES ZEITGEWICHTETEN MITTELS

### Zeitgewichtetes Mittel

In Anbetracht der Tatsache, dass sich die Konzentration der Prüfsubstanz während des Zeitraums zwischen den Erneuerungen des Prüfmediums verringern kann, muss überlegt werden, welche Konzentration als für den Konzentrationsbereich, dem die Elterndaphnien ausgesetzt werden, repräsentativ ausgewählt werden sollte. Die Auswahl sollte dabei sowohl auf biologischen als auch auf statistischen Erwägungen beruhen. Wenn man beispielsweise davon ausgeht, dass die Reproduktion am stärksten durch die zur Anwendung kommende Spitzenkonzentration beeinflusst wird, dann sollte die maximale Konzentration herangezogen werden. Wenn jedoch die kumulierte oder längerfristige Wirkung der toxischen Substanz für wichtiger gehalten wird, dann hat eine Durchschnittskonzentration eine größere Relevanz. In diesem Fall besteht ein geeigneter anzusetzender Durchschnittswert aus der zeitgewichteten mittleren Konzentration, da hierbei die Streubreite der Augenblickskonzentration im Laufe der Zeit berücksichtigt wird.

**Bild 1:**

**Beispiel für ein zeitgewichtetes Mittel**

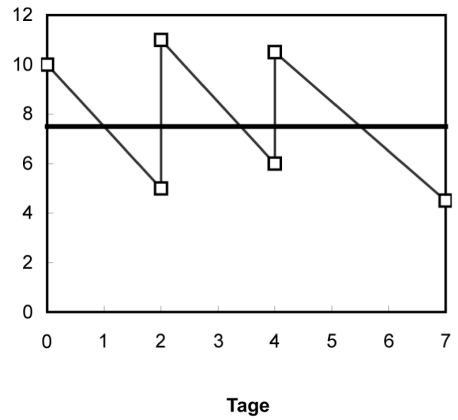



Bild 1 zeigt ein Beispiel für eine (vereinfachte) Prüfung, die 7 Tage dauert und bei der an Tag 0, 2 und 4 das Prüfmedium erneuert wird.

Die dünne Zickzacklinie stellt die Konzentration zu jedem Zeitpunkt dar. Es wird angenommen, dass der Rückgang der Konzentration einem exponentiellen Zerfallsprozess folgt.

Die 6 eingezeichneten Punkte stellen die beobachteten Konzentrationen dar, die am Anfang und am Ende eines jeden Erneuerungszeitraums gemessen wurden.

Die dicke durchgezogene Linie gibt die Lage des zeitgewichteten Mittels an.

Das zeitgewichtete Mittel wird so berechnet, dass die Fläche unterhalb des zeitgewichteten Mittels gleich der Fläche unterhalb der Konzentrationskurve ist. Die Berechnung für das oben genannte Beispiel wird in Tabelle 1 dargestellt.

▼B

*Table 1:*

**Berechnung des zeitgewichteten Mittels**

| Erneuerung Nr. | Tage | Konz0 | Konz1 | Ln (Konz0) | Ln (Konz1) | Fläche |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 10,000 | 4,493 | 2,303 | 1,503 | 13,767 |
| 2 | 2 | 11,000 | 6,037 | 2,398 | 1,798 | 16,544 |
| 3 | 3 | 10,000 | 4,066 | 2,303 | 1,403 | 19,781 |
| Gesamtanzahl Tage: 7 | | | | | Gesamtfläche | 50,091 |
| | | | | | Zeitgew. Mittel | 7,156 |

„Tage“ steht für die Anzahl von Tagen des Erneuerungszeitraums.

„Konz0“ ist die gemessene Konzentration zu Beginn eines jeden Erneuerungszeitraums.

„Konz1“ ist die gemessene Konzentration am Ende eines jeden Erneuerungszeitraums.

„Ln(Konz0)“ ist der natürliche Logarithmus von Konz0.

„Ln(Konz1)“ ist der natürliche Logarithmus von Konz1.

„Fläche“ ist die Fläche unter der exponentiellen Kurve für jeden Erneuerungszeitraum. Sie wird wie folgt berechnet:

$$Fläche = \frac{\text{Konz0} - Konz1}{\text{Ln(Konz0)} - \text{Ln}(Konz1)} \times Tage$$

Das zeitgewichtete Mittel (zeitgew. Mittel) ist gleich der „Gesamtfläche“ dividiert durch die „Gesamtanzahl Tage“.

Natürlich müsste die Tabelle für die Daphnien-Reproduktionsprüfung auf einen Zeitraum von 21 Tagen erweitert werden.

Klar ist, dass, wenn Beobachtungen nur am Anfang und am Ende eines jeden Erneuerungszeitraums erfolgen, nicht bestätigt werden kann, ob der Zerfallsprozess tatsächlich exponentiell verläuft. Eine andere Kurve würde zu einer anderen Berechnung für die „Fläche“ führen. Jedoch ist ein exponentieller Zerfallsprozess durchaus plausibel und wahrscheinlich die beste Kurve, die bei Fehlen anderer Informationen zu verwenden ist.

Vorsicht ist allerdings geboten, wenn in der chemischen Analyse am Ende des Erneuerungszeitraums keine Substanz gefunden wird. Sofern keine Möglichkeit besteht, abzuschätzen, wie schnell die Substanz aus der Lösung verschwunden ist, ist es unmöglich, eine realistische Fläche unter der Kurve zu erhalten, und damit auch unmöglich, ein vernünftiges zeitgewichtetes Mittel zu bestimmen.

▼B

## C.21. BODENMIKROORGANISMEN: STICKSTOFFTRANSFORMATIONSSTEST

### 1. METHODE

Diese Testmethode entspricht der Prüfrichtlinie OECD TG 216 (2000).

### 1.1. EINLEITUNG

Diese Testmethode beschreibt eine Labormethode zur Untersuchung der Langzeitauswirkungen von Chemikalien auf die Stickstofftransformationsaktivität von Bodenmikroorganismen nach einmaliger Exposition. Der Test beruht im Wesentlichen auf den Empfehlungen der Pflanzenschutzorganisation für Europa und den Mittelmeerraum (1), doch auch andere Richtlinien wurden berücksichtigt, wie die der deutschen Biologischen Bundesanstalt (2), der US-amerikanischen Environmental Protection Agency (3), SETAC (4) und von der Internationalen Organisation für Normung (5). Auf einem OECD-Workshop zur Boden-/Sedimentauswahl, der 1995 im italienischen Belgirate stattfand (6), wurden die bei diesem Test zu verwendende Anzahl und Art von Böden vereinbart. Die Empfehlungen zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Bodenproben basieren auf einer ISO-Anleitung (7) und auf Empfehlungen des Belgirate-Workshops. Bei der Be- und Auswertung toxischer Eigenschaften von Testsubstanzen kann eine Bestimmung der Auswirkungen auf die mikrobielle Aktivität des Bodens erforderlich sein, z. B. wenn Daten zu möglichen Nebenwirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf die Mikroflora des Bodens benötigt werden oder wenn eine Exposition von Bodenmikroorganismen gegenüber anderen Chemikalien als Pflanzenschutzmitteln erwartet wird. Der Stickstofftransformationstest wird durchgeführt, um den Einfluss derartiger Chemikalien auf die Bodenmikroflora zu ermitteln. Bei der Prüfung von Agrochemikalien (z. B. Pflanzenschutzmittel, Düngemittel, Forstchemikalien), werden sowohl Stickstoff- als auch Kohlenstofftransformationstests durchgeführt. Bei anderen Substanzen als Agrochemikalien genügt der Stickstofftransformationstest. Liegen jedoch die $EC_{50}$-Werte des Stickstofftransformationstests bei diesen Chemikalien im Bereich, der für käufliche Nitrifikationshemmstoffe (z. B. Nitrapyrin) ermittelt wurde, kann ein Kohlenstofftransformationstest durchgeführt werden, um weitere Informationen zu gewinnen,

Boden besteht sowohl aus lebenden als auch aus nichtlebenden Komponenten, die in komplexen und heterogenen Gemischen vorkommen. Beim Abbau organischen Materials und seiner Transformation in fruchtbaren Böden spielen Mikroorganismen eine wichtige Rolle, wobei viele Arten für unterschiedliche Aspekte der Bodenfruchtbarkeit verantwortlich sind. Jede langfristige Störung dieser biochemischen Prozesse kann sich potenziell auf den Nährstoffkreislauf auswirken und dadurch wiederum die Bodenfruchtbarkeit beeinflussen. Die Transformation von Kohlenstoff und Stickstoff erfolgt in allen fruchtbaren Böden. Die Transformationspfade sind im Wesentlichen gleich, auch wenn je nach Boden unterschiedliche mikrobielle Populationen für diese Prozesse verantwortlich sind.

Mit der hier beschriebenen Testmethode können durch einen Stoff hervorgerufene langfristige nachteilige Auswirkungen auf den Prozess der Stickstofftransformation in aeroben Oberböden bestimmt werden. Darüber hinaus ermöglicht die Testmethode die Abschätzung der Auswirkungen von Substanzen auf die Kohlenstoffumwandlung durch die Bodenmikroflora. Die Nitratbildung findet nach dem Zerfall der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen statt. Werden also bei behandelten und Kontrollböden gleiche Nitratbildungsraten festgestellt, sind höchstwahrscheinlich die wichtigsten Kohlenstoffabbauwege intakt und funktionstüchtig. Das für den Test gewählte Substrat (pulverisiertes Luzernemehl) besitzt ein günstiges Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis (in der Regel zwischen 12:1 und 16:1). Deshalb wird der Kohlenstoffmangel während des Tests verringert, und sollten mikrobielle Populationen durch eine Chemikalie geschädigt werden, könnten sie sich innerhalb von 100 Tagen wieder erholen.

▼B

Die Tests, auf deren Grundlage diese Testmethode entwickelt wurde, waren in erster Linie für Substanzen ausgelegt, bei denen die in den Boden gelangende Menge vorherbestimmt werden kann. Dies ist z. B. bei Pflanzenschutzmitteln der Fall, bei denen die Applikationsrate auf dem Feld bekannt ist. Bei Agrochemikalien genügt es, zwei Konzentrationen zu testen, die für die erwartete oder vorhergesagte Applikationsmenge relevant sind. Agrochemikalien können als Wirkstoffe (a.i.) oder als formulierte Handelsprodukte getestet werden. Der Test ist jedoch nicht auf Agrochemikalien begrenzt. Durch Veränderung sowohl der Mengen der auf den Boden aufgebrachten Testsubstanz als auch der Art und Weise, wie die Daten ausgewertet werden, kann der Test auch für Chemikalien angewendet werden, bei denen nicht bekannt ist, in welcher Menge sie in den Boden gelangen. Somit werden bei anderen Substanzen als Agrochemikalien die Wirkungen einer Reihe von Konzentrationen auf die Stickstoffumwandlung bestimmt. Die Daten dieser Tests werden verwendet, um eine Dosis-Wirkungs-Kurve zu erstellen und $EC_x$-Werte zu berechnen, wobei x als die Wirkung in % definiert ist.

1.2. DEFINITIONEN

Stickstofftransformation: der Endabbau stickstoffhaltiger organischer Substanz durch Mikroorganismen über die Schritte Ammonifikation und Nitrifikation zum entsprechenden anorganischen Endprodukt Nitrat.

**$EC_x$** (Effektkonzentration): diejenige Konzentration der Testsubstanz im Boden, die die Umwandlung von Stickstoff in Nitrat zu x % hemmt.

**$EC_{50}$** (Medianwert der Effektkonzentration): diejenige Konzentration der Testsubstanz im Boden, die die Transformation von Stickstoff in Nitrat zu 50 Prozent (50 %) hemmt.

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Keine.

1.4. PRINZIP DER TESTMETHODE

Gesiebter Boden wird mit pulverisiertem Pflanzenmehl angereichert und entweder mit der Testsubstanz behandelt oder unbehandelt (Kontrollprobe) belassen. Werden Agrochemikalien geprüft, wird eine Mindestanzahl von zwei Testkonzentrationen empfohlen, die im Verhältnis zur höchsten auf dem Feld erwarteten Konzentration gewählt werden sollten. Nach 0, 7, 14 und 28 Tagen Inkubation werden Proben behandelter und unbehandelter Böden mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert, und die Nitratmengen in den Extrakten bestimmt. Die Nitratbildungsrate in behandelten Proben wird mit der in den Kontrollproben verglichen, und es wird die prozentuale Abweichung der behandelten Proben von den Kontrollproben berechnet. Alle Versuche laufen über mindestens 28 Tage. Sind die Differenzen zwischen behandelten und unbehandelten Böden am 28. Tag gleich oder größer als 25 %, werden die Messungen bis zur Höchstdauer von 100 Tagen fortgesetzt. Werden andere Substanzen als Agrochemikalien geprüft, wird die Testsubstanz in einer Reihe von Konzentrationen Proben des Bodens zugesetzt, und nach 28 Tagen Inkubation werden die Mengen des gebildeten Nitrats in behandelten Proben und in Kontrollproben gemessen. Die Ergebnisse aus Versuchen mit mehreren unterschiedlichen Konzentrationen werden mit Hilfe eines Regressionsmodells analysiert, und die $EC_x$-Werte berechnet (d. h. $EC_{50}$, $EC_{25}$ und/oder $EC_{10}$). Siehe Definitionen.

1.5. VALIDITÄT DES TESTS

Auswertungen von Testergebnissen mit Agrochemikalien beruhen auf vergleichsweise kleinen Differenzen (d. h. Mittelwert ± 25 %) zwischen Nitratkonzentrationen in Kontrollproben und behandelten Bodenproben, so dass große Schwankungen bei den Kontrollproben zu falschen Ergebnissen führen können. Daher sollte die Schwankungsbreite zwischen Replikatkontrollproben weniger als ± 15 % betragen.

▼B

1.6. BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.6.1. **Geräte**

Es werden Testgefäße aus chemisch inertem Material verwendet. Ihr Fassungsvermögen sollte sich nach dem gewählten Inkubationsverfahren der Böden richten, d. h. für die Inkubation von Sammelproben oder einer Reihe einzelner Bodenproben (siehe 1.7.1.2). Während des Tests ist darauf zu achten, dass sowohl der Wasserverlust möglichst gering gehalten wird als auch ein Gasaustausch stattfinden kann (so könnten die Testbehälter z. B. mit perforierter Polyethylenfolie abgedeckt werden). Beim Testen flüchtiger Substanzen sind abdichtbare und gasdichte Behälter zu verwenden. Diese sollten in ihrer Größe so bemessen sein, dass sie etwa zu einem Viertel ihres Volumens mit der Bodenprobe gefüllt sind.

Verwendet werden Standardlaborgeräte, darunter folgende:

— Schüttelvorrichtung: mechanischer Schüttler oder gleichwertiges Gerät;

— Zentrifuge (3 000 g) oder Filtriervorrichtung (mit nitratfreiem Filterpapier);

— Messgerät mit geeigneter Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit für die Nitratanalyse.

1.6.2. **Auswahl und Anzahl der Röden**

Es wird ein einziger Boden verwendet. Empfohlen wird Boden mit folgenden Eigenschaften:

— Sandgehalt: mindestens 50 % und höchstens 75 %;

— pH: 5,5-7,5;

— organischer Kohlenstoffgehalt: 0,5-1,5 %;

— es ist die mikrobielle Biomasse zu bestimmen (8) (9), und ihr Kohlenstoffgehalt sollte mindestens 1 % des gesamten organischen Kohlenstoffs des Bodens betragen.

Meist stellt ein Boden mit diesen Eigenschaften den „worst case“ dar, da seine Adsorption minimal und die Verfügbarkeit der Testchemikalie für die Mikroflora maximal ist. Demnach sind in aller Regel keine Tests mit anderen Böden notwendig. Unter bestimmten Umständen jedoch, wenn z. B. der erwartete hauptsächliche Einsatz der Testsubstanz auf bestimmten Böden wie sauren Waldböden stattfindet, oder bei elektrostatisch aufgeladenen Chemikalien kann es erforderlich sein, einen zusätzlichen Boden zu verwenden.

▼B

1.6.3. **Entnahme und Lagerung von Bodenproben**

1.6.3.1. *Entnahme*

Es sind ausführliche Informationen über die Vorgeschichte des Feldstandorts erforderlich, von dem der Testboden entnommen wird. Diese Angaben beinhalten unter anderem die genaue Lage, den Bewuchs, die Behandlung mit Pflanzenschutzmitteln sowie mit organischen und anorganischen Düngemitteln, Zugaben biologischen Materials oder unbeabsichtigte Kontaminationen. Der für die Bodenentnahme gewählte Standort muss über einen längeren Zeitraum hinweg nutzbar sein. Geeignet sind Dauerweiden, Felder mit einjährigen Getreidekulturen (ausgenommen Mais) oder dicht gesäten Gründüngungspflanzen. Der gewählte Probenahmestandort sollte mindestens ein Jahr vor der Probenahme nicht mit Pflanzenschutzmitteln behandelt worden sein. Ferner sollten mindestens sechs Monate vorher keine organischen Düngemittel ausgebracht worden sein. Die Verwendung von Mineraldünger ist nur zulässig, wenn dies für die Kultur erforderlich ist, und die Entnahme der Bodenproben sollte frühestens drei Monate nach Ausbringung des Düngemittels erfolgen. Zu vermeiden ist die Verwendung von Boden, der mit Düngemitteln mit bekannter biozider Wirkung (z. B. Kalkstickstoff) behandelt wurde.

Die Probenahme während oder unmittelbar nach längeren (mehr als 30 Tage) Dürre- oder Überschwemmungsperioden sollte vermieden werden. Bei gepflügten Böden sind die Proben aus einer Tiefe von 0 bis 20 cm zu entnehmen. Bei Grünland (Weiden) oder anderen Böden, die über längere Zeiträume (mindestens eine Vegetationsperiode) nicht gepflügt werden, kann die maximale Tiefe der Probenahme geringfügig über 20 cm liegen (z. B. bei bis zu 25 cm).

Die Bodenproben sollten in Behältern und unter Temperaturbedingungen transportiert werden, die sicherstellen, dass die ursprünglichen Bodeneigenschaften nicht wesentlich verändert werden.

1.6.3.2. *Lagerung*

Bevorzugt wird die Verwendung feldfrischer Böden. Lässt sich die Lagerung im Labor nicht vermeiden, sollten die Böden im Dunkeln bei 4 ± 2 °C höchstens drei Monate gelagert werden. Während der Lagerung der Böden müssen aerobe Bedingungen sichergestellt sein. Werden Böden von Flächen entnommen, die über mindestens drei Monate im Jahr gefroren sind, kann eine Lagerung für sechs Monate bei — 18 °C bis — 22 °C in Betracht gezogen werden. Vor jedem Versuch ist die mikrobielle Biomasse der gelagerten Böden zu bestimmen, und der Kohlenstoffgehalt in der Biomasse sollte mindestens 1 % des gesamten organischen Kohlenstoffs des Bodens befragen (siehe 1.6.2).

1.6.4. **Handhabung und Vorbereitung des Bodens für den Test**

1.6.4.1. *Vorinkubation*

Falls der Boden gelagert wurde (siehe 1.6.3.2), wird eine Vorinkubation über eine Zeitdauer von *2* bis 28 Tagen empfohlen. Die Temperatur und der Feuchtegehalt des Bodens während der Vorinkubation sollten den Testbedingungen möglichst entsprechen (siehe 1.6.4.2 und 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Physikalisch-chemische Eigenschaften*

Der Boden wird manuell von großen Gegenständen befreit (z. B. Steine, Pflanzenteile usw.) und im feuchten Zustand ohne übermäßiges Austrocknen auf eine Partikelgröße von kleiner als oder gleich 2 mm gesiebt. Der Feuchtegehalt der Bodenprobe sollte mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf einen Wert zwischen 40 % und 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt werden.

1.6.4.3. *Anreicherung mit organischem Substrat*

Der Boden ist mit einem geeigneten organischen Substrat anzureichern, z. B. pulverisiertem Luzernegrüngrasmehl (Hauptbestandteil: *Medicago sativa)* mit einem C:N-Verhältnis zwischen 12:1 und 16:1. Empfohlen wird ein Luzerne-Boden-Verhältnis von 5 g Luzerne je kg Boden (Trockengewicht).

1.6.5. **Vorbereitung der Testsubstanz zur Applikation auf den Boden**

Üblicherweise wird die Testsubstanz unter Verwendung eines Trägers zugegeben. Bei diesem Träger kann es sich um Wasser (bei wasserlöslichen Substanzen) oder einen inerten Feststoff wie feiner Quarzsand (Partikelgröße: 0,1-0,5 mm) handeln. Andere flüssige Träger als Wasser (z. B. organische Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform) sind zu vermeiden, da sie die Mikroflora schädigen können. Wird Sand als Träger benutzt, kann er mit der in einem geeigneten Lösungsmittel aufgelösten oder suspendierten Testsubstanz überzogen werden. In diesen Fällen sollte das Lösungsmittel vor dem Mischen mit dem Boden durch Verdampfen entfernt werden. Zur optimalen Verteilung der Testsubstanz im Boden wird ein Verhältnis von 10 g Sand je kg Boden (Trockengewicht) empfohlen. Die Kontrollproben werden nur mit einer äquivalenten Menge Wasser und/oder Quarzsand behandelt.

Beim Testen flüchtiger Chemikalien sind Verluste während der Behandlung so weit wie möglich zu vermeiden, und es ist nach Möglichkeit für eine homogene Verteilung im Boden zu sorgen (z. B. indem die Testsubstanz an verschiedenen Stellen in den Boden injiziert wird).

1.6.6. **Testkonzentrationen**

Werden Agrochemikalien geprüft, sind mindestens zwei Konzentrationen zu verwenden. Die niedrigere Konzentration sollte mindestens der maximalen Menge entsprechen, die unter praxisüblichen Bedingungen voraussichtlich in den Boden gelangt, während die höhere Konzentration ein Mehrfaches der niedrigeren Konzentration sein sollte. Die Konzentrationen der dem Boden zugegebenen Testsubstanz werden unter der Annahme einer gleichmäßigen Einarbeitung bis zu einer Tiefe von 5 cm und einer Bodenrohdichte von 1,5 berechnet. Bei Agrochemikalien, die direkt auf den Boden ausgebracht werden, oder bei Chemikalien, bei denen die den Boden erreichende Menge vorhersagbar ist, werden als Testkonzentrationen die höchste vorhergesagte Umweltkonzentration (PEC) und das Fünffache dieser Konzentration empfohlen. Substanzen, die voraussichtlich mehrmals in einer Kulturperiode auf den Boden ausgebracht werden, sollten in Konzentrationen getestet werden, die sich durch die Multiplikation der PEC mit der höchsten erwarteten Anzahl der Anwendungen ergeben. Allerdings sollte die obere getestete Konzentration das Zehnfache der höchsten einfachen Applikationsrate nicht übersteigen. Werden andere Substanzen als Agrochemikalien geprüft, wird eine geometrische Reihe von mindestens fünf Konzentrationen verwendet. Die getesteten Konzentrationen sollten den zur Bestimmung der $EC_x$-Werte notwendigen Bereich abdecken.

▼B

1.7. DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1.7.1. **Expositionsbedingungen**

1.7.1.1. *Behandlung und Kontrolle*

Werden Agrochemikalien geprüft, wird der Boden in drei Teile gleichen Gewichts aufgeteilt. Zwei Teile werden mit dem produkthaltigen Träger vermischt, und der dritte wird mit dem Träger ohne das Produkt vermischt (Kontrollprobe). Sowohl für die behandelten als auch die unbehandelten Böden wird eine Mindestanzahl von drei Replikaten empfohlen. Werden andere Substanzen als Agrochemikalien geprüft, wird der Boden in sechs Teile gleichen Gewichts aufgeteilt. Fünf dieser Proben werden mit dem die Testsubstanz enthaltenden Träger vermischt, und die sechste wird mit dem Träger ohne die Chemikalie vermischt. Sowohl für die behandelten Proben als auch für die Kontrollproben werden drei Replikate empfohlen. Es ist auf eine homogene Verteilung der Testsubstanz in den behandelten Bodenproben zu achten. Während des Mischens ist eine Verdichtung oder Verklumpung des Bodens zu vermeiden.

1.7.1.2. *Inkubation von Bodenproben*

Die Inkubation der Bodenproben kann auf zwei Wegen durchgeführt werden: als Sammelproben von jedem behandelten und unbehandelten Boden oder als Reihe von einzelnen, gleich großen Teilproben von jedem behandelten und unbehandelten Boden. Bei flüchtigen Substanzen sollte der Test jedoch nur mit einer Reihe einzelner Teilproben durchgeführt werden. Bei der Inkubation von Böden als Sammelproben werden große Mengen von jedem behandelten und unbehandelten Boden vorbereitet und während des Tests je nach Notwendigkeit zu analysierende Teilproben entnommen. Die zu Beginn für jede Behandlung und Kontrolle vorbereitete Menge ist abhängig von der Größe der Teilproben, der Anzahl der zur Analyse verwendeten Replikate und der höchsten erwarteten Anzahl von Probenahmen. Vor der Entnahme von Teilproben sind die inkubierten Sammelproben gründlich zu mischen. Bei der Bodeninkubation als Reihe einzelne Bodenproben wird jeder behandelte und unbehandelte Sammelboden in die benötigte Anzahl von Teilproben aufgeteilt, und diese Teilproben werden je nach Notwendigkeit verwendet. Für Untersuchungen mit mehr als zwei Probenahmezeitpunkten sind genügend Teilproben herzustellen, um alle Replikate und Probenahmezeiten zu berücksichtigen. Mindestens drei Replikatproben des Testbodens sollten unter aeroben Bedingungen inkubiert werden (siehe 1.7.1.1). Bei allen Tests sind geeignete Behälter mit ausreichendem Headspace zu verwenden, um das Entstehen anaerober Bedingungen zu vermeiden. Werden flüchtige Substanzen geprüft, ist der Test nur mit einer Reihe einzelner Teilproben durchzuführen,

1.7.1.3. *Testbedingungen und -dauer*

Der Test wird im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 ± 2 °C) durchgeführt. Der Feuchtegehalt der Bodenproben ist im Testverlauf bei 40-60 % (± 5 %) der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens zu halten (siehe 1.6.4.2). Destilliertes bzw. entionisiertes Wasser kann nach Bedarf zugegeben werden.

Die Mindestdauer der Tests beträgt 28 Tage. Bei Agrochemikalien werden die Nitratbildungsraten in den behandelten Proben mit denen in den Kontrollproben verglichen. Weichen diese am 28. Tag um mehr als 25 % voneinander ab, wird der Test bis zum Erreichen einer Differenz von gleich oder weniger als 25 % bzw. für die Höchstdauer von 100 Tagen fortgesetzt, je nachdem, was kürzer ist. Werden andere Substanzen als Agrochemikalien geprüft, wird der Test nach 28 Tagen beendet. Am 28. Tag werden die Nitratmengen in den behandelten Proben und in den Kontrollproben bestimmt und die $EC_x$-Werte berechnet.

▼B

1.7.2. **Probenahme und Analyse von Böden**

1.7.2.1. *Probenahmeintervalle*

Bei der Prüfung von Agrochemikalien werden Bodenproben am Tag 0, 7, 14 und 28 auf Nitrat analysiert. Ist eine Testverlängerung erforderlich, sind weitere Messungen vom 28. Tag an im Abstand von jeweils 14 Tagen vorzunehmen.

Bei der Prüfung von anderen Substanzen als Agrochemikalien werden mindestens fünf Testkonzentrationen verwendet und Bodenproben am Beginn (Tag 0) und am Ende der Expositionszeit (28 Tage) auf Nitrat analysiert. Gegebenenfalls kann eine Zwischenmessung, z. B. am 7. Tag, eingefügt werden. Die am 28. Tag erhaltenen Daten werden zur Bestimmung des $EC_x$-Werts der Chemikalie benutzt. Falls gewünscht, können die Daten der Kontrollproben vom Tag 0 im Bericht zur Angabe der Ausgangsmenge von Nitrat im Boden verwendet werden,

1.7.2.2. *Analyse von Bodenproben*

Die Menge des in jeder behandelten Probe und in jedem Kontrollreplikat gebildeten Nitrats wird zu jedem Probenahmezeitpunkt bestimmt. Nitrat wird aus dem Boden durch Schütteln der Proben mit einem geeigneten Extraktionsmittel, z. B. einer 0,1 M Kaliumchloridlösung, extrahiert. Empfohlen wird ein Verhältnis von 5 ml KCl-Lösung je Gramm Trockengewichtsäquivalent Boden. Um die Extraktion zu optimieren, sind die den Boden und die Extraktionslösung enthaltenden Behälter höchstens zur Hälfte zu füllen. Die Gemische werden bei 150 U/min 60 Minuten geschüttelt. Die Gemische werden zentrifugiert oder filtriert, und die Flüssigphasen werden auf Nitrat analysiert. Partikelfreie Flüssigextrakte können vor der Analyse bis zu sechs Monate bei — 20 ± 5 °C aufbewahrt werden.

2. **DATEN**

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Werden Agrochemikalien geprüft, ist die in jeder Replikatbodenprobe gebildete Nitratmenge aufzuzeichnen, und die Mittelwerte aller Replikate sind in tabellarischer Form darzustellen. Die Stickstofftransformationsraten sind mittels geeigneter und allgemein anerkannter statistischer Methoden (z. B. F-Test, 5 % Signifikanzniveau) zu berechnen. Die Mengen von gebildetem Nitrat werden in mg Nitrat/-kg Trockengewicht Boden/Tag ausgedrückt. Die Nitratbildungsrate jeder Behandlung wird mit der in der Kontrollprobe verglichen, und es wird die prozentuale Abweichung von der Kontrollprobe berechnet.

Werden andere Substanzen als Agrochemikalien geprüft, wird die in jedem Replikat gebildete Nitratmenge bestimmt und zur Abschätzung der $EC_x$-Werte eins Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Die in den behandelten Proben nach 28 Tagen gefundenen Nitratmengen (d. h. mg Nitrat/kg Trockengewicht Boden) werden mit den in der Kontrollprobe gefundenen verglichen. Auf der Basis dieser Daten werden die Inhibitionswerte, ausgedrückt in %, für jede Testkonzentration berechnet. Diese Prozentangaben werden über der Konzentration aufgetragen, und mit Hilfe statistischer Verfahren werden die $EC_x$-Werte berechnet. Mittels Standardverfahren werden ferner Vertrauensbereiche ($p = 0,95$) für die errechneten $EC_x$-Werte ermittelt (10) (11) (12).

Unter Umständen tragen Testsubstanzen, die große Mengen Stickstoff enthalten, zur Bildung von Nitrat während des Tests bei. Werden diese Substanzen in einer hohen Konzentration getestet (z. B. Chemikalien, bei denen von einer wiederholten Anwendung auszugehen ist), sind in den Test entsprechende Kontrollproben aufzunehmen (d. h. Boden plus Testsubstanz, jedoch ohne Pflanzenmehl). Daten aus diesen Kontrollproben sind bei den $EC_x$-Berechnungen zu berücksichtigen.

▼B

2.2. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Ist bei der Auswertung der Testergebnisse von Agrochemikalien die Differenz der Nitratbildungsraten zwischen der niedrigen Behandlung (d. h. der höchsten erwarteten Konzentration) und den Kontrollproben zu jedem Probenahmezeitpunkt nach dem 28. Tag gleich oder geringer als 25 %, dann ist das Mittel so zu bewerten, dass es keinen langfristigen Einfluss auf die Stickstofftransformation in Böden hat. Für die Auswertung der Testergebnisse von anderen Chemikalien als Agrochemikalien werden die $EC_{50}$-, $EC_{25}$- und/oder $EC_{10}$-Werte herangezogen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

Der Testbericht muss folgende Informationen enthalten:

Vollständige Angaben zu den verwendeten Böden, darunter:

— geografische Angaben zum Standort (Breitengrad, Längengrad);

— Informationen über die Geschichte des Feldstandorts (d. h. Bewuchs, Behandlungen mit Pflanzenschutzmitteln und Düngemitteln, unbeabsichtigte Kontaminationen usw.);

— Nutzungsstruktur (z. B. landwirtschaftlich genutzter Boden, Forst usw.);

— Probenahmetiefe (cm);

— Sand-/Schluff-/Tongehalt ( % Trockengewicht);

— pH (in Wasser);

— organischer Kohlenstoffgehalt ( % Trockengewicht);

— Stickstoffgehalt ( % Trockengewicht);

— Ausgangswert der Nitratkonzentration (mg Nitrat/kg Trockengewicht);

— Kationenaustauschkapazität (mmol/kg);

— mikrobielle Biomasse als Anteil (in %) am gesamten organischen Kohlenstoff;

— Angaben zu den für die Bestimmung der einzelnen Parameter verwendeten Methoden;

— alle Angaben zur Entnahme und Lagerung der Bodenproben;

— ggf. Einzelheiten zur Vorinkubation des Bodens.

Testsubstanz:

— physikalischer Zustand und falls relevant physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Kenndaten, falls relevant mit Strukturformel, Reinheit (d. h. bei Pflanzenschutzmitteln der Wirkstoffanteil in %), Stickstoffgehalt.

Substrat:

— Herkunft des Substrats;

— Zusammensetzung (d. h. Luzernemehl, Luzernegrüngrasmehl);

— Kohlenstoff-, Stickstoffgehalt ( % Trockengewicht);

— Siebmaschenweite (mm).

▼B

Testbedingungen:

— genaue Angaben zur Anreicherung des Bodens mit organischem Substrat;

— Anzahl der verwendeten Konzentrationen der Testchemikalie und ggf. Begründung für die gewählten Konzentrationen;

— genaue Angaben zur Applikation der Testsubstanz auf den Boden;

— Inkubationstemperatur;

— Feuchtegehalt des Bodens zu Beginn und während des Tests;

— das zur Bodeninkubation verwendete Verfahren (d. h. als Sammelproben oder als Reihe einzelner Teilproben);

— Anzahl der Replikate;

— Anzahl der Probenahmezeitpunkte;

— das zur Nitratextraktion aus dem Boden verwendete Verfahren;

Ergebnisse:

— zur Nitratanalyse verwendete analytische Verfahren und Geräte;

— Daten in tabellarischer Form, einschließlich Einzel- und Mittelwerte der Nitratbestimmungen;

— Abweichung zwischen den Replikaten behandelter Proben und Kontrollproben;

— Erläuterungen zu den Korrekturen an den Berechnungen, falls relevant;

— die Abweichung (in %) der Nitratbildungsraten zu jedem Probenahmezeitpunkt bzw. ggf. der $EC_{50}$-Wert mit 95 %-Vertrauensgrenze, weitere $EC_x$ (d. h. $EC_{25}$ oder $EC_{10}$) mit Vertrauensintervallen und eine Grafik der Dosis-Wirkungs-Kurve;

— statistische Aufbereitung der Ergebnisse;

— sämtliche Informationen und Beobachtungen, die für die Interpretation der Testergebnisse hilfreich sind.

4. **LITERATURANGABEN**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16,1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2. Ausgabe, 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28. September 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brüssel.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality Biological Methods.*

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italien,18.-20. Januar 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Probenahme, Behandlung und Lagerung von Boden für die Bestimmung aerober mikrobieller Prozesse unter Laborbedingungen.

(8) ISO 14240-1 (1997). Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der mikrobiellen Biomasse von Böden — Teil 1: Substratinduziertes Respirationsverfahren.

(9) ISO 14240-2 (1997). Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der mikrobiellen Biomasse von Böden — Teil 2: Fumigations-Extraktionsverfahren.

(10) Litchfield, J.T. und Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper, Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

## C.22. BODENMIKROORGANISMEN: KOHLENSTOFFTRANSFORMATIONSTEST

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der Prüfrichtlinie OECD TG 217 (2000).

### 1.1. EINLEITUNG

Diese Testmethode beschreibt eine Labormethode zur Untersuchung der potenziellen Langzeitauswirkungen einer einmaligen Exposition gegenüber Pflanzenschutzmitteln und etwaigen anderen Chemikalien auf die Kohlenstofftransformationsaktivität von Bodenmikroorganismen. Der Test beruht im Wesentlichen auf den Empfehlungen der Pflanzenschutzorganisation für Europa und den Mittelmeerraum (1), doch auch andere Richtlinien wurden berücksichtigt, wie die der deutschen Biologischen Bundesanstalt (2), der US-amerikanischen Environmental Protection Agency (3) und SETAC (4). Auf einem OECD-Workshop zur Boden-/Sedimentauswahl, der 1995 im italienischen Belgirate stattfand (5), wurden die bei diesem Test zu verwendende Anzahl und Art von Böden vereinbart. Die Empfehlungen zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Bodenproben basieren auf einer ISO-Anleitung (6) und auf Empfehlungen des Belgirate-Workshops.

Bei der Be- und Auswertung toxischer Eigenschaften von Testsubstanzen kann eine Bestimmung der Auswirkungen auf die mikrobielle Aktivität des Bodens erforderlich sein, z. B., wenn Daten zu möglichen Nebenwirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf die Mikroflora des Bodens benötigt werden oder wenn eine Exposition von Bodenmikroorganismen gegenüber anderen Chemikalien als Pflanzenschutzmitteln erwartet wird. Der Kohlenstofftransformationstest wird durchgeführt, um den Einfluss derartiger Chemikalien auf die Bodenmikroflora zu ermitteln. Bei der Prüfung von Agrochemikalien (z. B. Pflanzenschutzmittel, Düngemittel, Forstchemikalien) werden sowohl Kohlenstoff- als auch Stickstofftransformationstests durchgeführt. Bei anderen Substanzen als Agrochemikalien genügt der Stickstofftransformationstest. Liegen jedoch die $EC_{50}$-Werte des Stickstofftransformationstests bei diesen Chemikalien im Bereich, der für käufliche Nitrifikationshemmstoffe (z. B. Nitrapyrin) ermittelt wurde, kann ein Kohlenstofftransformationstest durchgeführt werden, um weitere Informationen zu gewinnen,

Boden besteht sowohl aus lebenden als auch aus nichtlebenden Komponenten, die in komplexen und heterogenen Gemischen vorkommen. Beim Abbau organischen Materials und seiner Transformation in fruchtbaren Böden spielen Mikroorganismen eine wichtige Rolle, wobei viele Arten für unterschiedliche Aspekte der Bodenfruchtbarkeit verantwortlich sind. Jede langfristige Störung dieser biochemischen Prozesse kann sich potenziell auf den Nährstoffkreislauf auswirken und dadurch wiederum die Bodenfruchtbarkeit beeinflussen. Die Transformation von Kohlenstoff und Stickstoff erfolgt in allen fruchtbaren Böden. Die Transformationspfade sind im Wesentlichen gleich, auch wenn je nach Boden unterschiedliche mikrobielle Populationen für diese Prozesse verantwortlich sind.

▼B

Mit der hier beschriebenen Testmethode können durch einen Stoff hervorgerufene langfristige nachteilige Auswirkungen auf den Prozess der Kohlenstofftransformation in aeroben Oberböden bestimmt werden. Der Test reagiert empfindlich auf Veränderungen in Größe und Aktivität der mikrobiellen Populationen, die für die Kohlenstofftransformation verantwortlich sind, da diese Populationen sowohl einem chemischen Stress als auch einem Kohlenstoffmangel ausgesetzt werden. Verwendet wird ein an organischem Material armer Sandboden. Dieser Boden wird mit der Testsubstanz behandelt und unter Bedingungen inkubiert, die einen schnellen mikrobiellen Stoffwechsel ermöglichen. Unter diesen Bedingungen werden Quellen von leicht verfügbarem Kohlenstoff im Boden rasch aufgebraucht. Dies verursacht einen Kohlenstoffmangel, der nicht nur mikrobielle Zellen tötet, sondern auch eine Keimruhe und/oder Sporenbildung induziert. Läuft der Test über mehr als 28 Tage, kann die Summe dieser Reaktionen in den Kontrollproben (unbehandelter Boden) als progressiver Verlust an stoffwechselaktiver mikrobieller Biomasse gemessen werden (7). Wird die Biomasse in kohlenstoffgestresstem Boden unter den Versuchsbedingungen von der Anwesenheit einer Chemikalie beeinflusst, kehrt sie möglicherweise nicht auf das Niveau in den Kontrollproben zurück. Folglich halten zu einem beliebigen Zeitpunkt während des Versuchs durch die Testsubstanz verursachte Störungen häufig bis zum Ende des Tests an.

Die Tests, auf deren Grundlage diese Testmethode entwickelt wurde, waren in erster Linie für Substanzen ausgelegt, bei denen die in den Boden gelangende Menge vorherbestimmt werden kann. Dies ist z. B. bei Pflanzenschutzmitteln der Fall, bei denen die Applikationsmenge auf dem Feld bekannt ist. Bei Agrochemikalien genügt es, zwei Konzentrationen zu testen, die für die erwartete oder vorhergesagte Applikationsmenge relevant sind. Agrochemikalien können als Wirkstoffe (a.i.) oder als formulierte Handelsprodukte getestet werden. Der Test ist jedoch nicht auf Chemikalien mit vorhersagbaren Umweltkonzentrationen begrenzt. Durch Veränderung sowohl der Mengen der auf den Boden ausgebrachten Testsubstanz als auch der Art und Weise, wie die Daten ausgewertet werden, kann der Test auch für Chemikalien angewendet werden, bei denen nicht bekannt ist, in welcher Menge sie in den Boden gelangen. Somit werden bei anderen Substanzen als Agrochemikalien die Wirkungen einer Reihe von Konzentrationen auf die Kohlenstofftransformation bestimmt. Die Daten von diesen Tests werden verwendet, um eine Dosis-Wirkungs-Kurve zu erstellen und $EC_x$-Werte zu berechnen, wobei x als die Wirkung in % definiert ist.

1.2. DEFINITIONEN

**Kohlenstofftransformation**: der Abbau organischen Materials durch Mikroorganismen zum anorganischen Endprodukt Kohlendioxid.

**$EC_x$ (Effektkonzentration)**: diejenige Konzentration der Testsubstanz im Boden, die die Transformation von Kohlenstoff in Kohlendioxid zu x % hemmt.

**$EC_{50}$ (Medianwert der Effektkonzentration)**: diejenige Konzentration der Testsubstanz im Boden, die die Transformation von Kohlenstoff in Kohlendioxid zu 50 % hemmt.

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Keine.

▼B

1.4. PRINZIP DER TESTMETHODE

Gesiebter Boden wird entweder mit der Testsubstanz behandelt oder unbehandelt (Kontrollprobe) belassen. Werden Agrochemikalien geprüft, wird eine Mindestanzahl von zwei Testkonzentrationen empfohlen, die im Verhältnis zur höchsten auf dem Feld erwarteten Konzentration gewählt werden sollten. Nach 0, 7, 14 und 28 Tagen Inkubation werden Proben behandelter und unbehandelter Böden mit Glucose gemischt, und die Glucose-induzierten Respirationsraten werden 12 Stunden hintereinander gemessen. Respirationsraten werden als freigesetztes Kohlendioxid (mg Kohlendioxid/kg Trockenboden/h) oder verbrauchter Sauerstoff (mg Sauerstoff/kg Boden/h) ausgedrückt. Die mittlere Respirationsrate in behandelten Bodenproben wird mit der in der Kontrollprobe verglichen, und es wird die prozentuale Abweichung der behandelten Proben von den Kontrollproben berechnet. Alle Tests laufen mindestens 28 Tage. Sind die Differenzen zwischen behandelten und unbehandelten Böden am 28. Tag gleich oder größer als 25 %, werden die Messungen in Abständen von 14 Tagen für die Höchstdauer von 100 Tagen fortgesetzt. Werden andere Substanzen als Agrochemikalien geprüft, wird die Testsubstanz in einer Reihe von Konzentrationen Bodenproben zugesetzt, und nach 28 Tagen werden die Glucose-induzierten Respirationsraten (d. h. das Mittel der Mengen an gebildetem Kohlendioxid oder verbrauchtem Sauerstoff) gemessen. Die Ergebnisse aus Versuchen mit einer Reihe von Konzentrationen werden mit Hilfe eines Regressionsmodells analysiert, und die $EC_x$-Werte werden berechnet (d. h. $EC_{50}$, $EC_{25}$ und/oder $EC_{10}$). Siehe Definitionen.

1.5. VALIDITÄT DES TESTS

Auswertungen von Testergebnissen mit Agrochemikalien beruhen auf vergleichsweise kleinen Differenzen (d. h. Mittelwert ± 25 %) zwischen dem freigesetzten Kohlendioxid oder dem verbrauchten Sauerstoff in (bzw. durch) Kontrollproben und behandelte(n) Bodenproben, so dass große Schwankungen bei den Kontrollproben zu falschen Ergebnissen führen können. Daher sollte die Abweichung zwischen Replikatkontrollproben weniger als ± 15 % betragen.

1.6. BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.6.1. **Geräte**

Es werden Testgefäße aus chemisch inertem Material verwendet. Ihr Fassungsvermögen sollte sich nach dem gewählten Inkubationsverfahren der Böden richten, d. h. für die Inkubation von Sammelproben oder einer Reihe einzelner Bodenproben (siehe 1.7.1.2). Während des Tests ist darauf zu achten, dass sowohl der Wasserverlust möglichst gering gehalten wird als auch ein Gasaustausch stattfinden kann (so könnten die Testbehälter z. B. mit perforierter Polyethylenfolie abgedeckt werden). Beim Testen flüchtiger Substanzen sind abdichtbare und gasdichte Behälter zu verwenden. Diese sollten in ihrer Größe so bemessen sein, dass sie zu etwa einem Viertel ihres Volumens mit der Bodenprobe gefüllt sind.

Zur Bestimmung der Glucose-induzierten Respiration werden Inkubationssysteme sowie Geräte für die Messung der Kohlendioxidbildung bzw. des Sauerstoffverbrauchs benötigt. Beispiele für derartige Systeme sind in der Literatur zu finden (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **Auswahl und Anzahl der Böden**

Es wird ein einziger Boden verwendet. Empfohlen wird Boden mit folgenden Eigenschaften:

— Sandgehalt: mindestens 50 % und höchstens 75 %;

▼B

— pH: 5,5-7,5;

— organischer Kohlenstoffgehalt: 0,5-1,5 %;

— es ist die mikrobielle Biomasse zu bestimmen (12) (13), und ihr Kohlenstoffgehalt sollte mindestens 1 % des gesamten organischen Kohlenstoffs des Bodens betragen.

Meist stellt ein Boden mit diesen Eigenschaften den „worst case" dar, da seine Adsorption minimal und die Verfügbarkeit der Testchemikalie für die Mikroflora maximal ist. Demnach sind in aller Regel keine Tests mit anderen Böden notwendig, Unter bestimmten Umstanden jedoch, wenn z. B. der erwartete hauptsächliche Einsatz der Testsubstanz auf bestimmten Böden wie sauren Waldböden stattfindet, oder bei elektrostatisch aufgeladenen Chemikalien kann es erforderlich sein, einen zusätzlichen Boden zu verwenden.

1.6.3. **Entnahme und Lagerung von Bodenproben**

1.6.3.1. *Entnahme*

Es sind ausführliche Informationen über die Vorgeschichte des Feldstandorts erforderlich, von dem der Testboden entnommen wird. Diese Angaben beinhalten unter anderem die genaue Lage, den Bewuchs, die Behandlung mit Pflanzenschutzmitteln sowie mit organischen und anorganischen Düngemitteln, Zusätze biologischer Materialien oder unbeabsichtigte Kontaminationen. Der für die Bodenentnahme gewählte Standort muss über einen längeren Zeitraum hinweg nutzbar sein. Geeignet sind Dauerweiden, Felder mit einjährigen Getreidekulturen (ausgenommen Mais) oder dicht gesäten Gründüngungspflanzen. Der gewählte Probenahmestandort sollte mindestens ein Jahr vor der Probenahme nicht mit Pflanzenschutzmitteln behandelt worden sein. Ferner sollten mindestens sechs Monate vorher keine organischen Düngemittel ausgebracht worden sein. Die Verwendung von Mineraldünger ist nur zulässig, wenn dies für die Kultur erforderlich ist, und die Entnahme der Bodenproben sollte frühestens drei Monate nach Ausbringung des Düngemittels erfolgen. Zu vermeiden ist die Verwendung von Boden, der mit Düngemitteln mit bekannter biozider Wirkung (z. B. Kalkstickstoff) behandelt wurde.

Die Probenahme während oder nach längeren (mehr als 30 Tage) Dürre- oder Überschwemmungsperioden sollte vermieden werden. Bei gepflügten Böden sind die Proben aus einer Tiefe von 0 bis 20 cm zu entnehmen. Bei Grünland (Weiden) oder anderen Böden, die über längere Zeiträume (mindestens eine Vegetationsperiode) nicht gepflügt werden, kann die maximale Tiefe der Probenahme geringfügig über 20 cm liegen (z. B. bei bis zu 25 cm). Die Bodenproben sollten in Behältern und unter Temperaturbedingungen transportiert werden, die sicherstellen, dass die ursprünglichen Bodeneigenschaften nicht wesentlich verändert werden.

1.6.3.2. *Lagerung*

Bevorzugt wird die Verwendung feldfrischer Böden. Lässt sich die Lagerung im Labor nicht vermeiden, sollten die Böden im Dunkeln bei 4 ± 2 °C höchstens drei Monate gelagert werden. Während der Lagerung der Böden müssen aerobe Bedingungen sichergestellt sein, Werden Böden von Flächen entnommen, die über mindestens drei Monate im Jahr gefroren sind, kann eine Lagerung für sechs Monate bei — 18 °C in Betracht gezogen werden. Vor jedem Versuch ist die mikrobielle Biomasse der gelagerten Böden zu bestimmen, und der Kohlenstoffgehalt in der Biomasse sollte mindestens 1 % des gesamten organischen Kohlenstoffs des Bodens betragen (siehe 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Handhabung und Vorbereitung des Bodens für den Test**

1.6.4.1. *Vorinkubation*

Falls der Boden gelagert wurde (siehe 1.6.4.2 und 1.7.1.3), wird eine Vorinkubation über eine Zeitdauer von 2 bis 28 Tagen empfohlen. Die Temperatur und der Feuchtegehalt des Bodens während der Vorinkubation sollten den Testbedingungen möglichst entsprechen (siehe 1.6.4.2 und 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Physikalisch-chemische Eigenschaften*

Der Boden wird manuell von großen Gegenständen befreit (z. B. Steine, Pflanzenteile usw.) und im feuchten Zustand ohne übermäßiges Austrocknen auf eine Partikelgröße von $\leq$ 2 mm gesiebt. Der Feuchtegehalt der Bodenprobe sollte mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf einen Wert zwischen 40 % und 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt werden.

1.6.5. **Vorbereitung der Testsubstanz zur Applikation auf den Boden**

Üblicherweise wird die Testsubstanz unter Verwendung eines Trägers zugegeben. Bei diesem Träger kann es sich um Wasser (bei wasserlöslichen Substanzen) oder einen inerten Feststoff wie feinen Quarzsand (Partikelgröße: 0,1-0,5 mm) handeln. Andere flüssige Träger als Wasser (z. B. organische Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform) sind zu vermeiden, da sie die Mikroflora schädigen können. Wird Sand als Träger benutzt, kann er mit der in einem geeigneten Lösungsmittel aufgelösten oder suspendierten Testsubstanz überzogen werden, In diesen Fällen sollte das Lösungsmittel vor dem Mischen mit dem Boden durch Verdampfen entfernt werden. Zur optimalen Verteilung der Testsubstanz im Boden wird ein Verhältnis von 10 g Sand je kg Boden (Trockengewicht) empfohlen. Die Kontrollproben werden nur mit einer äquivalenten Menge Wasser und/oder Quarzsand behandelt.

Beim Testen flüchtiger Chemikalien sind Verluste während der Behandlung so weit wie möglich zu vermeiden, und es ist nach Möglichkeit für eine homogene Verteilung im Boden zu sorgen (z. B., indem die Testsubstanz an verschiedenen Stellen in den Boden injiziert wird).

1.6.6. **Testkonzentrationen**

Werden Pflanzenschutzmittel oder andere Chemikalien mit vorhersagbaren Umweltkonzentrationen geprüft, sind mindestens zwei Konzentrationen zu verwenden. Die niedrigere Konzentration sollte mindestens der maximalen Menge entsprechen, die unter praxisüblichen Bedingungen voraussichtlich in den Boden gelangt, während die höhere Konzentration ein Mehrfaches der niedrigeren Konzentration sein sollte. Die Konzentrationen der dem Boden zugegebenen Testsubstanz werden unter der Annahme einer gleichmäßigen Einarbeitung bis zu einer Tiefe von 5 cm und einer Bodenrohdichte von 1,5 berechnet. Bei Agrochemikalien, die direkt auf den Boden ausgebracht werden, oder bei Chemikalien, bei denen die den Boden erreichende Menge vorhersagbar ist, werden als Testkonzentrationen die höchste vorhergesagte Umweltkonzentration (PEC) und das 5-fache dieser Konzentration empfohlen. Substanzen, die voraussichtlich mehrmals in einer Kulturperiode auf den Boden ausgebracht werden, sollten in Konzentrationen getestet werden, die sich durch die Multiplikation der PEC mit der höchsten erwarteten Anzahl der Anwendungen ergeben. Allerdings sollte die obere getestete Konzentration das 10-fache der höchsten einfachen Applikationsrate nicht übersteigen.

Werden andere Substanzen als Agrochemikalien geprüft, wird eine geometrische Reihe von mindestens fünf Konzentrationen verwendet. Die getesteten Konzentrationen sollten den zur Bestimmung der $EC_x$-Werte notwendigen Bereich abdecken.

▼B

1.7. DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1.7.1. **Expositionsbedingungen**

1.7.1.1. *Behandlung und Kontrolle*

Werden Agrochemikalien geprüft, wird der Boden in drei Teile gleichen Gewichts aufgeteilt. Zwei Teile werden mit dem produkthaltigen Träger gemischt, und der dritte wird mit dem Träger ohne das Produkt vermischt (Kontrollprobe). Sowohl für die behandelten als auch die unbehandelten Böden wird eine Mindestanzahl von drei Replikaten empfohlen. Werden andere Substanzen als Agrochemikalien geprüft, wird der Boden in sechs Teile gleichen Gewichts aufgeteilt. Fünf dieser Proben werden mit dem die Testsubstanz enthaltenden Träger vermischt, und die sechste wird mit dem Träger ohne die Chemikalie vermischt. Sowohl für die behandelten Proben als auch für die Kontrollproben werden drei Replikate empfohlen. Es ist auf eine homogene Verteilung der Testsubstanz in den behandelten Bodenproben zu achten. Während des Mischens ist eine Verdichtung oder Verklumpung des Bodens zu vermeiden.

1.7.1.2. *Inkubation von Bodenproben*

Die Inkubation der Bodenproben kann auf zwei Wegen durchgeführt werden: als Sammelproben von jedem behandelten und unbehandelten Boden oder als Reihe von einzelnen, gleich großen Teilproben von jedem behandelten und unbehandelten Boden. Bei flüchtigen Substanzen sollte der Test jedoch nur mit einer Reihe einzelner Teilproben durchgeführt werden. Bei der Inkubation von Böden als Sammelproben werden große Mengen von jedem behandelten und unbehandelten Boden vorbereitet und während des Tests je nach Notwendigkeit zu analysierende Teilproben entnommen. Die zu Beginn für jede Behandlung und Kontrolle vorbereitete Menge ist abhängig von der Größe der Teilproben, der Anzahl der zur Analyse verwendeten Replikate und der höchsten erwarteten Anzahl von Probenahmen. Vor der Entnahme von Teilproben sind die inkubierten Sammelproben gründlich zu mischen. Bei der Bodeninkubation als Reihe einzelner Bodenproben wird jeder behandelte und unbehandelte Sammelboden in die benötigte Anzahl von Teilproben aufgeteilt, und diese Teilproben werden je nach Notwendigkeit verwendet. Für Untersuchungen mit mehr als zwei Probenahmezeitpunkten sind genügend Teilproben herzustellen, um alle Replikate und Probenahmezeiten zu berücksichtigen. Mindestens drei Replikatproben des Testbodens sollten unter aeroben Bedingungen inkubiert werden (siehe 1.7.1.1). Bei allen Tests sind geeignete Behälter mit ausreichendem Headspace zu verwenden, um das Entstehen anaerober Bedingungen zu vermeiden. Werden flüchtige Substanzen geprüft, ist der Test nur mit einer Reihe einzelner Teilproben durchzuführen.

1.7.1.3. *Testbedingungen und -dauer*

Der Test wird im Dunkeln bei Raumtemperatur (20 ± 2 °C) durchgeführt. Der Feuchtegehalt der Bodenproben ist im Testverlauf bei 40-60 % (+ 5 %) der maximalen Wasserhaltekapazität des Bodens zu halten (siehe 1.6.4.2). Destilliertes bzw. entionisiertes Wasser kann nach Bedarf zugegeben werden.

Die Mindestdauer der Tests beträgt 28 Tage. Bei Agrochemikalien werden die Mengen an freigesetztem Kohlenstoff bzw. verbrauchtem Sauerstoff in den behandelten Proben mit denen in den Kontrollproben verglichen. Weichen diese am 28. Tag um mehr als 25 % voneinander ab, wird der Test bis zum Erreichen einer Differenz von gleich oder weniger als 25 % bzw. für die Höchstdauer von 100 Tagen fortgesetzt, je nachdem, was kürzer ist. Werden andere Substanzen als Agrochemikalien geprüft, wird der Test nach 28 Tagen beendet. Am 28. Tag werden die Mengen an freigesetztem Kohlendioxid bzw. verbrauchtem Sauerstoff in den behandelten Proben und in den Kontrollproben bestimmt und die $EC_x$-Werte berechnet.

▼B

1.7.2. **Probenahme und Analyse von Böden**

1.7.2.1. *Probenahmeintervalle*

Bei der Prüfung von Agrochemikalien werden Bodenproben am Tag 0, 7, 14 und 28 auf Glucose-induzierte Respirationsraten analysiert. Ist eine Testverlängerung erforderlich, sind weitere Messungen vom 28. Tag an im Abstand von jeweils 14 Tagen vorzunehmen.

Bei der Prüfung von anderen Substanzen als Agrochemikalien werden mindestens fünf Testkonzentrationen verwendet und Bodenproben am Beginn (Tag 0) und am Ende der Expositionszeit (28 Tage) auf die Glucose-induzierte Respiration analysiert. Gegebenenfalls kann eine Zwischenmessung, z. B. am 7. Tag, eingefügt werden. Die am 28. Tag erhaltenen Daten werden zur Bestimmung des $EC_x$-Werts der Chemikalie benutzt. Falls gewünscht, können die Daten der Kontrollproben vom Tag 0 zur Abschätzung der Ausgangsmengen der stoffwechselaktiven mikrobiellen Biomasse im Boden herangezogen werden (12).

1.7.2.2. *Messung von Glucose-induzierten Respirationsraten*

Die Glucose-induzierte Respirationsrate in jeder behandelten Probe und in jedem Kontrollreplikat wird zu jedem Probenahmezeilpunkt bestimmt. Die Bodenproben werden mit einer Menge Glucose vermischt, die groß genug ist, um unverzüglich einen maximalen Atmungswert zu erreichen. Die zum Erreichen eines maximalen Atmungswerts in einem bestimmten Boden notwendige Glucosemenge kann in einem Vorversuch mit einer Reihe von Glucosekonzentrationen bestimmt werden (14). Bei sandigen Böden mit einem organischen Kohlenstoffgehalt von 0,5-1,5 % sind jedoch üblicherweise 2 000 mg bis 4 000 mg Glucose je kg Boden (Trockengewicht) ausreichend. Die Glucose kann mit sauberem Quarzsand pulverisiert werden (10 g Sand/kg Trockengewicht Boden) und mit dem Boden homogen vermischt werden.

Die mit Glucose angereicherten Bodenproben werden in einem geeigneten Gerät inkubiert, mit dem die Respirationsraten bei 20 ± 2 °C entweder laufend, stündlich oder in 2-Stunden-Intervallen gemessen werden können (siehe 1.6.1). Das freigesetzte Kohlendioxid bzw. der verbrauchte Sauerstoff werden 12 Stunden lang gemessen, und die Messungen sollten so früh wie möglich beginnen, d. h. innerhalb von 1 bis 2 Stunden nach der Glucosezugabe. Die Gesamtmengen des in den 12 Stunden freigesetzten Kohlendioxids bzw. verbrauchten Sauerstoffs werden gemessen und die minieren Respirationsraten bestimmt.

2. **DATEN**

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Werden Agrochemikalien geprüft, ist für jedes Replikat die Menge des jeweils freigesetzten Kohlendioxids bzw. verbrauchten Sauerstoffs aufzuzeichnen, und die Mittelwerte aller Replikate sind in tabellarischer Form darzustellen. Die Ergebnisse sind mittels geeigneter und allgemein anerkannter statistischer Methoden (z. B. F-Test, 5 % Signifikanzniveau) zu bewerten, Die Glucose-induzierten Respirationsraten werden in mg Kohlendioxid/kg Trockengewicht Boden/h bzw. mg Sauerstoff/Trockengewicht Boden/h ausgedrückt. Die mittlere Kohlendioxidbildungsrate bzw. die mittlere Sauerstoffverbrauchsrate jeder Behandlung wird mit der in der Kontrollprobe verglichen, und es wird die prozentuale Abweichung von der Kontrollprobe berechnet.

▼B

Werden andere Substanzen als Agrochemikalien geprüft, wird die Menge an freigesetztem Kohlendioxid bzw. an verbrauchtem Sauerstoff für jedes Replikat bestimmt, und zur Abschätzung der $EC_x$-Werte eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt. Die in den behandelten Proben nach 28 Tagen gefundenen Glucose-induzierten Respirationsraten (d. h. mg Kohlendioxid/kg Trockengewicht Boden/h bzw. mg Sauerstoff/Trockengewicht Boden/h) werden mit den in der Kontrollprobe gefundenen verglichen. Auf der Basis dieser Daten werden die Inhibitionswerte, ausgedrückt in %, für jede Testkonzentration berechnet. Diese Prozentangaben werden über der Konzentration aufgetragen, und dann werden mit Hilfe statistischer Verfahren die EC,-Werte berechnet. Mittels Standard verfahren werden femer Vertrauensbereiche (p = 0,95) für die errechneten EC,-Werte ermittelt (15) (16) (17).

2.2. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Ist bei der Auswertung der Testergebnisse von Agrochemikalien die Differenz der Respirationsraten zwischen der niedrigen Behandlung (d. h. der höchsten erwarteten Konzentration) und den Kontrollproben zu jedem Probenahmezeitpunkt nach dem 28. Tag ≤ 25 %, dann ist das Produkt so zu bewerten, dass es keinen langfristigen Einfluss auf die Kohlenstofftransformation in Böden hat. Für die Auswertung der Testergebnisse von anderen Chemikalien als Agrochemikalien werden die $EC_{50}$-, $EC_{25}$- und/oder $EC_{10}$-Werte herangezogen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

TESTBERICHT

Der Testbericht muss folgende Informationen enthalten:

Vollständige Angaben zu den verwendetentBöden, darunter:

— geografische Angaben zum Standort (Breitengrad, Längengrad);

— Informationen über die Vorgeschichte des Feldstandorts (d. h. Bewuchs, Behandlungen mit Pflanzenschutzmitteln und Düngemitteln, unbeabsichtigte Kontaminationen usw.)

— Nutzungsstruktur (z. B. landwirtschaftlich genutzter Boden, Forst usw.);

— Probenahmetiefe (cm);

— Sand-/Schluff-/Tongehalt ( % Trockengewicht);

— pH (in Wasser);

— organischer Kohlenstoffgehalt ( % Trockengewicht);

— Stickstoffgehalt ( %Trockengewicht);

— Kationenaustauschkapazilät (mmol/kg);

— Ausgangswert der mikrobiellen Biomasse als Anteil (in %) am gesamten organischen Kohlenstoff;

— Angaben zu den für die Bestimmung der einzelner Parameter verwendeten Methoden;

— alle Angaben zur Entnahme und Lagerung der Bodenproben;

— ggf. Einzelheiten zur Vorinkubation des Bodens.

▼B

Testsubstanz:

— physikalischer Zustand und, falls relevant, physikalisch-chemische Eigenschaften;

— chemische Kenndaten, falls relevant mit Strukturformel, Reinheit (d. h. bei Pflanzenschutzmitteln der Wirkstoffanteil in %), Stickstoffgehalt.

Testbedingungen:

— genaue Angaben zur Anreicherung des Bodens mit organischem Substrat;

— Anzahl der verwendeten Konzentrationen der Testchemikalie und ggf. Begründung für die gewählten Konzentrationen;

— genaue Angaben zur Applikation der Testsubstanz auf den Boden;

— Inkubationstemperatur;

— Feuchtegehalt des Bodens zu Beginn und während des Tests;

— das zur Bodeninkubation verwendete Verfahren (d. h. als Sammelproben oder als Reihe einzelner Teilproben);

— Anzahl der Replikate;

— Anzahl der Probenahmezeitpunkte.

Ergebnisse:

— zur Messung der Respirationsraten verwendete Verfahren und Geräte;

— Daten in tabellarischer Form, einschließlich Einzel- und Mittelwerte der Kohlendioxid- bzw. Sauerstoffmengen;

— Abweichung zwischen den Replikaten behandelter Proben und Kontrollproben;

— Erläuterungen zu den Korrekturen an den Berechnungen, falls relevant;

— die Abweichung (in %) der Glucose-induzierten Respirationsraten zu jedem Probenahmezeitpunkt bzw. ggf. der $EC_{50}$-Wert mit 95 % Vertrauens bereich, weitere $EC_x$ (d. h. $EC_{25}$ oder $EC_{10}$) mit Vertrauensbereichen und eine grafische Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve;

— ggf. statistische Aufbereitung der Ergebnisse;

— sämtliche Informationen und Beobachtungen, die für die Interpretation der Testergebnisse hilfreich sind.

4. **LITERATURANGABEN**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soll Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2. Ausgabe, 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28. September 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brüssel.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italien, 18-20. Januar 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Probenahme, Behandlung und Lagerung von Boden für die Bestimmung aerober mikrobieller Prozesse unter Laborbedingungen.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soit Microflora“. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3, 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties“. Agronomy Monograph N$^{o}$ 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41, 831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Bodenbeschaffenheil — Laboratoriumsinkubationssysteme zur Messung der Mineralisierung von organischen Chemikalien im Boden bei aeroben Bedingungen.

(11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A. and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116, 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der mikrobiellen Biomasse von Böden — Teil 1: Substratinduziertes Respirationsverfahren.

(13) ISO 14240-2 (1997). Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der mikrobiellen Biomasse von Böden — Teil 2: Fumigations-Extraktionsverfahren.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluss von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden gegenüber Pflanzenschutzmitteln, dargestellt am Beispiel eines Herbizids. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example), Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst, Braunschweig, 38, 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971), Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. **AEROBE UND ANAEROBE TRANSFORMATION IM BODEN**

1. **METHODE**

Diese Testmethode entspricht der Prüfrichtlinie OECD TG 307 (2002)

1.1. EINLEITUNG

Die Testmethode basiert auf bestehenden Richtlinien (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Das in dieser Testmethode beschriebene Verfahren soll eine Evaluierung der aeroben und anaeroben Transformationsprozesse von Chemikalien im Boden ermöglichen. Die Tests sind so konzipiert, dass i) die Transformationsrate der Testsubstanz und ii) die Art der Transformationsprodukte sowie Bildungs- und Abbauraten bestimmt werden. So können die Konzentrationen von Chemikalien bzw. deren Transformationsprodukten, denen Pflanzen und Bodenorganismen ausgesetzt sein können, errechnet werden. Solche Untersuchungen sind für Chemikalien erforderlich, die direkt auf den Boden ausgebracht werden bzw. bei denen die Möglichkeit besteht, dass sie in den terrestrischen Bereich gelangen. Die Ergebnisse solcher Laboruntersuchungen können auch dazu genutzt werden, Probenahme- und Analysevorschriften für gleich gelagerte Feldstudien zu entwickeln.

Im Allgemeinen sind aerobe und anaerobe Untersuchungen mit einer Bodenart für die Untersuchung der Transformationspfade im Boden ausreichend (8) (10) (11). Die Transformationsraten sollten mit mindestens drei zusätzlichen Böden bestimmt werden (8) (10).

Auf einem OECD-Workshop zur Boden-/Sedimentauswahl, der 1995 im italienischen Belgirate stattfand (10), wurden insbesondere die Anzahl und Arten der in diesem Test zu verwendenden Böden vereinbart. Die im Test verwendeten Böden sollten repräsentativ für die im Freiland bei Chemikalieneinsatz bzw. -eintrag exponierten Boden sein. So sollten etwa Chemikalien, die möglicherweise in subtropischem bis tropischem Klima freigesetzt werden, mit Ferrasolen oder Nitosolen (FAO-System) getestet werden. Des Weiteren gab der Workshop basierend auf der ISO-Anleitung (15) Empfehlungen zur Entnahme, Handhabung und Lagerung von Bodenproben. Die Verwendung von Reisböden ist in dieser Methode ebenfalls berücksichtigt.

1.2. DEFINITIONEN

**Testsubstanz**: jede Substanz, ob Ausgangssubstanz oder relevante Transformationsprodukte.

**Transformationsprodukte**: alle Substanzen, die durch biotische oder abiotische Transformationsreaktionen der Testsubstanz entstehen, einschließlich $CO_2$ und Reaktionsprodukte in gebundenen Rückständen.

**Gebundene Rückstände**: „Gebundene Rückstände“ sind Verbindungen in Boden, Pflanzen oder Tieren, die nach einer Extraktion in der Matrix in Form der Ausgangssubstanz oder deren Metaboliten/-Transformationsprodukte(n) verbleiben. Die Extraktionsmethode darf die Verbindungen selbst oder die Matrixstruktur nicht wesentlich verändern. Durch matrixverändernde Extraktionsmethoden und hochentwickelte Analysenvertahren kann die Art der Bindung zum Teil geklärt werden. Bislang werden z. B. kovalente Ionen- und Sorptionsbindungen sowie Einschlüsse auf diese Weise nachgewiesen. In aller Regel bedeutet die Bildung von gebundenen Rückständen eine deutliche Verminderung der Bioverfügbarkeit (12) (modifiziert nach IUPAC 1984 (13)).

**Aerobe Transformation**: in Gegenwart von molekularem Sauerstoff ablaufende Reaktionen (14).

▼B

**Anaerobe Transformation**: unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff ablaufende Reaktionen (14).

**Boden**: ein Gemisch mineralischer und organisch-chemischer Bestandteile, wobei Letztere Verbindungen mit hohem Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt sowie einem hohen Molekulargewicht enthalten und mit kleinen (zumeist Mikro-)Organismen belebt sind. Boden kann in zwei Zustandsformen bearbeitet werden:

a) ungestört, wie er sich im Laufe der Zeitentwickelt hat, mit der charakteristischer Horizontabfolge der verschiedenen Bodentypen;

b) gestört, wie er in der Regel auf landwirtschaftlich genutzten Flächen vorzufinden ist oder wie er vorkommt, wenn Proben durch Graben entnommen und in der beschriebenen Testmethode verwendet werden (14).

**Mineralisation**: vollständiger Abbau einer organischen Verbindung zu $CO_2$ und $H_2O$ unter aeroben Bedingungen und zu $CH_4$, $CO_2$ und $H_2O$ unter anaeroben Bedingungen. Im Zusammenhang mit dieser Testmethode, bei der eine $^{14}C$-markierte Verbindung verwendet wird, bedeutet Mineralisation einen extensiven Abbau, wobei ein markiertes Kohlenstoffatom unter Freisetzung der entsprechenden Menge $^{14}CO_2$ oxidiert wird (14).

**Halbwertszeit $t_{0,5}$**: die für die 50 %ige Transformation einer Testsubstanz ermittelte Zeit, wenn die Transformation mittels Kinetik erster Ordnung beschrieben werden kann; sie ist konzentrationsunabhängig.

**Abbauzeit $DT_{50}$**: Zeitspanne, in der sich die Konzentration der Testsubstanz um 50 % reduziert hat; sie unterscheidet sich von der Halbwertszeit $t_{0,5}$, wenn die Transformation nicht nach der Kinetik erster Ordnung erfolgt.

**Abbauzeit $DT_{75}$**: Zeitspanne, in der sich die Testsubstanzkonzentration um 75 % reduziert hat.

**Abbauzeit $DT_{90}$**: Zeitspanne, in der sich die Testsubstanzkonzentration um 90 % reduziert hat.

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Referenzsubstanzen sollten zur Charakterisierung und/oder zur Identifizierung von Transformationsprodukten mittels spektroskopischer und chromatografischer Verfahren verwendet werden.

1.4. ANWENDBARKEIT DES TESTS

Die Methode ist auf sämtliche chemischen Substanzen (nicht markiert oder radioaktiv markiert) anwendbar, für die ein Analysenverfahren mit hinreichender Genauigkeit und Empfindlichkeit zur Verfügung steht. Sie ist anwendbar auf schwach flüchtige, nichtflüchtige, wasserlösliche oder wasserunlösliche Verbindungen, Bei Chemikalien, die aus Böden hochflüchtig sind (z. B. Begasungsmittel oder organische Lösungsmittel) und somit unter den Testbedingungen dieses Tests nicht im Boden gehalten werden können, sollte der Test nicht angewendet werden.

▼B

1.5. INFORMATIONEN ZUR TESTSUBSTANZ

Zur Messung der Transformationsrate kann nicht markierte oder markierte Testsubstanz verwendet werden. Markiertes Material ist zur Untersuchung des Umwandlungswegs und zur Aufstellung einer Massenbilanz notwendig. Empfohlen wird die $^{14}C$-Markierung, doch auch der Einsatz anderer Isotope wie $^{13}C$, $^{15}N$, $^{3}H$ oder $^{32}P$ kann sinnvoll sein. Die Markierung sollte möglichst im stabilsten Teil, bzw, in den stabilsten Teilen des Moleküls positioniert sein ([1]). Der Reinheitsgrad der Testsubstanz sollte mindestens 95 % betragen.

Vor der Durchführung eines Tests zur aeroben und anaeroben Transformation im Boden sollten folgende Informationen zur Testsubstanz vorliegen:

a) Wasserlöslichkeit (Methode A.6);

b) Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln;

c) Dampfdruck (Methode A.4) und Henry-Konstante;

d) n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (Methode A.8);

e) chemische Stabilität im Dunkeln (Hydrolyse) (Methode C.7);

f) $pK_a$, wenn ein Molekül zur Protonierung oder Deprotonierung neigt (OECD Guideline 112) (16).

Außerdem können Angaben zur Toxizität der Testsubstanz gegenüber Bodenmikroorganismen sinnvoll sein (Testmethoden C.21 und C.22) (16).

Es sollten Analysenmethoden (einschließlich Extraktions- und Reinigungsverfahren) zur Identifizierung und Quantifizierung der Testsubstanz sowie ihrer Transformationsprodukte verfügbar sein.

1.6. PRINZIP DER TESTMETHODE

Den Bodenproben wird die Testsubstanz zugefügt, und die Proben werden im Dunkeln in einem Biometergefäß oder einem Durchflusssystem unter kontrollierten Laborbedingungen (bei konstanter Temperatur und Bodenfeuchtigkeit) inkubiert. Nach entsprechenden Zeitintervallen werden die Bodenproben extrahiert und auf die Ausgangssubstanz und Transformationsprodukte analysiert. Außerdem werden flüchtige Produkte mit Hilfe geeigneter Absorptionsvorrichtungen für die Analyse gesammelt. Mittels $^{14}C$-markiertem Material können die verschiedenen Mineralisationsraten von Testsubstanzen durch Auffangen von entstandenem $^{14}CO_2$ gemessen werden, und es kann eine Massenbilanz, einschließlich der Bildung von bodengebundenen Rückständen, aufgestellt werden.

1.7. QUALITÄTSKRITERIEN

1.7.1. **Wiederfindungsraten**

Die Extraktion und Analyse von mindestens zwei parallel angesetzten Bodenproben unmittelbar nach Zugabe der Testsubstanz geben einen ersten Hinweis auf die Wiederholbarkeit der Analysenmethode und die gleichmäßige Verteilung der Testsubstanz bei der Applikation. Die Wiederfindungsraten für spätere Testphasen ergeben sich aus den jeweiligen Massenbilanzen. Die Wiederfindungsraten sollten im Bereich von 90-110 % für markierte Chemikalien (8) und von 70-110 % für nicht markierte Chemikalien (3) liegen.

([1]) Wenn beispielsweise die Testsubstanz einen Ring enthält, muss sich die Markierung auf diesem Ring befinden; enthält die Testsubstanz zwei oder mehr Ringe, können gesonderte Untersuchungen erforderlich sein, um den Verbleib jedes markierten Ringes zu erfassen und sachgerechte Informationen zur Bildung von Transformationsprodukten zu gewinnen.

▼B

1.7.2. **Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit der Analysenmethode**

Die Wiederholbarkeit der Analysenmethode (ausgenommen die Effizienz der Extraktion im Anfangsstadium) zur Quantifizierung der Testsubstanz und der Transformationsprodukte kann durch eine parallele Analyse desselben Extrakts einer Bodenprobe, die hinreichend lange zur Bildung von Transformationsprodukten inkubiert wurde, überprüft werden.

Die Nachweisgrenze („limit of detection; LOD“) der Analysenmethode für die Testsubstanz und für die Transformationsprodukte sollte mindestens 0,01 mg· $kg^{-1}$ Boden (als Testsubstanz) oder — falls dieser Wert niedriger ist — 1 % der Applikationskonzentration betragen. Die Quantifizierungsgrenze („limit of quantification; LOQ“) sollte ebenfalls spezifiziert werden.

1.7.3. **Genauigkeit der Transformationsdaten**

Geeignete Informationen über die Zuverlässigkeit der Transformationskurve lassen sich mittels Regressionsanalyse aus denTestsubstanzkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit gewinnen, die auch die Berechnung des Vertrauensbereichs für Halbwertszeiten (im Falle einer Kinetik pseudo-erster Ordnung) bzw. $DT_{50}$-Werte und ggf. für $DT_{75}$- und $DT_{90}$-Werte ermöglicht.

1.8. BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

1.8.1. **Geräte und chemische Reagenzien**

Inkubationssysteme bestehen aus statischen geschlossenen Systemen oder geeigneten Durchflusssystemen (7) (17). Beispiele für eine geeignete Durchfluss-Bodeninkubationsapparatur und ein Biometergefäß sind in den Abbildungen 1 bzw. 2 dargestellt. Beide Arten von Inkubationssystemen haben Vorteile und Einschränkungen (7) (17).

Erforderlich ist die Standardlaborausstattung, insbesondere Folgendes:

— Analysengeräte, z. B. GLC-, HPLC-, TLC-Ausstattung, einschließlich geeigneter Detektionssysteme für die Analyse radioaktiv markierter oder nicht markierter Substanzen oder für die inverse Isotopenverdünnungsmethode;

— Geräte für Identifizierungszwecke (z. B. MS, GC-MS, HPLC MS, NMR);

— Flüssigkeitsszintillationszähler;

— Oxidiser für die Verbrennung von radioaktivem Material;

— Zentrifuge;

— Extraktionsgerät (z. B. Zentrifugengläser für die Kaltextraktion und ein Soxhlet-Apparat für die kontinuierliche Extraktion unter Rückfluss);

— Instrumente zum Einengen von Lösungen und Extrakten (z. B. Rotationsverdampfer);

— Wasserbad;

— mechanische Mischvorrichtung (z. B. Knetmaschine, Rotationsmischer).

▼B

Einzusetzende chemische Reagenzien sind z. B.:

— NaOH, analysenrein, 2 mol· $dm^{-3}$, oder eine andere geeignete Base (z. B. KOH, Ethanolamin);

— $H_2SO_4$, analysenrein, 0,05 mol· $dm^{-3}$;

— Ethylenglykol, analysenrein;

— feste Absorptionsmittel wie Natronkalk und Polyurethanstopfen;

— organische Lösungsmittel, analysenrein, wie Aceton, Methanol usw.;

— Szintillationsflüssigkeit.

1.8.2. **Applikation der Testsubstanz**

Für die Zugabe zum Boden und die Verteilung darin kann die Testsubstanz in Wasser (entionisiert oder destilliert) oder — falls notwendig — in möglichst geringen Mengen Aceton oder anderen organischen Lösungsmitteln (6) gelöst werden, in denen die Testsubstanz hinreichend löslich und stabil ist. Die gewählte Lösungsmittelmenge sollte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Bodenmikroorganismen haben (siehe Abschnitte 1.5, 1.9.2 und 1.9.3). Die Verwendung von Lösungsmitteln, die die Aktivität der Bodenmikroorganismen hemmen, wie etwa Chloroform, Dichlormethan oder andere halogenierte Lösungsmittel, ist zu vermeiden.

Die Testsubstanz kann auch als Feststoff zugegeben werden, z. B. in Quarzsand (6) eingemischt oder in einer kleinen Teilprobe des Testbodens, die zuvor luftgetrocknet und sterilisiert wurde. Wird die Testsubstanz unter Verwendung eines Lösungsmittels zugegeben, muss das Lösungsmittel verdampfen können, bevor die Teilprobe der ursprünglichen nicht sterilen Bodenprobe zugesetzt wird.

Bei gebräuchlichen Chemikalien, deren Eintrag in den Boden hauptsächlich über Klärschlamm/Anwendung in der Landwirtschaft erfolgt, sollte die Testsubstanz zuerst dem Schlamm zugesetzt werden, der dann in die Bodenprobe eingebracht wird (siehe 1.9.2 und 1.9.3).

Die Verwendung von formulierten Handelsprodukten wird nicht routinemäßig empfohlen. Sie kann jedoch z. B. bei schlecht löslichen Testsubstanzen eine geeignete Alternative sein.

1.8.3. **Böden**

1.8.3.1. *Bodenauswahl*

Zur Bestimmung der Transformationswege kann ein repräsentativer Boden verwendet werden; empfohlen werden sandiger Lehm oder schluffiger Lehm oder Lehm oder lehmiger Sand (gemäß FAO und USDA-Klassifikation (18)) mit einem pH-Wert von 5,5-8,0, einem organischen Kohlenstoffgehalt von 0,5-2,5 % und einer mikrobiellen Biomasse von mindestens 1 % des gesamten organischen Kohlenstoffs (10).

Zur Untersuchung der Transformationsraten sollten mindestens drei zusätzliche Böden verwendet werden, die einen Bereich aller relevanten Böden repräsentieren. Die Böden sollten sich hinsichtlich des organischen Kohlenstoffgehalts, des pH-Werts, des Tongehalts und der mikrobiellen Biomasse voneinander unterscheiden (10).

▼B

Alle Böden sollten mindestens hinsichtlich folgender Eigenschaften charakterisiert werden: Textur ( % Sand, % Schluff, % Ton) (gemäß FAO und der USDA-Klassifikation (18)), pH-Wert, Kationenaustauschkapazität, organischer Kohlenstoffgehalt, Bodendichte, Wasserrückhalteeigenschaft ([1]) und mikrobielle Biomasse (nur für aerobe Untersuchungen), Zusätzliche Informationen über Bodeneigenschaften können für die Interpretation der Ergebnisse von Nutzen sein. Zur Bestimmung der Bodeneigenschaften können die in den Literaturangaben (19) (20) (21) (22) (23) empfohlenen Methoden herangezogen werden. Die mikrobielle Biomasse sollte mit Hilfe der substratinduzierten Respirationsmethode (SIR) (25) (26) oder alternativer Verfahren (20) bestimmt werden.

1.8.3.2. *Probenahme, Handhabung und Lagerung von Böden*

Es sind ausführliche Informationen über die Geschichte des Feldstandorts erforderlich, von dem der Testboden entnommen wird. Die Angaben betreffen unter anderem die genaue Lage, den Bewuchs, Behandlungen mit Chemikalien sowie mit organischen und anorganischen Düngemitteln, Zusätze biologischer Materialien oder anderer Verunreinigungen. Böden, die in den vorhergehenden 4 Jahren mit der Testsubstanz oder ihren Struktur-Analoga behandelt worden sind, sollten nicht für die Transformationsuntersuchungen verwendet werden (10) (15).

Der Boden sollte feldfrisch entnommen werden (aus dem A-Horizont oder bis zu einer Tiefe von maximal 20 cm) und einen Bodenwassergehalt aufweisen, der das Sieben ermöglicht. Bei Böden, die nicht von Reisfeldern stammen, sollte die Probenahme während oder unmittelbar nach längeren (> 30 Tage) Dürre-, Frost- oder Überschwemmungsperioden vermieden werden (14). Die Proben sollten so transportiert werden, dass der Bodenwassergehalt möglichst unverändert bleibt, und sie sollten unter freiem Luftzutritt dunkel aufbewahrt werden. Im Allgemeinen ist ein locker verschlossener Polyethylenbeutel geeignet.

Der Boden sollte so schnell wie möglich nach der Probenahme bearbeitet werden. Vegetationsreste, größere Bodentiere und Steine sollten entfernt werden, bevor der Boden durch ein Sieb mit 2 mm Maschenweite gegeben wird, um kleine Steine, Bodentiere und Pflanzenteile zu entfernen. Ein übermäßiges Austrocknen und Zerkleinern des Bodens vor dem Sieben ist zu vermeiden (15).

Wenn die Probenahme auf dem Feld im Winter schwierig ist (Boden gefroren oder schneebedeckt), kann auf Boden zurückgegriffen werden, der im Gewächshaus unter einer Pflanzenabdeckung (Gras oder Gras-Klee-Mischung) gelagert wurde. Untersuchungen mit feldfrischen Böden werden in jedem Fall bevorzugt, doch wenn der entnommene und bearbeitete Boden vor Beginn der Untersuchungen gelagert werden muss, dann unter angemessenen Bedingungen und nur für eine begrenzte Dauer (höchstens drei Monate bei 4 ± 2 °C), um die rnikrobielle Aktivität zu erhalten ([2]). Ausführliche Anweisungen zur Probenahme, Handhabung und Lagerung von Böden für Untersuchungen der Biotransformation sind zu finden in (8) (10) (15) (26) (27).

([1]) Die Wasserrückhalteeigenschaft eines Bodens lässt sich als Feldkapazität, als Wasserhaltekapazität oder als Wassersaugspannung (pF) messen. Erläuterungen siehe Anlage 1. Im Testbericht ist festzuhalten, ob die Wasserrückhalteeigenschaft und die Bodendichte von Böden bei ungestörten Feldproben oder gestörten (bearbeiteten) Proben ermittelt wurden.

([2]) Aktuelle Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass Böden aus den gemäßigten Klimazonen bei — 20 °C sogar mehr als drei Monate gelagert werden können (28) (29), ohne dass die mikrobielle Aktivität wesentlich zurückgeht.

▼B

Bevor der bearbeitete Boden für diesen Test verwendet wird, sollte er vorinkubiert werden, um das Keimen und Entfernen von Samen zu ermöglichen und im Anschluss an den Wechsel von den Probenahme- oder Lagerungsbedingungen zu den Inkubationsbedingungen wieder ein Gleichgewicht des Mikrobenstoffwechsels herzustellen. Im Allgemeinen ist eine Vorinkubationsdauer von 2 bis 28 Tagen unter annähernder Einhaltung der Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen des eigentlichen Tests ausreichend (15). Lagerung und Vorinkubation sollten zusammengenommen nicht länger als drei Monate dauern.

1.9. DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1.9.1. **Testbedingungen**

1.9.1.1. *Testtemperatur*

Während der gesamten Testdauer sollten die Böden im Dunkeln bei einer konstanten Temperatur inkubiert werden, die für die klimatischen Bedingungen, unter denen der Einsatz bzw. die Freisetzung erfolgt. repräsentativ ist. Für alle Testsubstanzen, die in gemäßigten Klimazonen in den Boden gelangen können, wird eine Temperatur von 20 ± 2 °C empfohlen. Die Temperatur sollte überwacht werden.

Bei Chemikalien, die in kälteren Klimazonen angewandt bzw. eingetragen werden (z. B. in nördlichen Ländern oder während des Herbstes/Winters), sollten zusätzlich Bodenproben bei einer niedrigeren Temperatur inkubiert werden(z. B. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Feuchtegehalt*

Bei Transformationstests unter aeroben Bedingungen sollte der Feuchtegehalt ([1]) des Bodens auf einen pF Wert von 2,0 bis 2,5 eingestellt und bei diesem Wert gehalten werden(3). Der Feuchtegehalt des Bodens wird als Masse Wasser pro Masse Boden (Trockengewicht) ausgedrückt und sollte regelmäßig kontrolliert werden (z. B. alle zwei Wochen), indem die Inkubationsgefäße gewogen und Wasserverluste ersetzt werden (vorzugsweise mit sterilfiltriertem Leitungswasser). Es ist darauf zu achten, dass während der Zugabe von Feuchtigkeit Verluste von Testsubstanz und/oder Transformationsprodukten durch Verflüchtigung und/oder ggf. fotochemischen Abbau möglichst verhindert oder minimiert werden.

Für Transformationstests unter anaeroben und Reisanbaubedingungen wird der Boden durch Überflutung mit Wasser gesättigt.

1.9.1.3. *Aerobe Inkubationsbedingungen*

Bei Durchflusssystemen werden aerobe Bedingungen durch diskontinuierliches Spülen oder kontinuierliches Belüften mit befeuchteter Luft aufrechterhalten. In Biometergefäßen wird der ständige Austausch von Luft durch Diffusion ermöglicht.

1.9.1.4. *Sterile aerobe Bedingungen*

Um Informationen über die Relevanz der abiotischen Transformation einer Testsubstanz zu gewinnen, können Bodenproben sterilisiert (zu Sterilisationsverfahren vgl. (16) und (29)), mit einer sterilen Testsubstanz behandelt (z. B. Zugabe der Lösung durch ein Sterilfilter) und mit steriler befeuchteter Luft, wie in 1.9.1.3 beschrieben, belüftet werden. Bei Reisböden sollten Boden und Wasser sterilisiert und die Inkubation wie in 1.9.1.6 beschrieben durchgeführt werden.

([1]) Der Boden sollte weder zu feucht noch zu trocken sein, um eine adäquate Belüftung und Ernährung der Bodenmikroflora zu gewährleisten. Für ein optimales Wachstum der Bodenmikroorganismen wird ein Feuchtegehalt von 40-60 % der Wasserhaltekapazität (WHK) und von 0,1-0,33 bar empfohlen (6). Der letztere Bereich entspricht einem pF-Bereich von 2,0-2,5. Typische Feuchtegehalte verschiedener Bodenarten sind in Anlage 2 aufgeführt.

▼B

1.9.1.5. *Anaerobe Inkubationsbedingungen*

Zum Erreichen und Aufrechterhalten anaerober Bedingungen wird der mit der Testsubstanz behandelte und unter aerober Bedingungen für 30 Tage bzw. eine Halbwertszeit oder $DT_{50}$ (je nachdem, was kürzer ist) inkubierte Boden mit Wasser überflutet (Wassersäule 1-3 cm), und das Inkubationssystem wird mit einem inerten Gas (z. B. Stickstoff oder Argon) gespült ([1]). Das Testsystem muss Messungen z. B. des pH-Werts, der Sauerstoffkonzentration und des Redoxpotenzials ermöglichen und Absorptionsfallen für flüchtige Reaktionsprodukte beinhalten. Das Biometersystem muss geschlossen sein, um den Zutritt von Luft durch Diffusion zu vermeiden.

1.9.1.6. *Inkubation unter Reisfeldbedingungen*

Zur Untersuchung der Transformation in Reisfeldböden wird der Boden mit einer Wassersäule von etwa 1-5 cm Höhe überflutet und die Testsubstanz in die Wasserphase appliziert (9). Es wird eine Bodentiefe von mindestens 5 cm empfohlen. Das System wird mit Luft wie unter aeroben Bedingungen belüftet. Der pH-Wert, die Sauerstoffkonzentration und das Redoxpotenzial der Wassersäule sollten überwacht und aufgezeichnet werden. Vor der Aufnahme der Transformationsuntersuchungen ist eine Vorinkubationsdauer von mindestens zwei Wochen erforderlich (siehe 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Testdauer*

Die Untersuchungen zu Geschwindigkeit und Transformationsverlauf sollten nicht länger als 120 Tage dauern ([2]) (3) (6) (8), da danach in einem künstlichen Laborsystem, isoliert von natürlichen Revitalisierungsprozessen, eine Abnahme der mikrobiellen Aktivität im Boden mit der Zeit zu erwarten wäre. Falls es für die Charakterisierung des Testsubstanzabbaus sowie der Bildung und des Abbaus der Transformationsprodukte erforderlich ist, können die Untersuchungen über längere Zeiträume fortgesetzt werden (z. B. 6 oder 12 Monate) (8). Längere Inkubationszeiten sollten im Testbericht begründet und durch Biomassemessungen im Verlauf und am Ende dieser Zeiträume begleitet werden.

1.9.2. **Durchführung des Tests**

In jedes Inkubationsgefäß werden etwa 50 bis 200 g Boden (Bezugsbasis Trockengewicht) gegeben (siehe Abbildungen 1 und 2 in Anlage 3), und der Boden wird nach einem der in 1.8.2 beschriebenen Verfahren mit der Testsubstanz behandelt. Werden organische Lösungsmittel für die Applikation der Testsubstanz verwendet, sollten sie durch Verdampfen aus dem Boden entfernt werden. Anschließend wird der Boden mit einem Spatel und/oder durch Schütteln des Gefäßes gründlich durchmischt. Wird die Untersuchung unter Reisfeldbedingungen durchgeführt, sollten Boden und Wasser nach Applikation der Testsubstanz gründlich gemischt werden. Zur Überprüfung der gleichmäßigen Verteilung sollten kleine Aliquoten (z. B. 1 g) des behandelten Bodens auf die Testsubstanzgehalte analysiert werden. Angaben zu einem alternativen Verfahren siehe unten.

([1]) Wie ein von der EU gefördertes Forschungsprojekt gezeigt hat, herrschen in Oberböden und selbst in Böden aus Tiefenschichten aerobe Bedingungen vor (K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17.-21. August 1992, Sigtuna, Schweden). Anaerobe Bedingungen kommen nur gelegentlich bei Überschwemmungen von Böden nach schweren Niederschlägen oder bei der Herstellung von Anbaubedingungen auf Reisfeldern vor.

([2]) Aerobe Untersuchungen können weit vor Ablauf von 120 Tagen beendet werden, wenn zu diesem Zeitpunkt der Abbauweg eindeutig identifiziert wurde und die vollständige Mineralisation erreicht worden ist. Beendet werden kann der Test nach 120 Tagen oder wenn mindestens 90 % der Testsubstanz umgewandelt sind, jedoch nur, wenn sich mindestens 5 % $CO_2$ gebildet haben.

▼B

Die Testkonzentration sollte der höchsten Anwendungsrate eines Pflanzenschutzmittels laut den Empfehlungen in der Gebrauchsanleitung und einer gleichmäßigen Einarbeitung in eine geeignete Tiefe im Feld (z. B. bis zu einer Tiefe von 10 cm [1]) in den Boden) entsprechen. So beträgt z. B. bei Chemikalien, die auf die Blätter oder den Boden ohne Einarbeitung ausgebracht werden, die geeignete Tiefe für die Berechnung der in jedes Gefäß zu gebenden Chemikalie 2,5 cm. Bei in den Boden eingearbeiteten Chemikalien ist die geeignete Tiefe die in der Gebrauchsanleitung genannte Einarbeitungstiefe. Für Chemikalien im Allgemeinen sollte die Applikationsrate basierend auf dem Haupteintragspfad gewählt werden. Wenn z. B. der Eintrag in den Boden hauptsächlich über Klärschlamm erfolgt, sollte die Chemikalie im Schlamm so dosiert werden, dass ihre Konzentration im Verhältnis zu der erwarteten Schlammkonzentration steht, und der dem Boden zugegebene Schlamm sollte im Verhältnis zum üblichen Schlammeintrag in landwirtschaftlich genutzte Böden stehen. Ist diese Konzentration nicht hoch genug, um die wichtigsten Transformationsprodukte nachzuweisen, kann eine Inkubation gesonderter Bodenproben mit höheren Mengen hilfreich sein, doch sollten zu hohe Mengen, die die Funktionen der Bodenmikroorganismen beeinflussen, vermieden werden (siehe 1.5 und 1.8.2).

Alternativ kann eine größere Charge (d. h. 1 bis 2 kg) Boden mit der Testsubstanz behandelt werden; dieser Ansatz wird in einem geeigneten Mischgerät sorgfältig gemischt und anschließend in kleinen Teilen von 50 bis 200 g in die Inkubationsgefäße gegeben (z. B. unter Verwendung von Probenteilern). Zur Überprüfung der gleichmäßigen Verteilung sollten kleine Aliquoten (z. B. 1 g) des behandelten Bodens auf die Testsubstanzgehalte analysiert werden. Ein solches Verfahren wird bevorzugt, da es eine gleichmäßigere Verteilung der Testsubstanz im Boden ermöglicht.

Zusätzlich zu den mit Testsubstanz behandelten Proben werden unbehandelte Bodenproben unter den gleichen Bedingungen (aerob) inkubiert. Diese Proben werden zur Messung der Biomasse im Verlauf und am Ende der Untersuchungen herangezogen.

Wird die Testsubstanz mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels/ mehrerer organischer Lösungsmittel gelöst auf den Boden aufgebracht, werden mit der gleichen Menge des Lösungsmittels/der Lösungsmittel behandelte Bodenproben unter den gleichen Bedingungen (aerob) inkubiert, wie die mit der Testsubstanz behandelten Proben. Diese Proben werden zur Biomassemessung zu Testbeginn, während des Tests und zu Testende herangezogen, um die Wirkungen des Lösungsmittels/der Lösungsmittel auf die mikrobielle Biomasse zu prüfen.

Die den behandelten Boden enthaltenden Gefäße werden entweder an das in Abbildung 1 dargestellte Durchflusssystem angeschlossen oder mit der in Abbildung 2 gezeigten Absorptionskolonne verschlossen (siehe Anlage 3).

---

([1]) Die Berechnung der Ausgangskonzentration eines Standorts beruht auf folgender Gleichung:

$$C_{Boden}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha]\cdot 10^{6}[mg/kg]}{l[m]\cdot 10^{4}[m^{2}/ha]\cdot d[kg_{soil}/m^{3}]}$$

$C_{Boden}$ = $C_{soil}$ = Ausgangskonzentration im Boden (mg·kg-1); kgsoil = kgBoden
A = Aufwandrate (kg· $ha^{-1}$); l = Dicke der Bodenschicht am Feldstandort (m); d = Bodendichte des trockenen Bodens (kg· $m^{-3}$).
Als Faustregel gilt, dass eine Aufwandrate von 1 kg· $ha^{-1}$ in einer Bodenkonzentration von ca. 1 mg· $kg^{-1}$ in einer 10-cm-Schicht resultiert (ausgehend von einer Bodendichte von 1 g· $cm^{-3}$).

▼B

1.9.3. **Probenahme und Messung**

Parallel-Inkubationsgefäße werden in entsprechenden Zeitintervallen entnommen und die Bodenproben mit geeigneten Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität extrahiert und auf die Testsubstanz und/-oder Transformationsprodukte analysiert. Bei einer gut konzipierten Untersuchung ist eine ausreichende Zahl von Gefäßen vorgesehen, so dass zu jedem Probenahmetermin zwei Gefäße entnommen werden. Zudem werden in verschiedenen Zeitintervallen (7-Tage-Intervalle während des ersten Monats und 17-Tage-Intervalle nach einem Monat) Absorptionslösungen bzw. feste Absorptionsmittel im Verlauf und am Ende der Inkubation jeder Bodenprobe entfernt und auf flüchtige Produkte analysiert. Abgesehen von einer unmittelbar nach der Applikation (0-Tage-Probe) genommenen Bodenprobe sollten mindestens 5 zusätzliche Probenahmetermine vorgesehen sein. Die Zeitintervalle sollten derart ausgewählt werden, dass ein Abbauschema für die Testsubstanz und ein Bitdungs- und Abbauschema für die Transformationsprodukte erstellt werden können (z. B. 0, 1, 3, 7 Tage; 2, 3 Wochen; 1, 2, 3 Monate usw.).

Wird eine $^{14}C$-markierte Testsubstanz verwendet, wird die nicht extrahierbare Radioaktivität durch Verbrennung quantifiziert, und für jedes Probenahmeintervall wird eine Massenbilanz berechnet.

Im Falle einer anaeroben Inkubation sowie einer Inkubation unter Reisfeldbedingungen werden die Boden- und Wasserphasen gemeinsam auf die Testsubstanz und Transformationsprodukte analysiert oder vor der Extraktion und Analyse durch Filtrieren oder Zentrifugieren abgetrennt.

1.9.4. **Fakultative Tests**

Aerobe, nichtsterile Untersuchungen bei zusätzlichen Temperaturen und Bodenfeuchten können sinnvoll sein, wenn es darum geht, den Einfluss von Temperatur und Bodenfeuchte auf die Transformationsgeschwindigkeit einer Testsubstanz und/oder ihrer Transformationsprodukte im Boden abzuschätzen.

Eine weitere Charakterisierung von nicht extrahierbarer Radioaktivität kann z. B. mittels überkritischer Flüssigextraktion versucht werden.

2. **DATEN**

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Konzentrationen der Testsubstanz, Transformationsprodukte, flüchtigen Substanzen (nur in %) und nicht extrahierbaren Substanzen sollten in % der applizierten Ausgangskonzentration und ggf. in $mg \cdot kg^{-1}$ Boden (Bezugsbasis Trockengewicht) für jedes Probenahmeintervall angegeben werden. Eine Massenbilanz in Prozent, bezogen auf die Ausgangskonzentration, sollte für jedes Probenahmeintervall erstellt werden. Eine grafische Darstellung der Testsubstanzkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit wird eine Einschätzung der Transformationshalbwertszeit bzw. der $DT_{50}$ ermöglichen. Die Haupttransformationsprodukte sollten identifiziert und ihre Konzentrationen ebenfalls über der Zeit aufgetragen werden, um die jeweilige Geschwindigkeit ihrer Bildung und ihres Abbaus aufzuzeigen. Ein Haupttransformationsprodukt ist jedes Reaktionsprodukt, das zu irgendeinem Zeitpunkt des Tests mit einer Konzentration $\geq$ 10 % der Applikationskonzentration vorliegt.

Die aufgefangenen flüchtigen Produkte geben Hinweise auf das Flüchtigkeitspotenzial einer Testsubstanz und ihrer Transformationsprodukte im Boden.

▼B

Eine genauere Bestimmung der Halbwertszeiten bzw. $DT_{50}$-Werte und ggf. $DT_{75}$- und $DT_{90}$-Werte sollte durch die Anwendung geeigneter Kinetik-Modellberechnungen möglich sein. Die Halbwertszeiten und $DT_{50}$-Werte sollten zusammen mit der Beschreibung des verwendeten Modells, der Kinetikordnung und des Determinationskoeffizienten ($r^2$) angegeben werden. Bevorzugt wird die Kinetik erster Ordnung, sofern nicht $r^2 < 0{,}7$. Ggf. sollten die Berechnungen auch bei den Haupttransformationsprodukten angewendet werden. Beispiele für zweckmäßige Modelle sind in den Literaturangaben (31) bis (35) beschrieben.

Wurden Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt, sollten die Transformationsraten in Abhängigkeit von der Temperatur innerhalb des eingesetzten experimentellen Temperaturbereichs dargestellt werden, und zwar unter Verwendung der Arrhenius-Gleichung, in der Form:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ oder } \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

wobei ln A und B Regressionskonstanten aus dem Achsenabschnitt bzw. der Steigung einer Ausgleichsgeraden sind, die durch lineare Regression von ln k gegen 1/T erzeugt wird. k ist die Geschwindigkeitskonstante bei der Temperatur T und T ist die Temperatur in Kelvin ist. Es ist auf den begrenzten Temperaturbereich zu achten, in dem die Arrhenius-Gleichung gültig ist, wenn die Transformation auf mikrobieller Aktivität beruht.

2.2. EVALUIERUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Obwohl die Untersuchungen in einem künstlichen Laborsystem stattfinden, lassen die Ergebnisse doch eine Einschätzung der Transformationsrate der Testsubstanz und auch der Bildungs- und Abbaurate der Transformationsprodukte unter Feldbedingungen zu (36) (37).

Eine Untersuchung der Transformationswege einer Testsubstanz vermittelt Erkenntnisse über die Art und Weise wie die Substanz im Boden in ihrer Struktur durch chemische und mikrobielle Reaktion verändert wird.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

TESTBERICHT

Der Testbericht muss folgende Angaben enthalten:

Testsubstanz:

— Common Name (Handelsname von Pflanzenschutzmitteln), systematischer chemischer Name, CAS-Nummer, Strukturformel (bei Verwendung radioaktiv markierter Chemikalien Angabe des Markierungsorts) und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften (siehe 1.5);

— Reinheit (Verunreinigungen) der Testsubstanz;

— für markierte Chemikalien: radiochemische Reinheit und spezifische Aktivität (falls zutreffend).

Referenzsubstanzen:

— Systematischer chemischer Name und Struktur der Referenzsubstanzen, die zur Charakterisierung und/oder Identifizierung von Transformationsprodukten verwendet werden.

Testböden:

— Angaben zum Probenahmeort;

— Datum und Verfahren der Probenahme;

▼B

— Bodeneigenschaften, z. B. pH-Wert, organischer Kohlenstoffgehalt, Textur ( % Sand, % Schluff, % Ton), Kationenaustauschkapazität, Bodendichte, Wasserrückhalteeigenschaft und mikrobielle Biomasse;

— ggf. Lagerungsdauer und -bedingungen.

Testbedingungen:

— Angabe aller Kalenderdaten in Zusammenhang mit der Testdurchführung;

— Applikationsmenge der Testsubstanz;

— verwendete Lösungsmittel und Art der Testsubstanzapplikation;

— Bodengewicht zu Testbeginn und zu jedem Probenahmetermin, der Analytik einschließt;

— Beschreibung des verwendeten Inkubationssystems;

— Luftdurchflussrate (nur für Durchflusssysteme);

— Versuchstemperatur;

— Bodenfeuchtegehalt während der Inkubation;

— mikrobielle Biomasse zu Beginn, im Verlauf und am Ende der aeroben Untersuchungen;

— pH-Wert, Sauerstoffkonzentration und Redoxpotenzial zu Beginn, im Verlauf und am Ende der anaeroben Untersuchungen und der Untersuchungen unter Reisfeldbedingungen;

— Extraktionsverfahren;

— Quantifizierungs- und Identifizierungsverfahren für die Testsubstanz und die Haupttransformationsprodukte im Boden und in den Absorptionsmitteln;

— Anzahl der Replikate und der Kontrollansätze.

Ergebnisse:

— Ergebnis der Bestimmung der mikrobiellen Aktivität;

— Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit der herangezogenen Analysenmethoden;

— Wiederfindungsraten (Werte in % für eine valide Untersuchung sind in 1.7.1 angegeben);

— tabellarische Darstellung der Ergebnisse in % der applizierten Ausgangskonzentration und ggf. in $mg \cdot kg^{-1}$ Boden (bezogen auf Trockengewicht);

— Massenbilanz während und am Ende der Untersuchungen;

— Charakterisierung nicht extrahierbarer (gebundener) Radioaktivität bzw. Rückstände im Boden;

— Quantifizierung von freigesetztem $CO_2$ und anderer flüchtiger Verbindungen;

— grafische Darstellungen von Bodenkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit für die Testsubstanz und ggf. für die Haupttransformationsprodukte;

— Halbwertszeit oder $DT_{50}$, $DT_{75}$ und $DT_{90}$ für die Testsubstanz und ggf. für die

— Haupttransformationsprodukte einschließlich Vertrauensbereichen;

▼B

— Einschätzung der abiotischen Abbaurate unter sterilen Bedingungen;

— Beurteilung der Transformationskinetik für die Testsubstanz und ggf. für die Haupttransformationsprodukte;

— Angabe von Transformationspfaden (falls möglich);

— Diskussion und Interpretation der Ergebnisse;

— Rohdaten (d. h. Chromatogramme der einzelnen Proben, Berechnungen der Transformationsraten sowie Methoden zur Identifizierung von Transformationsprodukten).

4. **LITERATURANGABEN**

(1) US-Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Europäische Union (EU) (1995). Richtlinie 95/36/EG der Kommission vom 14. Juli 1995 zur Änderung der Richtlinie 91/414/EWG über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln. Anhang II, Teil A, und Anhang III, Teil A: Verbleib und Verhalten in der Umwelt.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of Ehe product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) IS0/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Gutdance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Bodenbeschaffenheit — Laboratoriumsinkubationssysteme zur Bestimmung der Mineralisierung von organischen Chemikalien im Boden unter aeroben Bedingungen.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italien, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(14) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (angenommen am 12. Mai 1981).

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Bodenbeschaffenheit — Probenahme — Teil 6: Anleitung zur Probenahme, Behandlung und Lagerung von Boden für die Bestimmung aerober mikrobieller Prozesse unter Laborbedingungen.

(16) Anhang V zur Richtlinie 67/548/EWG

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol I, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO Systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) und Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol, Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 und 2 (1997). Bodenbeschaffenheit — Bestimmung der mikrobiellen Biomasse von Böden — Teil 1: Substratinduziertes Respirationsverfahren. Teil *2:* Fumigations-Extraktionsverfahren.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kalo, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio- transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Zeitschrift Pflanzenkrankheiten — Pflanzenschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides“. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G. Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical Interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical Interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In: Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

*Anlage 1*

**WASSERSPANNUNG, FELDKAPAZITÄT (FK) UND WASSERHALTEKAPAZITÄT (WHK)** ([1])

| Höhe der Wassersäule (cm) | pF ([a]) | bar ([b]) | Bemerkungen |
|---|---|---|---|
| $10^7$ | 7 | $10^4$ | Trockener Boden |
| $1{,}6 \cdot 10^4$ | 4,2 | 16 | Welkepunkt |
| $10^4$ | 4 | 10 | |
| $10^3$ | 3 | 1 | |
| $6 \cdot 10^2$ | 2,8 | 0,6 | |
| $3{,}3 \cdot 10^2$ | 2,5 | 0,33 ([c]) | Bereich der Feldkapazität ([d]) |
| $10^2$ | 2 | 0,1 | |
| 60 | 1,8 | 0,06 | |
| 33 | 1,5 | 0,033 | |
| 10 | 1 | 0,01 | WHK (Näherungswert) |
| 1 | 0 | 0,001 | wassergesättigter Boden |

([a]) pF = dekadischer Logarithmus der Wasserspannung (in cm Wassersäule).
([b]) 1 bar = $10^5$ Pa.
([c]) Entspricht einem angenäherten Wassergehalt von 10 % in Sand, 35 % in Lehm und 45 % in Ton.
([d]) Die Feldkapazität (FK) ist nicht konstant, sondern schwankt je nach Bodentyp zwischen pF 1,5 und 2,5.

Die *Wasserspannung (Saugspannung)* wird in cm Wassersäule oder in bar gemessen. Aufgrund des großen Saugspannungsbereichs wird sie einfach als pF-Wert angegeben, der dem Logarithmus der in cm Wassersäule angegebenen Wasserspannung entspricht.

Die *Feldkapazität (Speicherfeuchte)* wird definiert als die Wassermenge, die ein natürlicher Boden nach längeren Niederschlägen oder nach ausreichender Bewässerung zwei Tage gegen die Gravitation speichern kann. Sie wird in ungestörtem Boden in situ im Feld bestimmt. Daher ist die Messung nicht auf gestörte Laborbodenproben anwendbar. In gestörtem Boden bestimmte FK-Werte können erhebliche systematische Varianzen aufweisen.

Die *Wasserhaltekapazität (WHK)* wird im Labor für ungestörten und gestörten Boden durch Sättigung einer Bodensäule mit Wasser durch Kapillaraufstieg bestimmt Sie ist besonders für gestörte Böden nützlich und kann bis zu 30 % größer sein als die Feldkapazität (1). Sie ist im Test auch leichter zu bestimmen als verlässliche FK-Werte.

Anmerkungen

([1]) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

*Anlage 2*

**BODENFEUCHTEGEHALT (in g Wasser je 100 g Boden TG [1]) VERSCHIEDENER BODENARTEN AUS UNTERSCHIEDLICHEN LÄNDERN**

| Bodenart | Land | Bodenfeuchtegehalt bei | | |
|---|---|---|---|---|
| | | WHK [1] | pF = 1,8 | pF = 2,5 |
| Sand | Deutschland | 28,7 | 8,8 | 3,9 |
| Lehmiger Sand | Deutschland | 50,4 | 17,9 | 12,1 |
| Lehmiger Sand | Schweiz | 44,0 | 35,3 | 9,2 |
| Schluffiger Lehm | Schweiz | 72,8 | 56,6 | 28,4 |
| Toniger Lehm | Brasilien | 69,7 | 38,4 | 27,3 |
| Toniger Lehm | Japan | 74,4 | 57,8 | 31,4 |
| Sandiger Lehm | Japan | 82,4 | 59,2 | 36,0 |
| Schluffiger Lehm | USA | 47,2 | 33,2 | 18,8 |
| Sandiger Lehm | USA | 40,4 | 25,2 | 13,3 |

[1] Wasserhaltekapazität.

[1] TG: Trockengewicht.

▼B

*Anlage 3*

*Abbildung 1*

**Beispiel eines Durchflussapparats für die Untersuchung der Transformation von Chemikalien im Boden** ([1]) ([2])

1: Nadelventil

2: mit Wasser gefüllte Gaswaschflasche

3: Ultramembran (nur sterile Bedingungen), Porengröße 0,2 µm

4: Bodenstoffwechselgefäß (mit Wasserüberstand nur für anaerobe und Reisfeldbedingungen;)

5: Ethylenglykolabscheider für flüchtige organische Verbindungen

6: Schwefelsäureabscheider für flüchtige Alkalien

7, 8: Natriumhydroxidabscheider für $CO_2$ und andere flüchtige saure Verbindungen

9: Durchflussmesser

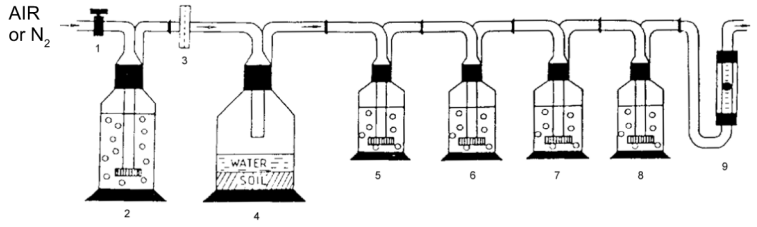
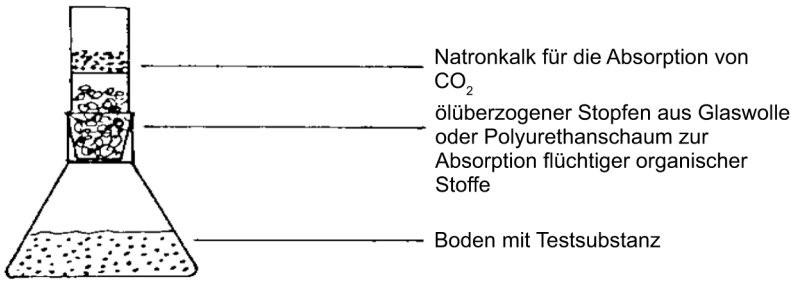



*Abbildung 2*

**Beispiel eines Biometergefäßes für die Untersuchung der Transformation von Chemikalien im Boden** ([3])




([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons, Vol I, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Zeitschrift Pflanzenkrankheiten — Pflanzenschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

## C.24. AEROBE UND ANAEROBE TRANSFORMATION IN WASSER-SEDIMENT-SYSTEMEN

### 1. METHODE

Diese Testmethode entspricht der Prüfrichtlinie OECD TG 308 (2002).

### 1.1. EINLEITUNG

Chemikalien gelangen in flache oder tiefe Oberflächengewässer auf folgenden Wegen: direkte Applikation, Sprühmittelabdrift, Ablauf, Entwässerung, Abfallentsorgung, Industrie-, Haushalts- oder Landwirtschaftsabwässer und über atmosphärische Ablagerung. Die Testmethode beschreibt eine Labormethode zur Beurteilung der aeroben und anaeroben Transformation von organischen Chemikalien in Wasser-Sediment-Systemen. Sie basiert auf bestehenden Richtlinien (1) (2) (3) (4) (5) (6). Auf einem OECD-Workshop zur Boden/Sedimentauswahl, der 1995 im italienischen Belgirate stattfand (7), wurden insbesondere die Anzahl und Arten der bei diesem Test zu verwendenden Sedimente vereinbart. Des Weiteren gab der Workshop Empfehlungen zur Entnahme, Handhabung und Lagerung von Sedimentproben basierend auf den ISO-Hinweisen (8). Derartige Untersuchungen sind bei Chemikalien erforderlich, bei denen davon auszugehen ist, dass sie unmittelbar in Wasser angewandt werden oder auf den oben aufgeführten Eintragspfaden in den aquatischen Bereich gelangen.

Die Bedingungen in natürlichen Wasser-Sediment-Systemen sind in der oberen Wasserphase häufig aerob. Die Oberflächenschicht des Sediments kann entweder aerob oder anaerob sein, während die tieferen Sedimentschichten in der Regel anaerob sind. Um sämtlichen Möglichkeiten Rechnung zu tragen, werden in diesem Dokument sowohl aerobe als auch anaerobe Tests beschrieben. Der aerobe Test simuliert eine aerobe Wassersäule über einer aeroben Sedimentschicht, die mit einem anaeroben Gradienten unterschichtet ist. Der anaerobe Test simuliert ein vollständig anaerobes Wasser-Sediment-System. Deuten die Umstände darauf hin, dass es notwendig ist, von diesen Empfehlungen deutlich abzuweichen, indem z. B. intakte Sedimentkerne oder Sedimente verwendet werden, die möglicherweise gegenüber der Testsubstanz exponiert waren, können andere, zu diesem Zweck verfügbare Methoden zur Anwendung kommen (9).

### 1.2. DEFINITIONEN

In jedem Falle ist das Internationale Einheitensystem (SI-System) anzuwenden.

**Testsubstanz:** jede Substanz, ob Ausgangsverbindung oder relevante Transformationsprodukte.

**Transformationsprodukte:** alle Substanzen, die das Ergebnis von biotischen oder abiotischen Transformationsreaktionen der Testsubstanz sind, einschließlich $CO_2$ und Reaktionsprodukte in gebundenen Rückständen.

**Gebundene Rückstände:** Verbindungen in Böden, Pflanzen oder Tieren, die nach einer Extraktion in der Matrix in Form der Ausgangssubstanz oder deren Metaboliten verbleiben. Die Extraktionsmethode darf die Verbindungen selbst oder die Matrix Struktur nicht wesentlich verändern. Die Art der Bindung kann zum Teil durch matrixverändernde Extraktionsmethoden und hochentwickelte Analysenverfahren geklärt werden. Bislang werden z. B. kovalente Ionen- und Sorptionsbindungen sowie Einschlüsse auf diese Weise nachgewiesen. In aller Regel bedeutet die Bildung von gebundenen Rückständen eine deutliche Verminderung der Bioverfügbarkeit (10) (modifiziert nach IUPAC 1984 (11)).

▼B

**Aerobe Transformation** (oxidierend): in Gegenwart von molekularem Sauerstoff ablaufende Reaktionen (12).

**Anaerobe Transformation** (reduzierend): unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff ablaufende Reaktionen (12).

**Natürliche Gewässer:** Oberflächengewässer, die aus Teichen, Flüssen, Strömen usw. stammen.

**Sediment:** ein Gemisch mineralischer und organisch-chemischer Bestandteile. Letztere enthalten Verbindungen mit hohem Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt und mit hoher Molekularmasse. Das Sediment lagert sich in natürlichen Gewässern ab und bildet eine Grenzfläche zu diesem Wasser.

**Mineralisation:** vollständiger Abbau einer organischen Verbindung zu $CO_2$ und $H_2O$ unter aeroben Bedingungen, und zu $CH_4$, $CO_2$ und $H_2O$ unter anaeroben Bedingungen. Im Zusammenhang mit dieser Testmethode, bei der eine radioaktiv markierte Verbindung verwendet wird, bedeutet Mineralisation einen extensiven Abbau eines Moleküls, wobei ein markiertes Kohlenstoffatom unter Freisetzung der entsprechenden Menge $^{14}CO_2$ bzw. $^{14}CH_4$ quantitativ oxidiert oder reduziert wird.

**Halbwertszeit $t_{0,5}$**: die für die 50 %ige Transformation einer Testsubstanz ermittelte Zeit, wenn die Transformation mittels Kinetik erster Ordnung beschrieben werden kann; sie ist unabhängig von der Ausgangskonzentration.

**Abbauzeit $DT_{50}$**: Zeitspanne, in der sich die Ausgangskonzentration der Testsubstanz um 50 % reduziert hat.

**Abbauzeit $DT_{75}$**: Zeitspanne, in der sich die Ausgangskonzentration der Testsubstanz um 75 % reduziert hat.

**Abbauzeit $DT_{90}$**: Zeitspanne, in der sich die Ausgangskonzentration der Testsubstanz um 90 % reduziert hat.

1.3. REFERENZSUBSTANZEN

Referenzsubstanzen sollten zur Identifizierung und Quantifizierung von Transformationsprodukten mittels spektroskopischer und chromatografischer Verfahren verwendet werden.

1.4. INFORMATIONEN ZUR TESTSUBSTANZ

Zur Messung der Transformationsrate kann eine nicht markierte oder markierte Testsubstanz verwendet werden, jedoch werden markierte Substanzen bevorzugt. Markierte Substanzen sind notwendig zur Untersuchung des Transformationsweges und zur Aufstellung einer Massenbilanz. Empfohlen wird die $^{14}C$-Markierung, doch auch der Einsatz anderer Isotope wie $^{13}C$, $^{15}N$, $^{3}H$ oder $^{32}P$ kann sinnvoll sein. Die Markierung sollte möglichst im stabilsten Teil/in den stabilsten Teilen des Moleküls positioniert sein ([1]). Die chemische und/oder radiochemische Reinheit der Testsubstanz sollte mindestens 95 % betragen.

Vor der Durchführung eines Tests sollten folgende Informationen zur Testsubstanz vorliegen:

a) Wasserlöslichkeit (Methode A.6);

b) Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln;

c) Dampfdruck (Methode A.4) und Henry-Konstante;

([1]) Wenn beispielsweise die Testsubstanz einen Ring enthält, muss sich die Markierung auf diesem Ring befinden; enthält die Testsubstanz zwei oder mehr Ringe, können gesonderte Untersuchungen erforderlich sein, um den Verbleib jedes markierten Rings zu erfassen und sachgerechte Informationen zur Bildung von Transformationsprodukten zu gewinnen.

▼B

d) n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (Methode A.8);

e) Adsorptionskoeffizient ($K_d$, $K_F$ oder $K_{oc}$) (Methode C.18);

f) Hydrolyse (Methode C.7);

g) Dissoziationskonstante ($pK_a$) (OECD Guideline 112) (13);

h) chemische Struktur der Testsubstanz und Ort der Isotopenmarkierung(en), falls zutreffend.

*Hinweis:* Die Temperatur, bei der diese Messungen vorgenommen werden, sollte angegeben werden.

Sinnvoll können u. a. auch folgende Angaben sein: Toxizität der Testsubstanz gegenüber Mikroorganismen, Daten zur leichten und/oder potenziellen biologischen Abbaubarkeil sowie Daten zur aeroben und anaeroben Transformation im Boden.

Analysenmethoden (einschließlich Extraktions- und Reinigungsverfahren) zur Identifizierung und Quantifizierung der Testsubstanz und ihrer Transformationsprodukte in Wasser und Sediment sollten verfügbar sein (siehe 1.7.2).

1.5. PRINZIP DER TESTMETHODE

Bei der hier beschriebenen Methode werden ein aerobes und ein anaerobes Wassersediment verwendet (siehe Anlage 1), das folgende Untersuchungen erlaubt:

i) Messung der Transformationsrate der Testsubstanz in einem Wasser-Sediment-System,

ii) Messung der Transformationsrate der Testsubstanz im Sediment,

iii) Messung der Mineralisationsrate der Testsubstanz und/oder ihrer Transformationsprodukte (bei Verwendung einer $^{14}C$-markierten Testsubstanz),

iv) Identifizierung und Quantifizierung von Transformationsprodukten in Wasser- und Sedimentphasen einschließlich einer Massenbilanz (bei Verwendung einer markierten Testsubstanz),

v) Messung der Verteilung der Testsubstanz und ihrer Transformationsprodukte auf die beiden Phasen während einer Inkubation im Dunkeln (um z. B. Algenblüten zu vermeiden) bei konstanter Temperatur. Halbwertszeiten, $DT_{50}$-, $DT_{75}$- und $DT_{90}$-Werte werden bestimmt, wenn es die entsprechenden Daten hergeben, sollten jedoch nicht weit über den Versuchszeitraum hinaus extrapoliert werden (siehe 1.2).

Sowohl für die aerobe als auch für die anaerobe Untersuchung sind jeweils mindestens zwei Sedimente sowie die dazugehörigen Wasserphasen erforderlich (7). In bestimmten Fällen sollten jedoch mehr als zwei Sedimente verwendet werden, z. B. bei Chemikalien, die in Binnengewässern und/oder in Meeresgewässern vorkommen können.

▼B

1.6. ANWENDBARKEIT DES TESTS

Die Methode ist allgemein anwendbar auf chemische Substanzen (nicht markiert oder markiert), für die ein Analysenverfahren mit hinreichender Genauigkeit und Empfindlichkeit zur Verfügung steht. Es ist anwendbar auf schwach flüchtige, nichtflüchtige, wasserlösliche oder schlecht wasserlösliche Verbindungen. Der Test sollte nicht angewendet werden bei Chemikalien, die aus Wasser stark flüchtig sind (z. B. Begasungsmittel oder organische Lösungsmittel) und somit unter den Versuchsbedingungen dieses Tests nicht im Wasser und/oder Sediment gehalten werden können.

Bisher wird diese Methode zur Untersuchung der Transformation von Chemikalien in Binnengewässern und Sedimenten genutzt, aber im Prinzip ist sie auch für Ästuar-/Meeressysteme anwendbar. Sie ist nicht geeignet zur Simulation von Bedingungen in strömendem Wasser (z. B. Flüssen) oder auf hoher See.

1.7. QUALITÄTSKRITERIEN

1.7.1. **Wiederfindungsraten**

Die Extraktion und Analyse von mindestens jeweils zwei parallel angesetzten Wasser- und Sedimentproben unmittelbar nach Zugabe der Testsubstanz geben einen ersten Hinweis auf die Wiederholbarkeit der Analysenmethode und die gleichmäßige Verteilung der Testsubstanz bei der Applikation. Die Wiederfindungsraten für spätere Versuchsphasen ergeben sich aus den jeweiligen Massenbilanzen (bei Verwendung markierter Substanzen). Die Wiederfindungsraten sollten im Bereich von 90-110 % für markierte Chemikalien (6) und von 70-110 % für nicht markierte Chemikalien liegen.

1.7.2. **Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit der Analysenmethode**

Die Wiederholbarkeit der Analysenmethode (ausgenommen die Effizienz der Extraktion im Anfangsstadium) zur Quantifizierung der Testsubstanz und der Transformationsprodukte kann durch eine parallele Analyse desselben Extrakts der Wasser- bzw. der Sedimentproben, die hinreichend lange zur Bildung von Transformationsprodukten inkubiert wurden, überprüft werden.

Die Nachweisgrenze („limit of detection — LOD“) der Analysenmethode für die Testsubstanz und für die Transformationsprodukte sollte mindestens 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ in Wasser oder Sediment (als Testsubstanz) oder — falls dieser Wert niedriger ist — 1 % der in ein Testsystem applizierten. Ausgangsmenge betragen. Die Quantifizierungsgrenze („limit of quantification — LOQ“) sollte ebenfalls spezifiziert werden.

1.7.3. **Genauigkeit der Transformationsdaten**

Geeignete Informationen über die Zuverlässigkeit der Transformationskurve lassen sich mittels einer Regressionsanalyse aus den Testsubstanzkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit gewinnen, die auch die Berechnung des Vertrauensbereiche für Halbwertszeiten (im Falle einer Kinetik pseudo-erster Ordnung) bzw. $DT_{50}$-Werte und ggf. für $DT_{75}$ und $DT_{90}$-Werte ermöglicht.

1.8. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.8.1. **Testsystem und Geräte**

Die Untersuchung sollte in Glasgefäßen (z. B. Flaschen oder Zentrifugengläsern) durchgeführt werden, sofern nicht bereits vorliegende Informationen (wie der n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient, Sorptionsdaten usw.) darauf hindeuten, dass die Testsubstanz möglicherweise an Glas anhaftet. In diesem Fall kann es erforderlich sein, andere Materialien (wie Teflon) in Betracht zu ziehen. Wenn bekannt ist, dass die Testsubstanz an Glas anhaftet, könnte eine Lösung darin bestehen, eine oder mehrere der folgenden Methoden anzuwenden:

▼B

— Bestimmung der Masse der am Glas sorbierten Testsubstanz und Transformationsprodukte,

— obligatorische Spülung aller Glasgegenstände mit einem Lösungsmittel zu Testende,

— Verwendung formulierter Handelsprodukte (siehe auch 1.9.2),

— Verwendung einer größeren Menge eines Hilfslösungsmittels für die Zugabe der Testsubstanz in das System; das eingesetzte Hilfslösungsmittel sollte die Testsubstanz nicht durch Solvolyse aufspalten,

Beispiele für typische Testgeräte, d. h. Durchfluss- und Biometersysteme, sind in Anlage 2 bzw. 3 dargestellt (14). Weitere geeignete Inkubationssysteme sind in der Literaturangabe (15) beschrieben. Die Anordnung der Versuchsgeräte sollte den Austausch von Luft oder Stickstoff und das Auffangen flüchtiger Produkte ermöglichen. Die Geräte müssen so bemessen sein, dass sie den Anforderungen des Tests entsprechen (siehe 1.9.1), Die Belüftung kann entweder durch schonendes Durchperlen oder durch das Leiten von Luft oder Stickstoff über die Wasseroberfläche erfolgen. In letzterem Fall kann ein vorsichtiges Umrühren des Wassers von oben angeraten sein, um eine bessere Verteilung des Sauerstoffs bzw. Stickstoffs im Wasser zu erreichen. $CO_2$-freie Luft sollte nicht verwendet werden, da dies zu einem Anstieg des pH-Werts des Wassers führen kann. In jedem Falle ist eine Störung des Sediments nicht wünschenswert und sollte weitestgehend vermieden werden. Schwach flüchtige Chemikalien sollten in einem Biometersystem unter vorsichtigem Rühren der Wasseroberfläche getestet werden. Ebenfalls können geschlossene Gefäße mit einer Gasphase aus atmosphärischer Luft oder Stickstoff sowie mit innen befindlichen Röhrchen zum Auffangen flüchtiger Produkte verwendet werden (16). Beim aeroben Test ist ein regelmäßiger Austausch der Gasphase im oberen Teil des Gefäßes erforderlich, um den Sauerstoffverbrauch durch die Biomasse auszugleichen.

Geeignete Abscheider für das Sammeln flüchtiger Transformationsprodukte sind u. a. Kaliumhydroxid- oder Natriumhydroxidlösungen (1 mol· $dm^{-3}$) für Kohlendioxid ([1]) und Ethylenglykol, Ethanolamin oder 2 %iges Paraffin in Xylol für organische Verbindungen. Flüchtige Verbindungen wie Methan, die unter anaeroben Bedingungen entstehen, können z. B. mittels Molekularsieben aufgefangen werden. Solche flüchtigen Verbindungen können z. B. zu $CO_2$ verbrannt werden, indem das Gas bei einer Temperatur von 900 °C durch eine CuO enthaltende Quarzröhre geführt und das gebildete $CO_2$ in einem Abscheider mit Alkali aufgefangen wird (17).

Erforderlich ist eine Laborausstattung für die chemische Analyse der Testsubstanz und von Transformationsprodukten (z. B. Gas-Flüssigchromatografie (GLC), Hochleistungsflüssigchromatografie (HPLC), Dünnschichtchromatografie (TLC), Massenspektroskopie (MS), Gaschromatografie-Massenspektroskopie (GC-MS), Flüssigchromatografie-Massenspektrometrie (LC-MS), kernmagnetische Resonanz (NMR) u. a.), sowie ggf. Detektionssysteme für radioaktiv markierte oder nicht markierte Chemikalien. Bei Verwendung radioaktiv markierter Substanzen werden darüber hinaus ein Flüssigkeitsszintillationszähler und ein Oxidationsmittel (für die Verbrennung von Sedimentproben vor der Analyse auf Radioaktivität) benötigt.

Weitere Standardlaborgeräte für physikalisch-chemische und biologische Bestimmungen (siehe Tabelle 1 in Abschnitt 1.8.2.2), Glasgegenstände, Chemikalien und Reagenzien sind je nach Bedarf erforderlich;

([1]) Da diese basischen Absorptionslösungen auch das Kohlendioxid aus der Belüftungsluft und das bei den aeroben Versuchen durch die Atmung gebildete Kohlendioxid absorbieren können, müssen sie in regelmäßigen Zeitabständen ausgewechselt werden, um ihre Sättigung und damit einen Verlust ihres Absorptionsvermögens zu verhindern.

▼B

1.8.2. **Auswahl und Anzahl von Wassersedimenten**

Die Probenahmestellen sollten entsprechend dem Zweck des Tests je nach gegebener Situation gewählt werden. Bei der Auswahl der Probenahmestellen ist die Vorgeschichte möglicher landwirtschaftlicher, industrieller oder häuslicher Einträge in das Einzugsgebiet und die Oberläufe zu berücksichtigen. Es sollten nur Sedimente verwendet werden, die in den 4 vorhergehenden Jahren nicht mit der Testsubstanz oder ihren Struktur-Analoga verunreinigt worden sind.

1.8.2.1. *Sedimentauswahl*

Für die aeroben Tests werden üblicherweise zwei Sedimente verwendet (7). Die beiden ausgewählten Sedimente sollten sich hinsichtlich ihres organischen Kohlenstoffgehalts und ihrer Textur voneinander unterscheiden. Ein Sediment sollte einen hohen organischen Kohlenstoffgehalt (2,5-7,5 %) aufweisen und feinkörnig sein, das andere Sediment sollte einen niedrigen organischen Kohlenstoffgehalt (0,5-2,5 %) haben und grobkörnig sein. Der Unterschied zwischen den organischen Kohlenstoffgehalten sollte im Regelfall mindestens 2 % betragen. „Feinkörnigkeit“ wird definiert als ein [Ton und Schluff] ([1]) -Gehalt von > 50 %, und „Grobkörnigkeit“ wird definiert als ein [Ton und Schluff]-Gehalt von < 50 %, Die Differenz zwischen den [Ton und Schluff]-Gehalten beider Sedimente sollte in aller Regel mindestens 20 % betragen. In Fällen, in denen eine Chemikalie auch in Meerwasser gelangen kann, sollte mindestens eines der Wasser-Sediment-Systeme marinen Ursprungs sein.

Für die strikt anaerobe Untersuchung sollten Proben von zwei Sedimenten (einschließlich des jeweils dazugehörigen Wassers) aus den anaeroben Bereichen der Oberflächenwasserkörper genommen werden (7). Handhabung und Transport von Sediment- und Wasserphasen sollten vorsichtig unter Ausschluss von Sauerstoff erfolgen.

Für die Auswahl von Sedimenten können noch andere Parameter von Bedeutung sein und sollten je nach Ausgangslage berücksichtigt werden. So wäre z. B. der pH-Bereich von Sedimenten wichtig für die Untersuchung von Chemikalien, bei denen die Transformation und/oder Sorption pH-abhängig sein könnte. Die pH-Abhängigkeit der Sorption kann im $pK_a$-Wert der Testsubstanz zum Ausdruck kommen.

1.8.2.2. *Charakterisierung von Wasser-Sediment-Proben*

In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Parameter, die für Wasser und Sediment zu messen und zu protokollieren sind (unter Verweis auf die verwendete Methode), sowie die Testphase, in der diese Parameter zu bestimmen sind, aufgeführt. Informationen über die Methoden zur Bestimmung dieser Parameter sind in der Literatur (18) (19) (20) (21) zu finden.

Unter Umständen sind je nach Ausgangslage noch weitere Parameter zu messen und zu protokollieren (z. B. für Süßwasser: Partikel, Alkalinität, Harte, Leitfähigkeit, $NO_3/PO_4$ (Verhältnis und Einzelwerte); für Sedimente: Kationenaustauschkapazität, Wasserhaltekapazität, Carbonat, Gesamtstickstoff und -phosphor; und für Meeressysteme: Salzgehalt). Zur Messung der Redoxbedingungen, insbesondere im Hinblick auf die anaerobe Transformation, kann auch eine Analyse von Sedimenten und Wasser auf Nitrat, Sulfat, bioverfügbares Eisen und evtl. andere Elektronenakzeptoren sinnvoll sein.

([1]) [Ton und Schluff] ist die mineralische Fraktion des Sediments mit einer Partikelgröße von < 50 μm.

▼B

**Messung von Parametern zur Charakterisierung von Wasser-Sediment-Proben (7) (22) (23)**

| Parameter | Phase des Testverfahrens | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Feld probenahme | Handhabung | Beginn der Akklimatisierung | Testbeginn | Laufender Test | Testende |
| **Wasser** | | | | | | |
| Herkunft/Quelle | × | | | | | |
| Temperatur | × | | | | | |
| pH-Wert | × | | × | × | × | × |
| TOC | | | × | × | | × |
| $O_2$-Konzentration (*) | × | | × | × | × | × |
| Redoxpotenzial (*) | | | × | × | × | × |
| **Sediment** | | | | | | |
| Herkunft/Quelle | × | | | | | |
| Tiefe der Schicht | × | | | | | |
| pH-Wert | | × | × | × | × | × |
| Korngrößenverteilung | | × | | | | |
| TOC | | × | × | × | | × |
| Mikrobielle Biomasse (*) | | × | | × | | × |
| Redoxpotenzial (**) | Beobachtung (Farbe/ Geruch) | | × | × | × | × |

(*) Aktuelle Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass Messungen der Sauerstoffkonzentrationen im Wasser und der Redoxpotenziale für das Wachstum und die Entwicklung von mikrobiellen Populationen in Oberflächengewässern weder einen mechanistischen noch einen prognostischen Wert besitzen (24) (25). Zur Interpretation und Beurteilung der aeroben biologischen Transformationsraten und -pfade besser geeignete Hilfsmittel sind möglicherweise die Bestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB) (bei der Feldprobenahme sowie zu Testbeginn und –ende) und die Konzentrationsbestimmung der Mikro-/Makronährstoffe $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$ und $Mn^{2+}$ (zu Testbeginn und -ende) in Wasser sowie die Messung des Gesamt-N und Gesamt-P in Sedimenten (bei der Feldprobenahme und zu Testende).

(**) Die Methode der mikrobiellen Respirationsrate (26), die Fumigationsmethode (27) oder die Bestimmung der Lebendkeimzahl (z. B. Bakterien, Aktinomyceten, Pilze und Gesamtzahl der Kolonien) für aerobe Untersuchungen; Methanogeneserate bei anaeroben Untersuchungen.

1.8.3. **Probenahme, Handhabung und Lagerung**

1.8.3.1. *Probenahme*

Für die Entnahme von Sedimentproben sollte der Entwurf der ISO-Hinweise zur Probenahme von Sedimenten (8) herangezogen werden. Sedimentproben sollten von der gesamten oberen, 5 bis 10 cm starken Sedimentschicht genommen werden. Am selben Standort und zum selben Zeitpunkt sollte das dazugehörige Wasser entnommen werden. Für die anaerobe Studie sollte die Probenahme und der Transport des Sediments und des dazugehörigen Wassers unter Ausschluss von Sauerstoff erfolgen (28) (siehe 1.8.2.1). Einige Probenahmegeräte sind in der Literatur beschrieben (8) (23).

▼B

1.8.3.2. *Handhabung*

Das Sediment wird durch Filtration vom Wasser getrennt und dann mit überschüssigem Standortwasser, das anschließend verworfen wird, durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 2 mm feucht gesiebt. Dann werden bekannte Mengen Sediment und Wasser im gewünschten Verhältnis (siehe 1.9.1) in Inkubationsgefäßen vermischt und für die Akklimatisierung vorbereitet (siehe 1.8.4). Bei der anaeroben Studie sind alle Schritte unter Ausschluss von Sauerstoff durchzuführen (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Lagerung*

In jedem Falle wird die Verwendung frischer Sediment- und Wasserproben empfohlen; ist jedoch eine Lagerung erforderlich, sollten Sediment und Wasser wie zuvor beschrieben gesiebt und zusammen gelagert werden, und zwar mit einem Wasserüberstand (6 10 cm Wassersäule), im Dunkeln, bei 4 ± 2 °C[4] und für einen Zeitraum von höchstens vier Wochen (7) (8) (23). Für aerobe Untersuchungen vorgesehene Proben sollten bei freiem Luftzutritt gelagert werden (z. B. in offenen Behältern), die für anaerobe Untersuchungen vorgesehenen Proben hingegen unter Ausschluss von Sauerstoff. Während des Transports and der Lagerung dürfen Sediment und Wasser nicht gefrieren und das Sediment darf nicht austrocknen.

1.8.4. **Vorbereitung der Sediment-/Wasserproben für den Test**

Der Testsubstanzzugabe sollte eine Akklimatisierungsperiode vorangehen, während der sich jede Sediment-/Wasserprobe in dem im Haupttest zu verwendenden Inkubationsgefäß befindet. Die Bedingungen der Akklimatisierungsperiode müssen exakt denen der Inkubation beim Haupttest entsprechen (siehe 1.9.1). Die Akklimatisierungsperiode ist die Zeit, die benötigt wird, um eine hinreichende Stabilität des Systems zu erreichen, die sich am pH-Wert, an der Sauerstoffkonzentration im Wasser, am Redoxpotenzial des Sediments und Wassers sowie an der makroskopischen Phasentrennung ablesen lässt. Die Akklimatisierungsperiode beträgt in aller Regel ein bis zwei Wochen und sollte vier Wochen nicht überschreiten. Die Ergebnisse der während dieser Zeit durchgeführten Bestimmungen sind zu protokollieren.

1.9. DURCHFÜHRUNG DES TESTS

1.9.1. **Testbedingungen**

Der Test sollte im Inkubationsgefäß (siehe 1.8.1) mit einem Wasser-Sediment-Volumenverhältnis zwischen 3:1 und 4:1 und einer Sedimentschicht von 2,5 cm (± 0,5 cm) durchgeführt werden ([1]). Eine Mindestmenge von 50 g Sediment (Trockengewicht) pro Inkubationsgefäß wird empfohlen.

Der Test sollte im Dunkeln bei einer konstanten Temperatur im Bereich von 10 bis 30 °C durchgeführt werden. Angemessen ist eine Temperatur von (20 ± 2) °C. Falls notwendig, kann zusätzlich eine niedrigere Temperatur (im Allgemeinen 10 °C) gewählt werden, als Einzelfallentscheidung in Abhängigkeit von den zu ermittelnden Testergebnissen. Die Inkubationstemperatur sollte überwacht und protokolliert werden.

([1]) Aktuelle Studien haben gezeigt, dass eine Lagerung bei 4 °C zu einer Verminderung des organischen Kohlenstoffgehalts des Sediments führen kann, was unter Umständen einen Rückgang der mikrobiellen Aktivität zur Folge hat (34).

▼B

1.9.2. **Behandlung und Applikation der Testsubstanz**

Es wird eine Testkonzentration der Chemikalie verwendet ([1]). Für Pflanzenschutzmittel, die direkt auf den Wasserkörper appliziert werden, sollte die auf dem Etikett angegebene Höchstdosierung als maximale Applikationsrate, die bezogen auf die Wasseroberfläche des Testgefäßes errechnet wird, eingesetzt werden. In allen anderen Fällen sollte die einzusetzende Konzentration auf Berechnungen aus Umweltemissionen basieren. Es ist darauf zu achten, dass eine ausreichende Testsubstanzkonzentration appliziert wird, um den Transformationspfad und die Bildung und den Rückgang der Transformationsprodukte erfassen zu können. Es kann erforderlich sein, höhere Dosen zu applizieren (z. B. das 10-fache), wenn z. B. die Testsubstanzkonzentration zu Testbeginn dicht an der Nachweisgrenze liegt und/oder wenn die Haupttransformationsprodukte nicht ohne weiteres nachgewiesen werden können, obwohl ihr Anteil 10 % der Applikationsrate der Testsubstanz ausmacht. Werden höhere Testkonzentrationen verwendet, sollten diese allerdings keine erhebliche Beeinträchtigung der mikrobiellen Aktivität des Wasser-Sediment-Systems bewirken. Um eine konstante Testsubstanzkonzentration in verschieden großen Gefäßen zu erreichen, kann eine Anpassung der applizierten Substanzmenge als sinnvoll angesehen werden, basierend auf der Höhe der Wassersäule im Gefäß im Verhältnis zur Höhe der Wassersäule am Probenahmestandort (die mit 100 cm angenommen wird, doch auch andere Höhen sind möglich). Siehe die Beispielrechnung in Anlage 4.

Idealerweise sollte die Testsubstanz als wässrige Lösung in die Wasserphase des Testsystems gegeben werden. Falls es sich nicht vermeiden lässt, ist der Einsatz geringer Mengen von mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln (wie Aceton oder Ethanol) für die Applikation und Verteilung der Testsubstanz zulässig, sollte jedoch 1 % v/v nicht überschreiten und die mikrobielle Aktivität des Testsystems nicht beeinträchtigen. Die Herstellung der wässrigen Lösung der Testsubstanz ist mit Sorgfalt vorzunehmen — zur Sicherstellung einer vollständigen Homogenität können die Verwendung von Generatorsäulen und das Mischen vor Testbeginn sinnvoll sein. Nach Zugabe der wässrigen Lösung in das Testsystem wird ein vorsichtiges Mischen der Wasserphase empfohlen, wobei das Sediment so wenig wie möglich gestört werden sollte.

Die Verwendung von formulierten Handelsprodukten wird routinemäßig nicht empfohlen, da die Formulierungsbestandteile die Verteilung der Testsubstanz und/oder der Transformationsprodukte zwischen der Wasser- und der Sedimentphase beeinflussen können. Bei schlecht wasserlöslichen Testsubstanzen kann der Einsatz von formulierten Handelsprodukten jedoch eine geeignete Alternative darstellen.

Die Anzahl der Inkubationsgefäße richtet sich nach der Anzahl der Probenahmezeitpunkte (siehe 1.9.3). Es sollte eine ausreichende Anzahl von Testansätzen vorgesehen werden, so dass zwei Ansätze zu jedem Probenahmezeitpunkt ausgewertet werden können. Werden Kontrollansätze für die verschiedenen Wasser-Sediment-Systeme eingesetzt, sollten sie nicht mit der Testsubstanz behandelt werden. Die Kontrollansätze können zur Bestimmung der mikrobiellen Biomasse des Sediments und der Gesamtmenge an organisch gebundenem Kohlenstoff des Wassers und Sedimentes zu Testende herangezogen werden. Zwei der Kontrollansätze (d. h. ein Kontrollansatz pro Wassersedimentansatz) können zur Überwachung der erforderlichen Parameter im Sediment und im Wasser während der Akklimatisierungsphase genutzt werden (siehe Tabelle in Abschnitt 1.8.2.2). Es sind zwei zusätzliche Kontrollansätze für den Fall vorzusehen, dass die Testsubstanz mittels eines Lösungsmittels appliziert wird, um Beeinträchtigungen der mikrobiellen Aktivität des Testsystems zu erfassen.

([1]) Ein Test mit einer zweiten Konzentrationsstufe kann bei Chemikalien von Nutzen sein, die auf verschiedenen Eintragspfaden in Oberflächengewässer gelangen und somit signifikant unterschiedliche Konzentrationen aufweisen, sofern die niedrigere Konzentration mit hinreichender Genauigkeit analytisch bestimmt werden kann.

▼B

1.9.3. **Testdauer und Probenahme**

Der Versuch sollte im Normalfall nicht länger als 100 Tage dauern (6), sollte jedoch so lange fortgesetzt werden, bis der Abbauweg und das Wasser-/Sedimentverteilungsmuster ermittelt sind bzw. der Verlust der Testsubstanz durch Transformation und/oder Verflüchtigung 90 % erreicht hat. Die Anzahl der Probenahmezeitpunkte sollte mindestens sechs (einschließlich des Nullzeitpunkts) betragen, wobei fakultativ eine Voruntersuchung (siehe 1.9.4) durchgeführt werden kann, um ein geeignetes Probenahmeschema und die optimale Testdauer zu ermitteln, sofern nicht genügend Daten zur Testsubstanz aus früheren Untersuchungen vorliegen. Bei hydrophoben Testsubstanzen können zusätzliche Probenahmen während der Anfangsphase der Untersuchung erforderlich sein, um die Verteilungsrate zwischen der Wasser-/Sedimentphase zu bestimmen.

Zu entsprechenden Probenahmezeitpunkten werden komplette Inkubationsgefäße (im Replikat) zur Analyse entnommen. Das Sediment und das darüber liegende Wasser werden getrennt analysiert ([1]). Das Oberflächenwasser sollte vorsichtig entnommen werden, um das Sediment so wenig wie möglich zu stören. Die Extraktion und Charakterisierung der Testsubstanz und der Transformationsprodukte sollte nach geeigneten Analysenverfahren erfolgen. Substanzen, die sich unter Umständen am Inkubationsgefäß oder an den Verbindungsleitungen, die zum Auffangen flüchtiger Verbindungen dienen, angelagert haben, sollten vorsichtig abgelöst und gesammelt werden.

1.9.4. **Fakultative Voruntersuchung**

Können Dauer und Probenahmeschema nicht auf der Grundlage anderer relevanter Untersuchungen zur Testsubstanz abgeschätzt werden, kann fakultativ eine Voruntersuchung als sinnvoll angesehen werden, die unter den gleichen Testbedingungen durchzuführen ist, wie sie für den endgültigen Hauptversuch geplant sind. Die relevanten Versuchsbedingungen und Ergebnisse aus der Voruntersuchung, falls sie durchgeführt wurde, sollten in Kurzform protokolliert werden.

1.9.5. **Messungen und Analyse**

Die Konzentration der Testsubstanz und der Transformationsprodukte ist zu jedem Probenahmezeitpunkt im Wasser und im Sediment zu messen und zu protokollieren (als Konzentrationsangabe und als prozentualer Anteil der Applikationsmenge). Allgemein sollten Transformationsprodukte, die $\geq$ 10 % der applizierten Radioaktivität im gesamten Wasser-Sediment-System zu irgendeinem Probenahmezeitpunkt aufweisen, identifiziert werden, sofern nicht hinreichende Gründe dagegen sprechen. Ebenfalls für eine Identifizierung in Betracht gezogen werden sollten Transformationsprodukte, deren Konzentrationen während des Tests kontinuierlich steigen, da dies ein Hinweis auf Persistenz ist, auch wenn ihre Konzentrationen die oben genannten Grenzen nicht überschreiten. Dieses Vorgehen sollte im Einzelfall erwogen und im Abschlussbericht begründet werden.

Zu jedem Probenahmezeitpunkt sollten die Ergebnisse aus den Abscheidesystemen für Gase/flüchtige Verbindungen ($CO_2$ und andere, d. h. flüchtige organische Verbindungen) protokolliert werden. Die Mineralisationsraten sind zu protokollieren. Nicht extrahierbare (gebundene) Rückstände im Sediment sind zu jedem Probenahmezeitpunkt zu protokollieren.

([1]) Falls es ohne weiteres zu einer schnellen Reoxidation anaerober Transformationsprodukte kommen kann, sollten während der Probenahme und Analyse anaerobe Bedingungen sichergestellt werden.

▼B

2. **DATEN**

2.1. AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Gesamtmassenbilanz bzw. die Wiederfindungsrate (siehe 1.7.1) der zugegebenen Radioaktivität ist zu jedem Probenahmezeitpunkt zu berechnen. Die Ergebnisse sind als Anteile (in %) der applizierten Radioaktivität zu protokollieren. Die Verteilung der Radioaktivität im Wasser und Sediment sollte als Konzentration und prozentualer Anteil zu jedem Probenahmezeitpunkt protokolliert werden.

Die Halbwertszeit, $DT_{50}$- und ggf. $DT_{75}$- und $DT_{90}$-Werte der Testsubstanz sollten zusammen mit ihren Vertrauensbereichen berechnet werden (siehe 1.7.3). Informationen zur Verlustrate der Testsubstanzkonzentration im Wasser und im Sediment lassen sich mittels geeigneter Berechnungsprogramme gewinnen. Dazu können gehören: die Anwendung einer Kinetik nach pseudo-erster Ordnung, empirische Kurvenanpassungsverfahren unter Anwendung grafischer oder numerischer Lösungen sowie komplexere Berechnungen z. B. unter Anwendung von Einzel- oder Mehrkompartimentmodellen. Weitere Einzelheiten sind in der relevanten Literatur zu finden (35) (36) (37).

Alle Ansätze haben Stärken und Schwächen und weisen hinsichtlich ihrer Komplexität erhebliche Unterschiede auf. Die Annahme einer Kinetik erster Ordnung kann eine zu starke Vereinfachung der Abbau- und Verteilungsprozesse bedeuten, ergibt jedoch — falls möglich — einen Wert (die Geschwindigkeitskonstante oder Halbwertszeit), der leicht zu verstehen und für Simulationsmodellierungen und Berechnungen von Umweltkonzentrationen relevant ist. Empirische Ansätze oder lineare Transformationen können bessere Anpassungen von Kurven an Daten und damit eine optimalere Abschätzung von Halbwertszeiten, $DT_{50}$- und ggf. $DT_{75}$- und $DT_{90}$-Werten ermöglichen. Allerdings ist der Nutzen dieser abgeleiteten Konstanten begrenzt. Mit Kompartimentmodellen lassen sich eine Reihe nützlicher Konstanten berechnen, die wichtig für die Risikoabschätzung sind und die die Abbaugeschwindigkeit in den verschiedenen Kompartimenten sowie die Verteilung der Chemikalie beschreiben. Sie sollten ferner zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung und den Abbau von Haupttransformationsprodukten herangezogen werden. In allen Fällen muss die Auswahl der Methode begründet werden, und der Versuchsleiter sollte die Güte der Anpassung grafisch und/oder statistisch nachweisen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. TESTBERICHT

Der Testbericht muss folgende Angaben enthalten:

Testsubstanz:

— Common Name (Handelsname von Pflanzenschutzmitteln), systematischer chemischer Name, CAS-Nummer, Strukturformel (bei Verwendung radioaktiv markierter Chemikalien mit Angabe des Markierungsorts) und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Reinheit (Verunreinigungen) der Testsubstanz;

— radiochemische Reinheit der markierten Chemikalie und molare Aktivität (falls zutreffend).

▼B

Referenzsubstanzen:

— Systematischer chemischer Name und Struktur von Referenzsubstanzen, die zur Charakterisierung und/oder zur Identifizierung von Transformationsprodukten verwendet werden.

Testsedimente und -wasser:

— Ort und Beschreibung der Probenahmestelle(n) für das Wassersediment, einschließlich etwaiger früherer Kontaminationen;

— alle Informationen zur Probenahme, (ggf.) Lagerung und Akklimatisierung von Wasser-Sediment-Systemen;

— Eigenschaften der Wasser-Sediment-Proben gemäß der Tabelle in Abschnitt 1.8.2.2.

Testbedingungen:

— Verwendetes Testsystem (z. B. Durchflusssystem, Biometersystem, Art der Belüftung, Rührmethode, Wasservolumen, Sedimentmasse, Höhe der Wasser- und der Sedimentschicht, Abmessungen der Testgefäße usw.);

— Applikation der Testsubstanz in das Testsystem: verwendete Testkonzentration, Anzahl der Replikat- und Kontrollproben, Art der Applikation der Testsubstanz (z. B. Verwendung eines Lösungsmittels, falls zutreffend) usw.;

— Inkubationstemperatur;

— Probenahmezeitpunkte;

— Extraktionsmethoden und -effizienz sowie Analysenmethoden und Nachweisgrenzen;

— Verfahren für die Charakterisierung/Identifizierung von Transformationsprodukten;

— Abweichungen vor der Testvorschrift oder den Testbedingungen während der Untersuchung.

Ergebnisse:

— Rohdaten-Zahlenwerte repräsentativer Analysen (sämtliche Rohdaten sind im GLP-Archiv zu speichern);

— Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit der herangezogenen Analysenverfahren;

— Wiederfindungsraten (prozentuale Werte für eine valide Studie sind in 1.7.1 angegeben);

— tabellarische Darstellung der Ergebnisse, ausgedrückt in % der applizierten Menge und in $mg \cdot kg^{-1}$ im Wasser, im Sediment und im Gesamtsystem (nur in %) für die Testsubstanz und ggf. für Transformationsprodukte und nicht extrahierbare Radioaktivität;

— Massenbilanz während und am Ende der Untersuchungen;

— grafische Darstellung der Transformation in den Wasser- und Sedimentfraktionen sowie im Gesamtsystem (einschließlich Mineralisation);

— Mineralisationsraten;

▼B

— Halbwertszeit, $DT_{50}$- sowie ggf. $DT_{75}$- und $DT_{90}$-Werte für die Testsubstanz und ggf. Haupttransformationsprodukte einschließlich der Vertrauensbereiche im Wasser, Sediment und im Gesamtsystem;

— Beurteilung der Transformationskinetik der Testsubstanz und ggf. der Haupttransformationsprodukte;

— Vorschlag für einen Transformationspfad, falls möglich;

— Diskussion der Ergebnisse.

4. **LITERATURANGABEN**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide, (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992), Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046, United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada, 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-9B-O8O.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem, 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC Pests and Diseases, 3B 4, 149 158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Sludies with $^{14}$C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, CA. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17 edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for. freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment.Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10. November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868,

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimbom, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A baten test for assessing the mineralisation of $^{14}C$-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions, Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603,

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical Interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water Systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, 1349-1354.

▼B

*Anlage 1*

## ANLEITUNG ZU DEN AEROBEN UND DEN ANAEROBEN TESTSYSTEMEN

### Aerobes Testsystem

Das in dieser Testmethode beschriebene aerobe Testsystem besteht aus einer aeroben Wassersäule (typische Sauerstoffkonzentrationen im Bereich von 7 bis 10 $mg \cdot l^{-1}$) und einer Sedimentschicht, die an der Oberfläche aerob und unter der Oberfläche anaerob ist. (Typische mittlere Redoxpotenziale ($E_h$) der anaeroben Sedimentzone liegen im Bereich von - 80 bis - 190 mV.) In jedem Inkubationsgefäß wird angefeuchtete Luft über die Wasseroberfläche geführt, um im oberen Teil des Gefäßes eine ausreichende Menge Sauerstoff zu gewährleisten.

### Anaerobes Testsystem

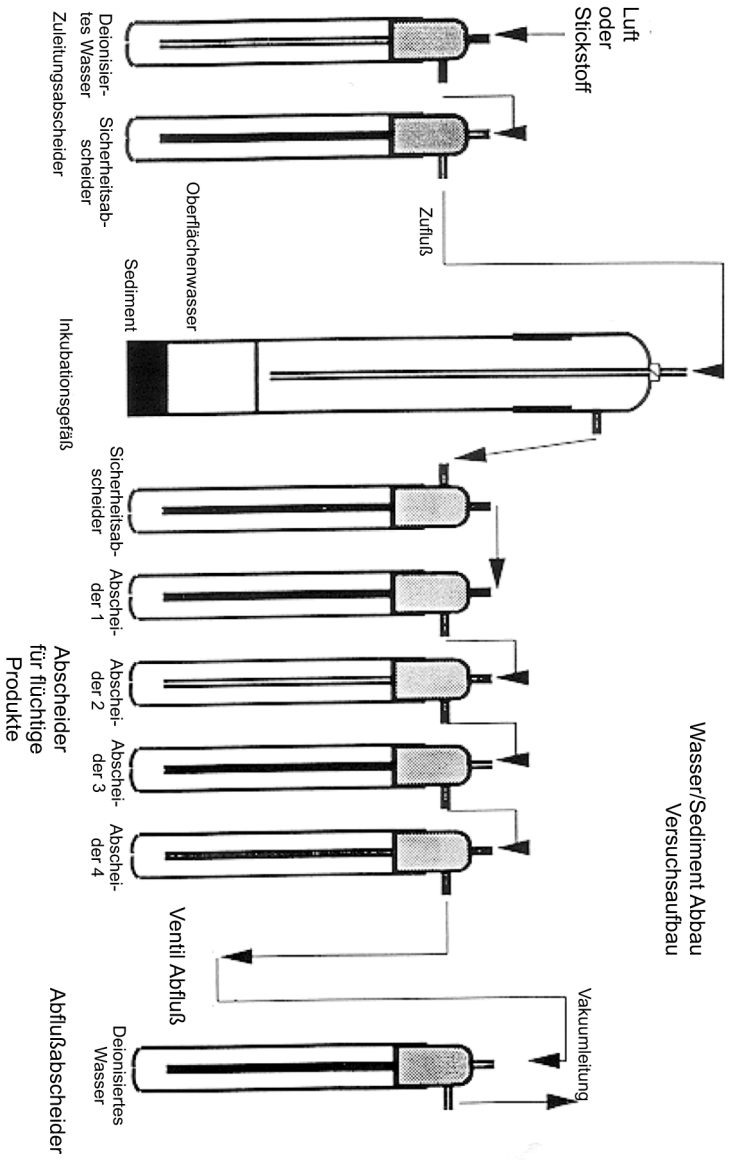
Das Testverfahren des anaeroben Testsystems gleicht im Wesentlichen dem für das aerobe System beschriebenen, mit dem Unterschied, dass in jedem Inkubationsgefäß angefeuchteter Stickstoff über die Wasseroberfläche geführt wird, um eine ausreichende Stickstoffmenge im oberen Gefäßteil zu gewährleisten. Sediment und Wasser werden als anaerob betrachtet, wenn das Redoxpotenzial ($E_h$) niedriger ist als - 100 mV.

Im anaeroben Test beruht die Beurteilung der Mineralisation auf der Messung des gebildeten Kohlendioxids und Methans.

▼B

*Anlage 2*

**BEISPIEL EINES DURCHFLUSSSYSTEMS**

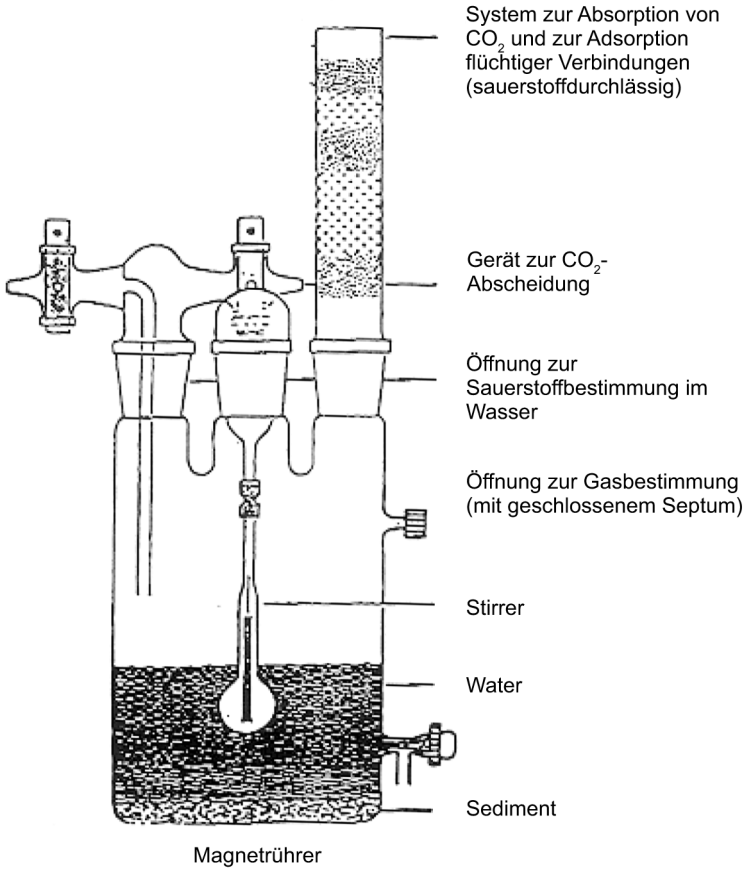



Sicherheitsabscheider, leer
Abscheider 1:
Ethylenglykol für die Abscheidung flüchtiger organischer Stoffe
Abscheider 2:
0,1M Schwefelsäure für die Abscheidung flüchtiger alkalischer Stoffe
Abscheider 3 und 4:
2M Natriumhydroxid für die Abscheidung von $CO_2$ und anderen flüchtigen sauren Stoffen

▼B

*Anlage 3*

**BEISPIEL EINES BIOMETERSYSTEMS**



▼B

*Anlage 4*

**BEISPIELRECHNUNG FÜR DIE APPLIKATIONSDOSIS IN TESTGEFÄSSEN**

| | |
|---|---|
| Zylinderinnendurchmesser: | = 8 cm |
| Höhe der Wassersäule ohne Sediment: | = 12 cm |
| Oberfläche: $3{,}142 \times 4^2$ | = 50,3 $cm^2$ |
| Applikationsrate: 500 g Testsubstanz/ha entspricht 5 | |
| µg/$cm^2$Gesamtmenge (µg): $5 \times 50{,}3$ | = 251,5 µg |
| Bezug der Gesamtmenge auf eine Wassersäulenhöhe von 100 cm: | = 30,18 µg |
| $12 \times 251{,}5 \div 100$ | |
| Volumen der Wassersäule: $50{,}3 \times 12$ | = 603 ml |
| Konzentration in Wasser: $30{,}18 \div 603$ | = 0,050 µg/ml oder 50 µg/l |

▼M1

## C.25. AEROBE MINERALISATION IN OBERFLÄCHENWASSER — SIMULATIONSTEST ZUR BIOLOGISCHEN ABBAUBARKEIT

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der Prüfrichtlinie OECD TG 309 (2004) (1).

### 1.1. EINLEITUNG

Mit diesem Test sollen der zeitliche Verlauf des biologischen Abbaus einer niedrig konzentrierten Prüfsubstanz in aerobem natürlichem Wasser gemessen und die Beobachtungen als kinetische Geschwindigkeit quantifiziert werden. Dieser Simulationstest besteht aus einem im Labor durchgeführten Schüttelkolben-Batch-Test, in dem die Rate des aeroben biologischen Abbaus organischer Substanzen in Proben natürlichen Oberflächenwassers (Süßwasser, Brackwasser oder Meerwasser) ermittelt wird. Der Test beruht auf ISO/DIS 14592-1 (2) und beinhaltet außerdem Elemente der Prüfmethoden C.23 und C.24 (3)(4). Bei langer Testdauer wird anstelle der Batch-Untersuchung ein semikontinuierlicher Test durchgeführt, um den Abbau der Testorganismen zu verhindern. Das Hauptziel des Simulationstests besteht in der Mineralisation der Prüfsubstanz in Oberflächenwasser; aufgrund der Mineralisation wird dann die Abbaukinetik beschrieben. Ein fakultatives untergeordnetes Ziel des Tests besteht in der Ermittlung von Informationen zum primären Abbau und zur Bildung wesentlicher Transformationsprodukte. Die Bestimmung der Transformationsprodukte sowie nach Möglichkeit die Quantifizierung der jeweiligen Konzentrationen sind besonders wichtig bei Substanzen, die sehr langsam mineralisiert werden (z. B. wenn die Halbwertszeiten für den Abbau sämtlicher $^{14}C$-Rückstände mehr als 60 Tage betragen). Zur Bestimmung und Quantifizierung wichtiger Transformationsprodukte sollten aus analytischen Gründen die Prüfsubstanzen im Allgemeinen in höheren Konzentrationen (z. B. > 100 μg/l) verwendet werden.

Niedrige Konzentrationen sind in diesem Test Konzentrationen (z. B. von weniger als 1 μg/l auf 100 μg/l), die so gering sind, dass sichergestellt ist, dass die Kinetik des biologischen Abbaus im Test die in der natürlichen Umgebung zu erwartende Kinetik widerspiegelt. Gegenüber der Gesamtmasse an biologisch abbaubaren Kohlenstoffsubstraten, die in im Test verwendetem natürlichem Wasser vorkommen, fungiert die niedrig konzentrierte Prüfsubstanz als untergeordnetes Substrat. Dies bedeutet, dass die zu erwartende Kinetik des biologischen Abbaus als Kinetik erster Ordnung einzustufen ist (Kinetik „ohne Wachstum“) und dass die Prüfsubstanz durch „Cometabolismus“ abgebaut werden kann. Eine Kinetik erster Ordnung impliziert, dass die Abbaurate (mg/l/Tag) proportional zur im Laufe der Zeit abnehmenden Substratkonzentration ist. Bei echter Kinetik erster Ordnung ist die Konstante der spezifischen Abbaurate (k) unabhängig von der Dauer und von der Konzentration. Die Konstante k ändert sich also während eines Versuchs nicht nennenswert, und wesentliche Änderungen treten auch nach Konzentrationssteigerungen von einem Versuch zum nächsten nicht auf. Per Definition entspricht die Konstante der spezifischen Abbaurate der relativen Konzentrationsänderung pro Zeiteinheit: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Unter den vorgegebenen Bedingungen ist im Allgemeinen eine Kinetik erster Ordnung zu erwarten; unter gewissen Bedingungen kann jedoch auch eine sonstige Kinetik gegeben sein. Abweichungen von der Kinetik erster Ordnung können z. B. festzustellen sein, wenn die Geschwindigkeit der biologischen Transformation stärker durch ein Massentransfer-Phänomen wie z. B. die Diffusionsrate als durch die Geschwindigkeit der biologischen Reaktion begrenzt wird. Die Daten können jedoch nahezu immer durch eine Pseudo-Kinetik erster Ordnung beschrieben werden, wobei eine konzentrationsabhängige Konstante für die Abbaurate angenommen wird.

▼M1

Informationen zur biologischen Abbaubarkeit der Prüfsubstanz bei höheren Konzentrationen (z. B. aufgrund von Standard-Screening-Tests) sowie Informationen zur abiotischen Abbaubarkeit, zu Transformationsprodukten und zu maßgeblichen physikalisch-chemischen Merkmalen sollten vor dem Test verfügbar sein, um den Versuch planen und die Ergebnisse auswerten zu können. Die Verwendung von mit $^{14}C$-markierten Prüfsubstanzen und die Bestimmung der Phasenverteilung von $^{14}C$ am Ende des Tests ermöglichen die Bestimmung der biologischen Endabbaubarkeit. Bei nicht markierten Prüfsubstanzen kann der biologische Endabbau nur geschätzt werden, wenn eine höhere Konzentration getestet wird und alle wesentlichen Transformationsprodukte bekannt sind.

1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

**Primärer biologischer Abbau**: Strukturänderung (Transformation) einer chemischen Substanz durch Mikroorganismen infolge des Verlusts der chemischen Identität.

**Funktionaler biologischer Abbau**: Strukturänderung (Transformation) einer chemischen Substanz durch Mikroorganismen infolge des Verlusts eines spezifischen Merkmals.

**Aerober biologischer Endabbau**: Zersetzung einer chemischen Substanz durch Mikroorganismen unter Sauerstoffeinwirkung in Kohlendioxid und Wasser sowie in Mineralsalze sonstiger vorhandener Elemente (Mineralisation) und Erzeugung neuer Biomasse und organischer mikrobiologischer Biosyntheseprodukte.

**Mineralisation**: Zersetzung einer chemischen Substanz oder eines organischen Materials durch Mikroorganismen unter Sauerstoffeinwirkung in Kohlendioxid und Wasser sowie in Mineralsalze sonstiger vorhandener Elemente.

**„Lag"-Phase**: Zeitraum vom Beginn eines Tests bis zur Anpassung der abbauenden Mikroorganismen und bis der biologische Abbau einer chemischen Substanz oder eines organischen Materials einen nachweisbaren Umfang angenommen hat (z. B. 10 % des maximalen theoretischen biologischen Abbaus bzw. je nach Genauigkeit des Messverfahrens auch weniger).

**Maximaler Umfang des biologischen Abbaus**: In Prozent erfasster Umfang des biologischen Abbaus einer chemischen Substanz oder eines organischen Materials in einem Test, über den hinaus während des Tests kein weiterer biologischer Abbau mehr erfolgt.

**Primärsubstrat**: Zusammenstellung natürlichen Kohlenstoffs und natürlicher Energiequellen, in der eine mikrobiologische Biomasse wachsen und kultiviert werden kann.

**Sekundärsubstrat**: Niedrig konzentrierte Substratkomponente, durch deren Abbau den maßgeblichen Mikroorganismen im Vergleich zur Kohlenstoff- und Energieversorgung infolge des Abbaus der wesentlichen Substratkomponenten (Primärsubstrate) nur unerhebliche Mengen an Kohlenstoff und Energie zugeführt werden.

**Konstante der Abbaurate**: Konstante der Abbaukinetik erster Ordnung k ($d^{-1}$); diese Konstante gibt Aufschluss über die Geschwindigkeit von Abbauprozessen; bei Batch-Versuchen wird k aufgrund des anfänglichen Abschnitts der Abbaukurve geschätzt, die am Ende der „Lag"-Phase ermittelt wird.

▼M1

**Halbwertszeit, $t_{1/2}$ (d)**: Parameter zur Beschreibung der Geschwindigkeit einer Reaktion erster Ordnung; Zeitabstand, der einem Konzentrationsrückgang um den Faktor 2 entspricht. Der Zusammenhang zwischen der Halbwertszeit und der Konstante der Abbaurate lässt sich mit der Formel $t_{1/2} = \ln 2/k$ beschreiben.

**Abbauzeit, $DT_{50}$ (d)**: Parameter zur Quantifizierung des Ergebnisses von Tests zur Ermittlung der biologischen Abbaubarkeit; Zeitintervall einschließlich der „Lag"-Phase, in dem ein biologischer Abbau von 50 % erreicht wird.

**Nachweisgrenze (LOD = Limit of Detection) und Quantifizierungsgrenze (LOQ = Limit of Quantification)**: Als Nachweisgrenze (LOD) wird die Konzentration einer Substanz bezeichnet, unter der die Substanz nicht mehr von analytischen Artefakten unterschieden werden kann. Als Quantifizierungsgrenze (LOQ) gilt die Konzentration einer Substanz, unter der die Konzentrationen nicht mehr mit annehmbarer Genauigkeit bestimmt werden kann.

**Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC = Dissolved organic Carbon)**: Der Anteil des in einer Wasserprobe enthaltenen organischen Kohlenstoffs, der nicht durch die spezifizierte Phasentrennung entfernt werden kann (etwa durch 15-minütiges Zentrifugieren mit 40 000 $ms^{-2}$ oder durch Membranfiltration mit einer Porengröße von 0,2 μm-0,45 μm).

**TOA (Total organic $^{14}C$ Activity)**: $^{14}C$-Gesamtaktivität von organischem Kohlenstoff

**DOA (Dissolved organic $^{14}C$ Activity)**: $^{14}C$-Aktivität von gelöstem organischem Kohlenstoff

**POA (Particulate organic $^{14}C$ Activity)**: $^{14}C$-Aktivität von als Feststoff vorliegendem organischem Kohlenstoff

1.3. ANWENDBARKEIT DER PRÜFMETHODE

Dieser Simulationstest ist bei nicht flüchtigen oder leicht flüchtigen organischen Substanzen durchzuführen, die bei niedrigen Konzentrationen getestet werden. Bei Verwendung von zur Atmosphäre offenen Kolben (z. B. nur mit einem Watteprop verschlossen) können Substanzen mit Henry-Konstanten von unter etwa 1 Pa · $m^3$/mol (ca. $10^{-5}$ atm · $m^3$/mol) in der Praxis als nicht flüchtig betrachtet werden. Mit geschlossenen Kolben mit einem gewissen Luftraum können leicht flüchtige Substanzen (mit Henry-Konstanten < 100 Pa · $m^3$/mol bzw. < $10^{-3}$ atm · $m^3$/mol) verlustfrei getestet werden. Bei mit $^{14}C$ markierten Substanzen können Verluste auftreten, wenn beim Abtrennen des $CO_2$ nicht die erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden. In diesen Fällen muss unter Umständen $CO_2$ in einem internen Absorber mit Alkali gebunden oder ein externes $CO_2$-Absorbersystem verwendet werden (direkte $^{14}CO_2$-Bestimmung, wie in Anhang 3 beschrieben). Damit die Kinetik des biologischen Abbaus bestimmt werden kann, muss die Konzentration der Prüfsubstanz unter der Wasserlöslichkeit der Prüfsubstanz liegen. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass die in der Fachliteratur genannten Werte für die Wasserlöslichkeit erheblich höher sein können als die Löslichkeit der Prüfsubstanz in natürlichen Gewässern. Fakultativ kann die Löslichkeit von Prüfsubstanzen mit besonders schlechter Wasserlöslichkeit auch unter Verwendung von Material aus den zu prüfenden natürlichen Gewässern bestimmt werden.

Die Methode kann zur Simulierung des biologischen Abbaus in von groben Partikeln freiem Oberflächenwasser („pelagischer Test") oder in trübem Oberflächenwasser z. B. an einem Wasser-/Sediment-Übergang („Test mit suspendierten Sedimenten") eingesetzt werden.

▼M1

1.4. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Der Test wird als Batch-Test durchgeführt, indem die Prüfsubstanz entweder ausschließlich mit Oberflächenwasser („pelagischer Test“) oder in mit suspendierten Feststoffen/Sedimenten mit 0,01 bis 1 g/l Trockengewicht aufbereitetem Oberflächenwasser („Test mit suspendierten Sedimenten“) inkubiert wird, um ein Wasservolumen mit suspendierten Feststoffen oder neu suspendierten Sedimenten zu simulieren. Die Konzentration der suspendierten Feststoffe/Sedimente im unteren Bereich dieses Intervalls ist typisch für die meisten Oberflächengewässer. Die Testkolben werden im Dunkeln bei Umgebungstemperatur unter Schütteln bei aeroben Bedingungen inkubiert. Die Prüfsubstanz sollte in mindestens zwei Konzentrationen verwendet werden, um die Abbaukinetik zu bestimmen. Die Konzentrationen sollten sich um den Faktor 5 bis 10 voneinander unterscheiden und den in der Umwelt zu erwartenden Konzentrationsbereich abdecken. Die maximale Konzentration der Prüfsubstanz sollte höchstens 100 µg/l betragen; maximale Testkonzentrationen unter 10 µg/l sind jedoch zu bevorzugen, um sicherzustellen, dass beim biologischen Abbau eine Kinetik erster Ordnung gegeben ist. Die niedrigste Konzentration sollte höchstens 10 µg/l betragen; niedrigste Konzentrationen von 1-2 µg/l oder von weniger als 1 µg/l sind zu bevorzugen. Im Allgemeinen kann eine angemessene Analyse derart niedriger Konzentrationen mit handelsüblichen mit $^{14}C$ markierten Substanzen durchgeführt werden. Aus analysetechnischen Gründen kann die Konzentration der Prüfsubstanz häufig nicht mit der erforderlichen Genauigkeit gemessen werden, wenn die Prüfsubstanz in einer Konzentration von ≤ 100 µg/l vorliegt (siehe Abschnitt 1.7.2 Absatz 2). Höhere Konzentrationen der Prüfsubstanz (> 100 µg/l und gelegentlich > 1 mg/l) können zur Bestimmung und zur Quantifizierung wichtigerer Transformationsprodukte sowie dann verwendet werden, wenn ein spezifisches Analyseverfahren mit niedriger Nachweisgrenze nicht verfügbar ist. Wenn hohe Konzentrationen einer Prüfsubstanz getestet werden sollen, können die Ergebnisse unter Umständen nicht zur Schätzung der Konstante des Abbaus erster Ordnung und zur Schätzung der Halbwertszeit verwendet werden, weil der Abbau wahrscheinlich nicht der Kinetik erster Ordnung folgt.

Nach dem Abbau werden in geeigneten Zeitabständen entweder die $^{14}C$-Restwerte oder die Restkonzentration der Prüfsubstanz gemessen, wenn eine spezifische chemische Analyse erfolgt. Die $^{14}C$-Markierung der stabilsten Molekülbereiche gewährleistet, dass die Gesamtmineralisation bestimmt wird; erfolgt die Markierung mit $^{14}C$ bei weniger stabilen Molekülbereichen oder werden spezifische Analyseverfahren eingesetzt, kann nur der primäre biologische Abbau ermittelt werden. Der stabilste Bereich beinhaltet jedoch nicht zwangsläufig den funktionsrelevanten Teil des Moleküls (der einem spezifischen Merkmal wie z. B. der Toxizität oder der Bioakkumulation zugeordnet werden kann). In diesem Fall ist unter Umständen die Verwendung einer im funktionsrelevanten Teil mit $^{14}C$ markierten Prüfsubstanz angemessen, wenn die Aufhebung eines spezifischen Merkmals überwacht werden soll.

1.5. INFORMATIONEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

Für diesen Test können sowohl radioaktiv markierte als auch nicht markierte Prüfsubstanzen verwendet werden. Die Markierung mit $^{14}C$ wird empfohlen; markiert werden sollten im Allgemeinen die stabilsten Bereiche der jeweiligen Moleküle (siehe auch Abschnitt 1.4). Bei Substanzen mit mehreren aromatischen Ringen sollte vorzugsweise mindestens ein Kohlenstoffmolekül pro Ring mit $^{14}C$ markiert werden. Außerdem sollte vorzugsweise mindestens ein Kohlenstoffmolekül auf beiden Seiten leicht abbaubarer Brücken mit $^{14}C$ markiert werden. Die chemische und/oder radiochemische Reinheit der Prüfsubstanz sollte > 95 % sein. Bei radioaktiv markierten Substanzen ist eine spezifische Aktivität von mindestens ca. 50 µCi/mg (1,85 MBq) zu bevorzugen, um die $^{14}C$-Messungen in Tests mit niedrigen Ausgangskonzentrationen zu erleichtern. Zu den Prüfsubstanzen sollten folgende Informationen verfügbar sein:

▼**M1**

— Löslichkeit in Wasser (Methode A.6);

— Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln (mit Lösungsmitteln behandelte Substanzen oder Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit),

— Dissoziationskonstante (pKa), wenn die betreffende Substanz zur Protonierung oder Deprotonierung neigt (OECD TG 112) (5);

— Dampfdruck (Methode A.4] und Henry-Konstante;

— chemische Stabilität in Wasser und im Dunkeln (Hydrolyse) (Methode C.7).

Wenn Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit in Meerwasser getestet werden, kann die Kenntnis der Aussalzungskonstante (oder „Setschenow-Konstante“) $K^s$ von Vorteil sein; diese Konstante wird mit folgender Formel definiert: log (S/S') = $K^s$ $C_m$; dabei stehen S und S' für die Löslichkeit der Substanz in Süßwasser bzw. in Meerwasser und $C_m$ für die molare Salzkonzentration.

Wenn der Test als „Test mit suspendierten Sedimenten“ durchgeführt wird, sollten auch die folgenden Informationen vorliegen:

— n-Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient (Methode A.8);

— Adsorptionskoeffizient (Methode C.18);

Außerdem können die folgenden Informationen hilfreich sein:

— Umweltkonzentration (wenn bekannt oder geschätzt);

— Toxizität der Prüfsubstanz für Mikroorganismen (Methode C.11);

— leichte und/oder inhärente biologische Abbaubarkeit (Methoden C.4 A-F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5));

— aerobe bzw. anaerobe biologische Abbaubarkeit im Boden sowie Studien zur Sediment-/Wasser-Transformation (Methoden C.23, C.24).

1.6. REFERENZSUBSTANZ

Als Referenzsubstanz sollte eine unter aeroben Bedingungen im Allgemeinen leicht abzubauende Substanz (z. B. Anilin oder Natriumbenzoat) verwendet werden. Gewöhnlich werden Anilin und Natriumbenzoat in weniger als zwei Wochen.abgebaut. Mit den Referenzsubstanzen soll sichergestellt werden, dass die mikrobiologische Aktivität des Testwassers in einem bestimmten Rahmen liegt, d. h. dass das Wasser eine aktive mikrobiologische Population enthält.

▼M1

1.7. QUALITÄTSKRITERIEN

1.7.1. **Wiederfindungsraten**

Unmittelbar nach der Zugabe der Prüfsubstanz sollte durch Messungen der $^{14}C$-Aktivität bzw. — bei nicht markierten Substanzen — durch chemische Analysen in jeweils mindestens zwei Proben jeweils die Ausgangs-Testkonzentration geprüft werden. Die entsprechenden Messungen geben Aufschluss über die Anwendbarkeit und über die Wiederholbarkeit der Analysemethode sowie über die Homogenität der Verteilung der Prüfsubstanz. Im Allgemeinen wird in den anschließenden Datenanalysen eher die gemessene $^{14}C$-Ausgangsaktivität oder die Prüfsubstanzkonzentration gemessen als die Nennkonzentration, da bei den Messungen der $^{14}C$-Ausgangsaktivität oder der Prüfsubstanzkonzentration die auftretenden Sorptions- und Dosierungsfehler kompensiert werden. Bei mit $^{14}C$ markierten Prüfsubstanzen wird der Umfang der Wiederfindung am Ende des Versuchs als Massenbilanz angegeben (siehe Abschnitt 1.8.9.4 letzter Absatz). Im Idealfall sollte die Massenbilanz bei radioaktiver Markierung im Bereich 90 % bis 110 % liegen; die erforderliche Analysegenauigkeit sollte bei nicht markierten Prüfsubstanzen durch eine anfängliche Wiederfindung von 70 % bis 110 % gegeben sein. Diese Bereiche sollten jedoch als Idealbereiche betrachtet und nicht als Kriterien für die Annehmbarkeit eines Tests angenommen werden. Die Analysegenauigkeit kann für die Prüfsubstanz auch bei einer niedrigeren Konzentration als der Ausgangskonzentration sowie für wichtigere Transformationsprodukte bestimmt werden.

1.7.2. **Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit der Analysemethode**

Die Wiederholbarkeit der zur Quantifizierung der Prüfsubstanz sowie ggf. der Transformationsprodukte eingesetzten Analysemethode (einschließlich der Methoden zur Überprüfung der Wirksamkeit der Erstextraktion) sollte durch fünf Wiederholungsanalysen der einzelnen Extrakte des Oberflächenwassers geprüft werden.

Die Nachweisgrenze (LOD) der zur Analyse der Prüfsubstanz und der Transformationsprodukte verwendeten Methode sollte nach Möglichkeit bei mindestens 1 % der in das Testsystem eingebrachten Ausgangsmenge liegen. Die Quantifizierungsgrenze (LOQ) sollte kleiner oder gleich 10 % der verwendeten Konzentration sein. Die chemischen Analysen vieler organischer Substanzen und der jeweiligen Transformationsprodukte setzen häufig voraus, dass die Prüfsubstanz in verhältnismäßig hohen Konzentrationen (d. h. > 100 µg/l) eingebracht wird.

1.8. BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

1.8.1. **Apparatur**

Der Test kann in konischen oder zylindrischen Kolben mit geeignetem Fassungsvermögen (z. B. 0,5 oder 1,0 l) durchgeführt werden, die mit Silikon- oder Gummistopfen verschlossen sind; alternativ können auch Serumflaschen mit $CO_2$-dichten Deckeln (z. B. mit Butylkautschuk-Septum) verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Durchführung der Tests mit mehreren Kolben und in der Entnahme des gesamten Inhalts von jeweils mindestens zwei Kolben je Probenintervall (siehe Abschnitt 1.8.9.1 letzter Absatz). Für nicht flüchtige Prüfsubstanzen, die nicht radioaktiv markiert wurden, sind gasdichte Stopfen oder Deckel nicht erforderlich. Lose Wattepfropfen, die eine Verunreinigung aus der Luft verhindern, können verwendet werden (siehe Abschnitt 1.8.9.1 Absatz 2). Leicht flüchtige Substanzen sollten in einem Biometersystem unter leichten Rühren der Wasseroberfläche getestet werden. Um sicherzustellen, dass keine Verunreinigung durch Bakterien erfolgt, können die Gefäße auch durch Erwärmen oder durch Autoklavieren vor der Verwendung sterilisiert werden. Außerdem wird die folgende Standard-Laborausrüstung verwendet:

— ein Schütteltisch oder Magnetrührer zum kontinuierlichen Rühren der Testkolben;

▼M1

— eine Zentrifuge;

— ein pH-Messgerät;

— ein Trübungsmesser für nephelometrische Trübungsmessungen;

— ein Ofen oder eine Mikrowelle zur Bestimmung der Trockengewichte;

— Geräte zur Membranfiltration;

— ein Autoklav oder ein Ofen zur Sterilisierung der Glasgeräte durch Erwärmen;

— Instrumente zur Handhabung von mit $^{14}C$ markierten Substanzen;

— Geräte zur Quantifizierung der $^{14}C$-Aktivität der Proben aus $CO_2$-Abscheidelösungen sowie ggf. aus Sedimentproben;

— Analysegeräte zur Bestimmung der Prüfsubstanz (und der Referenzsubstanz), wenn spezifische chemische Analysen (z. B. mit einem Gaschromatographien oder durch HPLC) vorgenommen werden.

1.8.2. **Stammlösungen der Prüfsubstanz**

Zur Herstellung von Stammlösungen der Prüfsubstanzen und der Referenzsubstanzen wird entionisiertes Wasser verwendet (siehe Abschnitt 1.8.7 Absatz 1). Das entionisierte Wasser sollte frei von Substanzen sein, die auf Mikroorganismen toxisch wirken könnten; außerdem sollte der Anteil an gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC) höchstens 1 mg/l betragen (6).

1.8.3. **Entnahme und Transport von Oberflächenwasser**

Die Stellen, an denen das Oberflächenwasser entnommen wird, sollten grundsätzlich abhängig vom Zweck des jeweiligen Tests ausgewählt werden. Bei der Auswahl von Entnahmestellen sind mögliche Einträge aus Landwirtschaft, Industrie und Haushalten zu berücksichtigen. Wenn bekannt ist, dass eine aquatische Umgebung in den letzten vier Jahren mit der Prüfsubstanz oder mit analog aufgebauten Substanzen verunreinigt wurde, sollte dort nur dann Wasser für die Tests entnommen werden, wenn ausdrücklich die Abbauraten an bereits belasteten Stellen untersucht werden sollen. An der Entnahmestelle sollten der pH-Wert und die Temperatur des Wassers gemessen werden. Die Tiefe, in der das Wasser entnommen wurde, sowie das Aussehen der Wasserproben (z. B. Farbe und Trübung) sollten ebenfalls protokolliert werden (siehe Abschnitt 3). Die Sauerstoffkonzentration und/oder das Redoxpotenzial in Wasser und in der Sedimentoberfläche sollten gemessen werden, um die aerobe Qualität der Proben nachzuweisen, wenn diese nicht aufgrund des Aussehens oder bereits vorliegender Erfahrungen mit der Entnahmestelle offensichtlich bzw. bekannt sind. Das Oberflächenwasser sollte in einem gründlich gespülten Behälter transportiert werden. Während des Transports sollte die Probentemperatur die Testtemperatur nicht erheblich überschreiten. Bei einer Transportdauer von mehr als 2-3 Stunden wird eine Kühlung auf 4 °C empfohlen. Die Wasserprobe darf nicht gefroren sein.

▼M1

1.8.4. **Lagerung und Vorbereitung des Oberflächenwassers**

Der Test sollte vorzugsweise binnen eines Tages nach der Probenahme begonnen werden. Die ggf. erforderliche Lagerung des Wassers sollte auf ein Minimum beschränkt werden; Lagerzeiten von mehr als vier Wochen sind unter keinen Umständen annehmbar. Die Wasserprobe sollte bis zur Verwendung bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt werden. Vor der Verwendung sollten grobe Teilchen entfernt werden (z. B. durch Filtration durch einen Nylonfilter mit einer Maschenweite von 100 μm oder mit einem groben Papierfilter oder durch Ausfällung).

1.8.5. **Vorbereitung von mit Sedimenten aufbereitetem Wasser (fakultativ)**

Für den Test mit dem suspendierten Sediment wird ein Oberflächensediment zu den Kolben mit dem wie in Abschnitt 1.8.4 beschrieben zur Abtrennung grober Teilchen gefilterten natürlichen Wasser hinzugegeben, um eine Suspension herzustellen; die Konzentration der suspendierten Feststoffe sollte zwischen 0,01 und 1 g/l betragen. Das Oberflächensediment sollte aus der Stelle stammen, aus der auch die Wasserprobe genommen wurde. Abhängig von der jeweiligen aquatischen Umgebung kann das Oberflächensediment entweder durch einen hohen Anteil an organischem Kohlenstoff (2,5-7,5 %) und durch eine feine Textur oder durch einen geringen Anteil an organischem Kohlenstoff (0,5-2,5 %) und eine grobe Textur gekennzeichnet sein (3). Das Oberflächensediment kann wie folgt hergestellt werden: Mit einem durchsichtigen Kunststoffröhrchen werden mehrere Sedimentkerne gezogen; unmittelbar nach der Probenahme werden anschließend die oberen aeroben Schichten abgeschnitten (von der Oberfläche bis zu einer Tiefe von maximal 5 mm) und zusammengegeben. Die so hergestellte Sedimentprobe sollte in einem Behälter mit großem Luftraum transportiert werden, um die aerobe Umgebung des Sediments aufrechtzuerhalten. (Bei einer Transportdauer von mehr als 2-3 Stunden ist das Sediment auf 4 °C zu kühlen.) Die Sedimentprobe sollte dann im für den Test zu verwendenden Wasser im Verhältnis 1:10 suspendiert und bis zur Verwendung belüftet bei einer Temperatur von 4 °C gelagert werden. Die ggf. erforderliche Lagerung des Sediments sollte auf ein Minimum beschränkt werden; Lagerzeiten von mehr als vier Wochen sind unter keinen Umständen annehmbar.

1.8.6. **Semikontinuierliches Verfahren (fakultativ)**

Eine längere Inkubation (über mehrere Monate) kann erforderlich sein, wenn ein erheblicher Abbau der Prüfsubstanz erst nach einer langen Verzögerung messbar ist. Wenn die Notwendigkeit einer längeren Inkubation aus früheren Tests einer Substanz bekannt ist, kann der Test mit einem semikontinuierlichen Verfahren begonnen werden, bei dem regelmäßig ein Teil des im Test verwendeten Wassers bzw. der Suspension erneuert wird (siehe Anhang 2). Alternativ kann auch der normale Batch-Test zu einem semikontinuierlichen Test abgewandelt werden, wenn binnen einer Testdauer von etwa 60 Tagen im Batch-Test (siehe Abschnitt 1.8.8.3 Absatz 2) kein Abbau der Prüfsubstanz festgestellt wurde.

1.8.7. **Zugabe der Prüfsubstanz (bzw. der Referenzsubstanz)**

Bei Substanzen mit hoher Wasserlöslichkeit (> 1 mg/l) und geringer Flüchtigkeit (Henry-Konstanten < 1 Pa · $m^3$/mol oder < $10^{-5}$ atm · $m^3$/mol) kann eine Stammlösung in entionisiertem Wasser hergestellt werden (siehe Abschnitt 1.8.2); die jeweils erforderliche Menge der Stammlösung wird zu den Prüfgefäßen hinzugegeben, bis die gewünschte Konzentration erreicht ist. Das Volumen einer hinzugefügten Stammlösung sollte auf das geringstmögliche Maß begrenzt werden (möglichst < 10 % des endgültigen Flüssigkeitsvolumens). Ein weiteres Verfahren besteht in der Auflösung der Prüfsubstanz in einem größeren Volumen des im Test verwendeten Wassers; diese Möglichkeit kommt als Alternative zur Verwendung organischer Lösungsmittel in Betracht.

▼M1

Wenn zwingend erforderlich, sollten Stammlösungen nicht flüchtiger Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit unter Einsatz eines flüchtigen organischen Lösungsmittels hergestellt werden; die Menge des zum Testsystem hinzugegebenen Lösungsmittels sollte jedoch maximal 1 % (v/v) betragen und die mikrobiologische Aktivität nicht beeinträchtigen. Außerdem sollte das Lösungsmittel keine Auswirkungen auf die Stabilität der Prüfsubstanz im Wasser haben. Das Lösungsmittel sollte bis zu einem äußerst geringen Volumen so weit abgetrennt werden, dass die DOC-Konzentration des im Test verwendeten Wassers bzw. der verwendeten Suspension nicht erheblich erhöht wird. Dies sollte durch eine substanzspezifische Analyse bzw. nach Möglichkeit durch eine DOC-Analyse sichergestellt werden (6). Dabei ist sorgfältig darauf zu achten, dass die Menge des übertragenen Lösungsmittels auf das absolut erforderliche Minimum begrenzt wird; außerdem muss gewährleistet sein, dass sich die vorhandene Prüfsubstanz im Endvolumen des im Test verwendeten Wassers auflösen kann. Für die Einbringung der Prüfsubstanz in die Prüfgefäße können auch andere Verfahren verwendet werden (siehe Quellen (7) und (8)). Wenn zur Einbringung der Prüfsubstanz ein organisches Lösungsmittel verwendet wird, sollten Lösungsmittelkontrollen mit dem im Test verwendeten Wasser (ohne weitere Zusätze) sowie das im Test verwendete Wasser unter Zugabe einer Referenzsubstanz in ähnlicher Weise wie die aktiven Prüfgefäße behandelt werden, zu denen die Prüfsubstanz in einem Trägerlösungsmittel hinzugegeben wurde. Mit den Lösungsmittelkontroollen sollen anhand des Abbaus der Referenzsubstanz mögliche Beeinträchtigungen der mikrobiologischen Population durch das Lösungsmittel untersucht werden.

1.8.8. **Prüfbedingungen**

1.8.8.1. *Testtemperatur*

Die Inkubation sollte (vorzugsweise) im Dunkeln oder bei diffuser Beleuchtung und kontrollierter Temperatur (± 2 °C) erfolgen; dies kann die in der betreffenden Außenumgebung gegebene Temperatur oder eine Standardtemperatur von 20-25 °C sein. Die in der Außenumgebung gegebene Temperatur kann entweder die tatsächliche Probentemperatur zum Zeitpunkt der Probenahme oder eine durchschnittliche Temperatur in der Außenumgebung der Entnahmestelle sein.

1.8.8.2. *Vermischung*

Durch Vermischung unter kontinuierlichem Schütteln oder Rühren muss sichergestellt werden, dass die Teilchen und Mikroorganismen suspendiert bleiben. Außerdem begünstigt die ständige Mischung den Sauerstoffeintrag aus dem Luftraum über der Flüssigkeit und somit die Aufrechterhaltung angemessener aerober Bedingungen. Dazu können die Kolben auf einen Schütteltisch (mit einer Frequenz von etwa 100 Umdrehungen pro Minute) gebracht oder mit einem Magnetrührer gerührt werden: Die Proben sind in einem kontinuierlichen Prozess zu schütteln. Das Schütteln oder Rühren muss möglichst vorsichtig erfolgen; trotzdem muss eine homogene Suspension aufrechterhalten werden.

1.8.8.3. *Testdauer*

Die Testdauer sollte im Allgemeinen höchstens 60 Tage betragen, wenn nicht das semikontinuierliche Verfahren unter regelmäßiger Erneuerung der Testsuspension eingesetzt wird (siehe Abschnitt 1.8.6 und Anhang 2). Die Testdauer des Batch-Tests kann jedoch auf maximal 90 Tage ausgedehnt werden, wenn binnen der ersten 60 Tage der Abbau der Prüfsubstanz begonnen hat. Der Abbau wird in geeigneten Zeitabständen aufgrund der $^{14}C$-Restaktivität oder der gebildeten $^{14}CO_2$-Menge (siehe Abschnitt 1.8.9.4) und/oder durch chemische Analyse (Abschnitt 1.8.9.5) überwacht. Die Inkubationsdauer muss so lange sein, dass der Abbauprozess bewertet werden kann. Der Abbau sollte vorzugsweise in einem Umfang von über 50 % erfolgt sein; bei langsam abbauenden Substanzen muss der Umfang des Abbaus hinreichend sein (im Allgemeinen mehr als 20 %), um die Schätzung einer Konstante der kinetischen Abbaurate zu ermöglichen.

▼M1

Der pH-Wert und die Sauerstoffkonzentration des Testsystems sind regelmäßig zu messen, wenn nicht aus ähnlichen Tests mit Wasser- und Sedimentproben, die aus derselben Stelle entnommen wurden, Erfahrungen vorliegen und diese Messungen daher nicht mehr erforderlich sind. Unter gewissen Bedingungen kann der Metabolismus von Primärsubstraten in stark erhöhten Konzentrationen im Wasser bzw. im Sediment dazu führen, dass so viel $CO_2$ entwickelt und so viel Sauerstoff abgebaut wird, dass sich die Versuchsbedingungen während der Testdauer erheblich ändern.

1.8.9. **Verfahren**

1.8.9.1. *Vorbereitung der Kolben für den pelagischen Test*

Ein geeignetes Volumen des im Test zu verwendenden Wassers wird in die Testkolben gebracht; die Kolben sind bis zu etwa einem Drittel zu füllen. Eine Füllmenge von etwa 100 ml darf nicht unterschritten werden. Auch wenn mehrere Kolben verwendet werden (um ggf. auch den gesamten Inhalt eines Kolbens prüfen zu können), beträgt das Volumen des zu verwendenden Wassers etwa 100 ml, da sich zu geringe Probenvolumina auf die Dauer der „Lag"-Phase auswirken könnten. Die Prüfsubstanz wird aus einer Stammlösung hinzugegeben, wie in den Abschnitten 1.8.2 und 1.8.7 beschrieben. Die Prüfsubstanz sollte in mindestens zwei Konzentrationen verwendet werden, die sich mindestens um den Faktor 5 bis 10 unterscheiden; anhand dieser Konzentrationen sollte die Abbaukinetik bestimmt und die Konstante der kinetischen Abbaurate ermittelt werden. Die beiden ausgewählten Konzentrationen sollten unter 100 µg/l liegen und sich vorzugsweise im Bereich < 1-10 µg/l bewegen.

Die Kolben sind mit für Luft und für $CO_2$ undurchlässigen Stopfen oder Deckeln zu verschließen. Bei nicht flüchtigen und nicht mit $^{14}C$ markierten Prüfchemikalien können lose Watteppropfen zum Schutz vor Verunreinigungen aus der Luft verwendet werden (siehe Abschnitt 1.8.1), wenn alle wichtigeren Abbauprodukte bekanntermaßen nicht flüchtig sind und wenn die $CO_2$-Konzentration indirekt bestimmt wird (siehe Anhang 3).

Die Kolben werden bei der jeweils ausgewählten Temperatur inkubiert (siehe Abschnitt 1.8.8.1). Proben zur chemischen Analyse oder für $^{14}C$-Messungen sind am Anfang des Tests zu entnehmen (d. h. noch vor Beginn des biologischen Abbaus; siehe Abschnitt 1.7.1); anschließend folgen während der Testdauer weitere Probenahmen in geeigneten Zeitabständen. Die Probenahme kann entweder durch Entnahme von Teilproben (z. B. 5-ml-Aliquoten) aus den einzelnen Wiederholungen oder durch Entnahme jeweils des gesamten Inhalts eines Kolbens bei der Probenahme erfolgen. Die Mineralisation der Prüfsubstanz kann wahlweise direkt oder indirekt bestimmt werden (siehe Anhang 3). In der Regel werden während der Abbauphase (d. h. nach Ende der „Lag"-Phase) mindestens fünf Probenahmestellen benötigt, um die Konstante der Abbaurate zuverlässig bestimmen zu können, wenn nicht bei rasch abbaubaren Substanzen begründet werden kann, dass drei Probenahmestellen hinreichend sind. Bei Substanzen, die nicht schnell abgebaut werden, können leicht weitere Messungen während der Abbauphase vorgenommen werden; daher sollten mehr Datenpunkte zur Bestimmung von k verwendet werden. Ein bestimmter zeitlicher Rahmen für die Probenahme kann nicht vorgegeben werden, da sich der biologische Abbau von Fall zu Fall unterschiedlich vollzieht; bei langsamem Abbau wird allerdings empfohlen, wöchentlich eine Probe zu entnehmen. Wenn die Prüfsubstanz rasch abbaubar ist, sollten Proben während der ersten drei Tage einmal täglich und anschließend jeden zweiten oder dritten Tag entnommen werden. Unter gewissen Umständen (z. B. bei sehr rasch hydrolysierenden Substanzen) müssen Proben unter Umständen stündlich genommen werden. Eine Vorstudie vor Durchführung des eigentlichen Tests wird empfohlen, um die geeigneten Intervalle für die Probenahme zu bestimmen. Wenn Proben für weitere spezifische Analysen verfügbar sein müssen, sollten mehr Proben entnommen und dann am Ende des Versuchs in rückläufiger Reihenfolge (d. h. die letzten Proben zuerst) die zu analysierenden Proben ausgewählt werden. (Hinweise zur Stabilität der Proben während der Lagerung sind Abschnitt 1.8.9.5 Absatz 2 zu entnehmen.).

▼**M1**

1.8.9.2. *Anzahl der Kolben und Proben*

Testkolben werden in folgendem Umfang benötigt:

— Testkolben; mindestens jeweils zwei Kolben für jede Konzentration der Prüfsubstanz (vorzugsweise mindestens 3) bzw. mehrere Testkolben pro Konzentration, wenn jeweils der gesamte Kolbeninhalt als Probe genommen werden soll (Kurzbezeichnung $F_T$);

— Testkolben für die Berechnung der Massenbilanz; jeweils mindestens zwei Kolben pro Testkonzentration (Kurzbezeichnung $F_M$);

— Testkolben für die unbehandelte Blindprobe (ohne Prüfsubstanz); mindestens ein Blindproben-Testkolben ausschließlich mit dem im Test verwendeten Wasser (Kurzbezeichnung $F_B$);

— Testkolben für die Referenzkontrolle; zwei Kolben mit der Referenzsubstanz (z. B. Anilin oder Natriumbenzoat in einer Konzentration von 10 µg/l) (Kurzbezeichnung $F_C$); mit der Referenzkontrolle soll sichergestellt werden, dass eine gewisse mikrobiologische Mindestaktivität gegeben ist. Wenn ohne Weiteres praktikabel, kann eine radioaktiv markierte Referenzsubstanz verwendet werden. Diese Möglichkeit kommt auch in Betracht, wenn der Abbau der Prüfsubstanz durch chemische Analysen überwacht werden soll);

— Testkolben für die sterile Kontrolllösung; ein oder zwei Kolben mit im Test verwendetem sterilisiertem Wasser zur Untersuchung eines möglichen abiotischen Abbaus oder sonstiger nicht biologischer Abtrennungen der Prüfsubstanz (Kurzbezeichnung $F_S$); die biologische Aktivität kann durch Autoklavieren (121 °C; 20 min) des im Test verwendeten Wassers oder durch Zugabe eines Giftstoffs (z. B. Natriumazid ($NaN_3$) in einer Konzentration von 10-20 g/l, Quecksilberchlorid ($HgCl_2$) in einer Konzentration von 100 mg/l oder Formalin in einer Konzentration von 100 mg/l) oder durch Gammabestrahlung beendet werden. $HgCl_2$ sollte als Sonderabfall entsorgt werden. Bei Wasser mit starker Segmentzugabe sind sterile Bedingungen schwer herzustellen; in diesem Fall wird mehrfaches Autoklavieren (z. B. dreimal) empfohlen. Dabei ist allerdings zu beachten, dass sich das Sorptionsverhalten durch Autoklavieren ändern kann.

— Testkolben für die Lösungsmittelkontrolllösungen mit dem im Test zu verwendenden Wasser und mit dem zu verwendenden Wasser in Verbindung mit der Referenzsubstanz; jeweils zwei Kolben, die mit der gleichen Lösungsmittelmenge behandelt und demselben Verfahren unterzogen wurden, wie die Kolben mit der Prüfsubstanz; mit diesen Lösungen sollen aufgrund des Abbaus der Referenzsubstanz mögliche Beeinträchtigungen durch das Lösungsmittel bestimmt werden.

Bei der Gestaltung des Prüfprotokolls sollte die relative Bedeutung häufigerer Wiederholungen bei einer höheren Anzahl an Probenahmen berücksichtigt werden. Die genaue Anzahl der erforderlichen Kolben hängt von der jeweiligen Methode zur Messung des Abbaus ab (siehe Abschnitt 1.8.9.1 Absatz 3 und Abschnitt 1.8.9.4 sowie Anhang 3).

▼M1

Aus allen Testkolben sollten bei der Probenahme jeweils zwei Teilproben (z. B. 5-ml-Aliquoten) genommen werden. Wenn mehrere Kolben eingesetzt werden, um den gesamten Inhalt eines Kolbens als Probe verwenden zu können, sollten mindestens zwei Kolben pro Probenahme entnommen werden (siehe Abschnitt 1.8.9.1 Absatz 1).

1.8.9.3. *Vorbereitung der Kolben für Tests mit suspendierten Sedimenten (fakultativ)*

Die erforderliche Menge des im Test zu verwendenden Wassers und das ggf. erforderliche Sediment werden zum Prüfgefäß hinzugegeben (siehe Abschnitt 1.8.5). Die Vorbereitung der Kolben für Tests mit suspendierten Sedimenten unterscheidet sich nicht von der Vorbereitung für den pelagischen Test (siehe Abschnitte 1.8.9.1 und 1.8.9.2). Vorzugsweise sind Serumflaschen oder ähnlich geformte Kolben zu verwenden. Die geschlossenen Kolben werden horizontal auf eine Schüttelvorrichtung gesetzt. Offene Kolben zur Untersuchung von nicht mit $^{14}C$ markierten und nicht flüchtigen Substanzen müssen selbstverständlich aufrecht eingesetzt werden. In diesem Fall werden ein Magnetrührer sowie der Einsatz von glasbeschichteten Magnetrührstäben empfohlen. Wenn erforderlich, sind die Flaschen zu belüften, um die erforderlichen aeroben Bedingungen herzustellen.

1.8.9.4. *Radiochemische Bestimmungen*

Die entstandene $^{14}CO_2$-Menge wird indirekt und direkt gemessen (siehe Anhang 3). Indirekt wird der $^{14}CO_2$-Anteil aufgrund der Differenz zwischen der anfänglichen $^{14}C$-Aktivität des im Test verwendeten Wassers bzw. der verwendeten Suspension und der gesamten Restaktivität zum Zeitpunkt der Probenahme bestimmt, nachdem die Probe auf einen pH-Wert von 2-3 angesäuert und das enthaltene $CO_2$ abgetrennt wurde. Auf diese Weise wird anorganischer Kohlenstoff entfernt, und die Restaktivität ergibt sich aus dem gemessenen organischen Material. Die indirekte $^{14}CO_2$-Bestimmung kommt nicht in Betracht, wenn während der Transformation der Prüfsubstanz wichtigere flüchtige Transformationsprodukte entstehen (siehe Anhang 3). Nach Möglichkeit sollte die $^{14}CO_2$-Bildung direkt gemessen werden; die Messung sollte bei der Probenahme für mindestens einen Testkolben erfolgen. So können die Massenbilanz und der biologische Abbau überprüft werden; diese Vorgehensweise beschränkt sich allerdings auf Tests mit verschlossenen Kolben.

Wenn das entstandene $^{14}CO_2$ während des Tests direkt gemessen wird, sollten bei Beginn des Tests mehrere Kolben für diesen Zweck vorgesehen werden. Die direkte $^{14}CO_2$-Bestimmung wird empfohlen, wenn während der Transformation der Prüfsubstanz wichtigere flüchtige Transformationsprodukte entstehen. Bei jeder Messung werden die zusätzlichen Testkolben auf einen pH-Wert von 2-3 angesäuert, und das $^{14}CO_2$ wird in einem internen oder externen Absorber gebunden (siehe Anhang 3).

Fakultativ können auch die Konzentrationen von mit $^{14}C$ markierten Prüfsubstanzen sowie von wichtigeren Transformationsprodukten durch Radiochromatographie (z. B. Dünnschichtchromatographie, RAD-TLC) oder HPLC unter radiochemischem Nachweis bestimmt werden.

Die Phasenverteilung der verbliebenen Radioaktivität (siehe Anhang 1) und die verbliebene Prüfsubstanz sowie die noch vorhandenen Transformationsprodukte können ebenfalls bestimmt werden.

▼M1

Am Ende des Tests sollte die Massenbilanz durch direkte $^{14}CO_2$-Messung mit eigenen Testkolben bestimmt werden, aus denen während des Tests die benötigten Proben entnommen werden.

1.8.9.5. *Spezifische chemische Analyse*

Wenn eine empfindliche spezifische Analysemethode verfügbar ist, kann der primäre biologische Abbau statt durch radioaktive Markierung auch aufgrund einer Messung der gesamten Restkonzentration der Prüfsubstanz ermittelt werden. Wird eine radioaktiv markierte Prüfsubstanz eingesetzt (um die Gesamtmineralisation zu messen), können spezifische chemische Analysen parallel durchgeführt werden, um weitere hilfreiche Informationen zu erhalten und das Verfahren bewerten zu können. Ferner können spezifische chemische Analysen zur Messung der beim Abbau der Prüfsubstanz gebildeten Transformationsprodukte eingesetzt werden; dies wird für Substanzen empfohlen, bei denen die Mineralisation mit Halbwertszeiten von über 60 Tagen erfolgt ist. Die Konzentration der Prüfsubstanz und die Transformationsprodukte sollten jeweils bei der Probenahme gemessen und protokolliert werden (als Konzentration und als Prozentanteil). Im Allgemeinen sollten die Transformationsprodukte bestimmt werden, die bei ≥ 10 % der verwendeten Konzentration jeweils bei der Probenahme nachgewiesen werden; ansonsten ist in angemessener Weise zu begründen, warum die Transformationsprodukte nicht bestimmt wurden. Transformationsprodukte, deren Konzentration während der Studie kontinuierlich ansteigt, sollten ebenfalls bestimmt werden, selbst wenn die jeweiligen Konzentrationen den genannten Höchstwert nicht überschreiten, da aus diesen Transformationsprodukten auf eine Persistenz geschlossen werden könnte. Analysen der Transformationsprodukte in sterilen Kontrolllösungen sollten in Erwägung gezogen werden, wenn eine rasche abiotische Transformation der Prüfsubstanz (z. B. durch Hydrolyse) für möglich gehalten wird. Die Notwendigkeit einer Quantifizierung und Bestimmung von Transformationsprodukten sollte im Einzelfall geprüft werden; die entsprechenden Begründungen sind zu protokollieren. Extraktionen unter Verwendung organischer Lösungsmittel sollten gemäß den Anweisungen zum betreffenden Analyseverfahren durchgeführt werden.

Alle Proben sollten bei 2 bis 4 °C luftdicht gelagert werden, wenn die Analyse binnen 24 Stunden (vorzugsweise) durchgeführt wird. Für eine längere Lagerung sollten die Proben auf Temperaturen unter – 18 °C gefroren oder chemisch konserviert werden. Eine Ansäuerung zur Konservierung der Proben wird nicht empfohlen, da angesäuerte Proben unter Umständen instabil sind. Wenn die Proben nicht binnen 24 Stunden analysiert und länger gelagert werden, sollte eine Untersuchung zur Stabilität unter Lagerungsbedingungen durchgeführt werden, um die Stabilität der maßgeblichen Chemikalien bei einer Temperatur von – 18 °C oder bei sonstiger Konservierung der Chemikalien nachzuweisen. Erfolgt die Analyse unter Extraktion mit einem Lösungsmittel oder durch Festphasenextraktion (SPE), sollte die Extraktion unmittelbar nach der Probenahme oder nach maximal 24-stündiger Lagerung der gekühlten Probe vorgenommen werden:

Je nach Empfindlichkeit der Analysemethode können größere Probenvolumina erforderlich sein als in Abschnitt 1.8.1 genannt. Der Test kann auf bequeme Weise mit Testvolumina von einem Liter in Kolben mit einem Volumen von 2-3 Litern durchgeführt werden, aus denen dann Proben mit einem Volumen von etwa 100 ml entnommen werden.

▼M1

2. **DATEN UND ABSCHLUSSBERICHT**

2.1. BEHANDLUNG DER ERGEBNISSE

2.1.1. **Grafische Darstellung der Daten**

Die Zeitpunkte der Probenahme sind jeweils auf volle Stunden zu runden (sofern die betreffenden Substanzen nicht binnen Minuten oder weniger Stunden abgebaut werden); eine Rundung auf Tage ist nicht zulässig. Die geschätzte Restaktivität der Prüfsubstanzen (mit $^{14}C$ markierte Substanzen) bzw. die Restkonzentration (nicht markierte Substanzen) ist bezogen auf den zeitlichen Verlauf sowohl linear als auch semilogarithmisch darzustellen (siehe Abbildungen 1a und 1b). Wenn ein Abbau erfolgt ist, sind die Ergebnisse der Kolben $F_T$ mit den Ergebnissen der Kolben $F_S$ zu vergleichen. Wenn die Mittelwerte der Ergebnisse der Kolben mit der Prüfsubstanz ($F_T$) und der sterilen Kolben ($F_S$) um weniger als 10 % voneinander abweichen, kann davon ausgegangen werden, dass der festgestellte Abbau vorwiegend abiotisch erfolgt. Wird in den Kolben $F_S$ ein geringerer Abbau beobachtet, können die Zahlen verwendet werden, um die bei den Kolben $F_T$ ermittelten Werte zu korrigieren (durch Subtraktion) und entsprechend den Umfang des biologischen Abbaus zu schätzen. Wenn fakultative Analysen der wichtigeren Transformationsprodukte vorgenommen werden, sollten ergänzend zur grafischen Darstellung des Abbaus der Prüfsubstanz auch die Entstehung und der Abbau dieser Transformationsprodukte grafisch dargestellt werden.

Die Dauer der „Lag"-Phase $t_L$ wird aufgrund der Abbaukurve (semilogarithmische Darstellung) durch Extrapolierung des linearen Abschnitts bis zum Abbau null oder alternativ durch Bestimmung der Zeit bis zu einem Abbau von etwa 10 % geschätzt (siehe Abbildungen 1a und 1b). Aus der semilogarithmischen Darstellung sind die Konstante der Rate erster Ordnung (k) sowie die betreffende Standardabweichung durch lineare Regression der ln ($^{14}C$-Restaktivität oder Prüfsubstanzkonzentration) bezogen auf den zeitlichen Verlauf zu schätzen. Insbesondere bei $^{14}C$-Messungen sind ausschließlich Daten aus dem anfänglichen linearen Bereich der Kurve im Anschluss an die beendete „Lag"-Phase zu verwenden; dabei sollten vorzugsweise eher einige wenige repräsentative Daten als umfangreichere, aber unsicherere Daten ausgewählt werden. Unsicherheitsfaktoren sind unter anderem auch die der empfohlenen direkten Messung der $^{14}C$-Restaktivität inhärenten Fehler (siehe folgende Erläuterungen). Unter Umständen kann die Berechnung von zwei unterschiedlichen Konstanten für die Abbaurate erforderlich sein, wenn der Abbau in zwei Phasen erfolgt. In diesem Fall werden zwei getrennte Phasen der Abbaukurve definiert. Für die Kolben mit den einzelnen Wiederholungen sollten die Konstante der Abbaurate (k) und die Halbwertszeit ($t_{½} = \ln 2/k$) berechnet werden, wenn aus einem Kolben mehrere Teilproben entnommen werden; alternativ können die Durchschnittswerte verwendet werden, wenn jeweils der vollständige Inhalt eines Kolbens als Probe entnommen wird (siehe Abschnitt 1.8.9.2 letzter Absatz). Beim erstgenannten Verfahren sollten die Konstante der Abbaurate und die Halbwertszeit für alle Kolben mit den einzelnen Wiederholungen sowie ein Durchschnittswert mit einer Standardabweichung protokolliert werden. Bei hohen Prüfsubstanzkonzentrationen kann die Abbaukurve beträchtlich von einer Gerade abweichen (semilogarithmische Darstellung), und die Kinetik erster Ordnung ist unter Umständen nicht gültig. Die Definition einer Halbwertszeit wäre daher nicht sinnvoll. Für einen begrenzten Datenbereich kann jedoch die Pseudo-Kinetik erster Ordnung angenommen und die Halbwertszeit des Abbaus $DT_{50}$ (Dauer bis zu einem Abbau von 50 %) geschätzt werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der zeitliche Verlauf des Abbaus über den ausgewählten Datenbereich hinaus nicht mit $DT_{50}$ prognostiziert werden kann, da dieser Parameter ausschließlich einen vorgegebenen Datensatz beschreibt. Analyse-Tools zur einfacheren statistischen Berechnung und zur Kurvenanpassung sind allgemein zugänglich; der Einsatz dieser Software wird empfohlen.

▼M1

Wenn spezifische chemische Analysen durchgeführt werden, sind die Konstanten der Abbaurate und die Halbwertszeiten des primären Abbaus wie oben beschrieben für die Gesamtmineralisation zu schätzen. Gelegentlich können Datenpunkte aus der gesamten Abbauphase verwendet werden, wenn der Prozess durch den primären Abbau eingeschränkt wird. (Im Gegensatz zu Messungen der $^{14}C$-Aktivität werden diese Messungen direkt durchgeführt.)

Wenn mit $^{14}C$ markierte Substanzen verwendet werden, sollte eine Massenbilanz ausgedrückt als Prozentanteil der eingesetzten Ausgangskonzentration zumindest am Ende des Tests protokolliert werden.

2.1.2. **Restaktivität**

Beim biologischen Abbau des mit $^{14}C$ markierten Anteils einer organischen Substanz wird das $^{14}C$ größtenteils in $^{14}CO_2$ umgewandelt; ein weiterer Anteil des $^{14}C$ wird beim Wachstum der Biomasse und/oder bei der Synthese extrazellulärer Metaboliten verbraucht. Entsprechend wird der Kohlenstoff auch bei biologischem „Endabbau“ einer Substanz nicht zu 100 % in $^{14}CO_2$ umgewandelt. Das in den durch Biosynthese gebildeten Produkten enthaltene $^{14}C$ wird anschließend infolge „sekundärer Mineralisation“ langsam als $^{14}CO_2$ freigesetzt. Aus diesen Gründen weisen grafische Darstellungen der organischen $^{14}C$-Restaktivität (gemessen nach der Abtrennung des $CO_2$) oder des erzeugten $^{14}CO_2$ bezogen auf den zeitlichen Verlauf auch nach Abschluss des Abbaus noch „Tailings“ auf. Dies erschwert die Auswertung der Daten unter kinetischen Gesichtspunkten; daher sollte im Allgemeinen nur der erste Abschnitt der Kurve (nach dem Ende der „Lag“-Phase und vor Erreichen eines Abbaus von etwa 50 %) für die Schätzung der Abbaurate-Konstante berücksichtigt werden. Beim Abbau der Prüfsubstanz ist die gesamte $^{14}C$-Restaktivität immer höher als die $^{14}C$-Aktivität in Verbindung mit der verbliebenen noch unveränderten Prüfsubstanz. Wird die Prüfsubstanz durch eine Reaktion erster Ordnung abgebaut und erfolgt eine Mineralisation einer konstanten Fraktion $\alpha$ in $CO_2$, beträgt die anfängliche Steigung der $^{14}C$-Abbaukurve (Gesamtanteil an organischem $^{14}C$ bezogen auf den zeitlichen Verlauf) das $\alpha$fache der Steigung der entsprechenden Kurve der Prüfsubstanzkonzentration (bzw. genauer gesagt des mit $^{14}C$ markierten Anteils der Prüfsubstanz). Die Konstante der Abbaurate wird ausgehend von unkorrigierten Messungen der $^{14}C$-Gesamtaktivität daher eher mit einem Sicherheitszuschlag berechnet. Verfahren zum Schätzen der Prüfsubstanzkonzentrationen aus der gemessenen radiochemischen Aktivität aufgrund verschiedener vereinfachender Annahmen wurden in der Literatur beschrieben (2)(9)(10)(11). Diese Verfahren sind bei rasch abbaubaren Substanzen am leichtesten anzuwenden.

2.2. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Wenn festgestellt wird, dass k unabhängig von der hinzugegebenen Konzentration ist (d. h. wenn die berechnete Konstante k bei unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfsubstanz etwa gleich ist), kann angenommen werden, dass die Konstante des Abbaus erster Ordnung repräsentativ für die betreffenden Testbedingungen sowie für die Wasserprobe und die Testtemperatur ist. In welchem Umfang die Ergebnisse verallgemeinert oder auf andere Systeme extrapoliert werden können, ist von Fachleuten zu beurteilen. Wenn eine hohe Prüfsubstanzkonzentration eingesetzt wird und der Abbau daher nicht nach der Kinetik erster Ordnung verläuft, können die Daten nicht zur direkten Schätzung einer Rate für den Abbau erster Ordnung oder einer entsprechenden Halbwertszeit verwendet werden. Aus einem Test mit einer hohen Prüfsubstanzkonzentration abgeleitete Daten können jedoch trotzdem für eine Schätzung des Umfangs der Gesamtmineralisation und/oder für den Nachweis und die Quantifizierung von Transformationsprodukten geeignet sein.

▼M1

Wenn statt des biologischen Abbaus die Raten sonstiger Verlustprozesse bekannt sind (z. B. Hydrolyse- oder Verflüchtigungsdaten), können diese Daten von der im Test festgestellten Nettoverlustrate abgezogen werden, um die Rate des biologischen Abbaus zu schätzen. Hydrolysedaten können z. B. aus sterilen Kontrollen oder aus Paralleltests mit höheren Prüfsubstanzkonzentrationen ermittelt werden.

Die indirekte und die direkte Bestimmung von $^{14}CO_2$ (Abschnitt 1.8.9.4 und Anhang 3) kommt ausschließlich für die Messung des Umfangs der Mineralisation der Prüfsubstanz in $CO_2$ in Betracht. Die Analyse der Konzentrationen von mit $^{14}C$ markierten Prüfsubstanzen und der Bildung wichtigerer Transformationsprodukte kann durch Radiochromatographie (RAD-TLC) oder HPLC erfolgen (Abschnitt 1.8.9.4 Absatz 3). Voraussetzung für eine direkte Schätzung der Halbwertszeit ist, dass keine wichtigeren Transformationsprodukte (definiert als ≥ 10 % der eingesetzten Menge der Prüfsubstanz) enthalten sind. Wenn wichtigere Transformationsprodukte in einem größeren Umfang als im vorstehenden Satz genannt vorkommen, ist eine detaillierte Auswertung der Daten vorzunehmen. Die detaillierte Auswertung kann Testwiederholungen und/oder Bestimmungen der Transformationsprodukte beinhalten (siehe Abschnitt 1.8.9.5 Absatz 1), wenn das Verhalten der Transformationsprodukte nicht aufgrund von Erfahrungswerten (z. B. Informationen zu den Abbauwegen) mit angemessener Zuverlässigkeit beurteilt werden kann. Da das Verhältnis des in der Prüfsubstanz enthaltenen und in $CO_2$ umgewandelten Kohlenstoffs nicht immer gleich ist (weitgehend von der Konzentration der Prüfsubstanz und sonstiger vorhandener Substrate sowie von den Testbedingungen und den jeweiligen Mikroorganismen abhängig), lässt dieser Test (im Gegensatz zu einem DOC-Die-Away-Test) eine direkte Schätzung des biologischen Endabbaus nicht zu; das Ergebnis ist jedoch ähnlich dem Ergebnis einer Respirometer-Untersuchung. Der Umfang der Mineralisation wird entsprechend kleiner oder gleich dem Mindestumfang des biologischen Endabbaus sein. Um ein umfassenderes Bild vom biologischen Endabbau (Mineralisation und Aufnahme in die vorhandene Biomasse) zu erhalten, sollte am Ende des Tests die Phasenverteilung des $^{14}C$ analysiert werden (siehe Anhang 1). Das in den vorhandenen Feststoffen enthaltene $^{14}C$ beinhaltet das in die Bakterienmasse aufgenommene $^{14}C$ sowie das in organische Partikel sorbierte $^{14}C$.

2.3. VALIDITÄT DES TESTS

Wenn die Referenzsubstanz binnen des erwarteten Zeitraums nicht abgebaut wird (bei Anilin und Natriumbenzoat gewöhnlich unter zwei Wochen), ist die Validität des Tests zu bezweifeln und weiter zu überprüfen; alternativ kann der Test auch mit einer frischen Wasserprobe wiederholt werden. Bei einem ISO-Ringtest der Methode, an dem sieben europäische Labors beteiligt waren, lagen die angepassten Abbaurate-Konstanten zwischen 0,3 und 1,7 $d^{-1}$ bei durchschnittlich 0,8 $d^{-1}$, einer Temperatur von 20 °C und einer Standardabweichung von ± 0,4 $d^{-1}$ ($t_{½}$ = 0,9 Tage). Typisch waren „Lag"-Phasen von 1 bis 7 Tagen. Für das untersuchte Wasser wurde eine bakterielle Biomasse von $10^3$ — $10^4$ KBE (koloniebildenden Einheiten) pro ml protokolliert. Die Abbauraten in nährstoffreichen mitteleuropäischen Gewässern waren höher als in nordischen oligotrophen Gewässern; dies könnte auf die unterschiedlichen Trophiezustände oder auf eine vorherige Belastung mit chemischen Stoffen zurückzuführen sein.

Die Gesamtwiederfindung (Massenbilanz) am Ende des Versuchs sollte zwischen 90 % und 110 % bei radioaktiv markierten Substanzen liegen; bei nicht radioaktiv markierten Substanzen sollte die anfängliche Rückgewinnung am Anfang des Versuchs zwischen 70 % und 110 % betragen. Die angegebenen Bereiche sind als Idealbereiche zu verstehen und sollten nicht als Kriterien für die Annehmbarkeit eines Tests betrachtet werden.

▼M1

3. **PRÜFBERICHT**

Der Typ der Studie (z. B. pelagischer Test oder Test mit suspendiertem Sediment) ist im Prüfbericht klar anzugeben; außerdem enthält der Bericht mindestens folgende Informationen:

Prüfsubstanz und Referenzsubstanz(en):

— Common Names (allgemeine Bezeichnungen und Handelsnamen), systematische chemische Namen (möglichst IUPAC- und/oder CAS-Bezeichnungen), CAS-Nummern, Strukturformeln (bei Einsatz radioaktiv markierter Substanzen zur Beschreibung der Position des $^{14}C$) sowie maßgebliche physikalisch-chemische Merkmale der Prüfsubstanz und der Referenzsubstanz (siehe Abschnitte 1.5 und 1.6),

— systematische chemische Namen, CAS-Nummern, Strukturformeln (bei Verwendung radioaktiv markierter Substanzen zur Beschreibung der Position des $^{14}C$) sowie maßgebliche physikalisch-chemische Merkmale der Prüfsubstanz und der Referenzsubstanz, die als Standards für den Nachweis und die Quantifizierung von Transformationsprodukten angenommen werden,

— Reinheit (Verunreinigungen) der Prüfsubstanzen und der Referenzsubstanzen,

— radiochemische Reinheit markierter Chemikalien und (ggf.) spezifische Aktivität.

Oberflächenwasser:

Für Wasserproben sind mindestens die folgenden Informationen anzugeben:

— Standort und Beschreibung der Entnahmestelle möglichst einschließlich Informationen über frühere Verunreinigungen,

— Datum und Zeitpunkt der Probenahme,

— Nährstoffe (N gesamt; Ammonium, Nitrit, Nitrat, P gesamt; gelöstes Orthophosphat),

— Tiefe der Probenahme,

— Aussehen der Probe (z. B. Farbe und Trübung),

— DOC und TOC,

— BOD,

— Temperatur und pH-Wert an der Entnahmestelle zum Zeitpunkt der Probenahme,

— Sauerstoff- oder Redoxpotenzial (erforderlich nur dann, wenn die aerobe Qualität nicht offensichtlich ist),

— Salzgehalt oder Leitfähigkeit (bei Meer- und Brackwasser),

— suspendierte Feststoffe (bei trüben Proben),

— nach Möglichkeit sonstige maßgebliche Informationen über die Entnahmestelle zum Zeitpunkt der Probenahme (z. B. aktuelle oder frühere Daten zur Fließgeschwindigkeit von Flüssen oder Meeresströmungen, in der Nähe befindliche Abwassereinleitungen und Typ der Abwässer, Witterungsbedingungen vor dem Zeitpunkt der Probenahme),

fakultativ:

— mikrobiologische Biomasse (z. B. AODC (Acridine Orange Direct Count oder KBE (koloniebildende Einheiten)),

▼M1

— anorganischer Kohlenstoff,

— Chlorophyll-a-Konzentration als spezifisches Maß für die Algenbiomasse.

Bei Tests mit suspendierten Sedimenten sollten außerdem die folgenden Informationen zu den Sedimenten angegeben werden:

— Tiefe der Sedimententnahm,

— Aussehen des Sediments (farbig, schlammig, schluffig oder sandig),

— Textur (z. B. % grober Sand, feiner Sand, Schluff und Ton),

— Trockengewicht in g/l der suspendierten Feststoffe, TOC-Konzentration oder Gewichtsverlust nach Entzündung als Maß für den Anteil an organischem Material,

— pH-Wert,

— Sauerstoff- oder Redoxpotenial (erforderlich nur dann, wenn die aerobe Qualität nicht offensichtlich ist).

Testbedingungen:

— Zeitabstand zwischen Probenahme und Verwendung im Labortest; Dauer der Probenlagerung und Vorbereitung der Proben; Zeitpunkte der Durchführung der Tests,

— Menge der verwendeten Prüfsubstanz, Testkonzentration und Referenzsubstanz,

— Methode zur Einbringung der Prüfsubstanz einschließlich ggf. verwendeter Lösungsmittel,

— Volumen des verwendeten Oberflächenwassers und (wenn verwendet) der Sedimente sowie jeweils zur Analyse entnommenes Probenvolumen,

— Beschreibung des eingesetzten Testsystems,

wenn der Test nicht im Dunkeln durchgeführt werden muss, Informationen zur Qualität des „diffusen Lichts“;

— Informationen zu den Methoden zur Herstellung steriler Kontrollen (z. B. Temperatur, Dauer und Anzahl der Autoklavierungen),

— Inkubationstemperatur,

— Informationen zu Analyseverfahren und Methoden für radiochemische Messungen sowie zur Prüfung der Massenbilanz und für Messungen der Phasenverteilung (wenn durchgeführt),

— Anzahl der Wiederholungen.

Ergebnisse:

— Wiederfindung in Prozent (siehe Abschnitt 1.7.1),

— Wiederholbarkeit und Empfindlichkeit der Analysemethoden einschließlich der Nachweisgrenze (LOD) und der Quantifizierungsgrenze (LOQ) (siehe Abschnitt 1.7.2),

▼M1

— Darstellung aller gemessenen Daten (einschließlich der Zeitpunkte der Probenahmen) sowie der berechneten Werte in Tabellen und entsprechenden Abbaukurven; für jede Testkonzentration und für jeden Kolben mit einer Wiederholungslösung sind für die logarithmische Darstellung der lineare Korrelationskoeffizient der Steigung sowie die geschätzte „Lag"-Phase und eine Konstante für die Pseudo-Rate erster Ordnung (wenn möglich) und die entsprechende Abbauzeit (bzw. die Halbwertszeit $t_{50}$) anzugeben,

— die entsprechenden Werte sind als Durchschnittswerte der in den einzelnen Wiederholungen festgestellten Ergebnisse zu protokollieren (z. B. Dauer der „Lag"-Phase, Konstante der Abbaurate und Abbauzeit (bzw. $t_{50}$),

— das System ist aufgrund der Beschaffenheit der Abbaukurve sowie unter Berücksichtigung der möglichen Auswirkungen der Testkonzentration als angepasst oder als nicht angepasst zu bewerten,

— Ergebnisse der Endmassenbilanz und Ergebnisse der Messungen zur Bestimmung der Phasenverteilungen (wenn vorhanden);

— Anteil des mineralisierten $^{14}C$ sowie — bei spezifischen Analysen — Endumfang des primären Abbaus,

— (ggf.) Nachweis, Molkonzentration und Prozentanteil zugegebener wichtigerer Transformationsprodukte (siehe Abschnitt 1.8.9.5 Absatz 1),

— (ggf.) angenommener Transformationsweg,

— Diskussion der Ergebnisse.

## 4. LITERATUR


1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Prüfmethode C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Prüfmethode C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5. OECD (1993). Leitlinien für die Prüfung von Chemikalien OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD-Entwurf (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. und Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol. 47, S. 394-401.

10. Ingerslev, F. und N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of $^{14}C$-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, S. 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/-sediment suspensions.

▼M1

*Anhang 1*

**Phasenverteilung $^{14}C$**

Um das Verfahren zu überprüfen, sollten die Routinemessungen der $^{14}C$-Gesamtaktivität von organischem Kohlenstoff (TOA) um Massenbilanzmessungen unter direkter Bestimmung des entwickelten $^{14}CO_2$ nach Bindung in einem Absorber ergänzt werden (siehe Anhang 3). Eine positive $^{14}CO_2$-Bildung ist an sich schon als direkter Nachweis für einen biologischen Abbau zu betrachten (im Gegensatz zum abiotischen Abbau oder zu sonstigen Verlustprozessen wie z. B. Verflüchtigung oder Sorption). Weitere hilfreiche Informationen zur Beschreibung des biologischen Abbauverhaltens sind aus Messungen der TOA-Verteilung zwischen dem gelösten Stadium ($^{14}C$-Aktivität von gelöstem organischem Kohlenstoff, DOA) und dem Partikelstadium ($^{14}C$-Aktivität von als Feststoff vorliegendem organischem Kohlenstoff, POA) nach Abtrennung der Feststoffe durch Membranfiltration oder Zentrifugierung zu entnehmen. Die POA besteht aus der in der mikrobiologischen Biomasse und auf sonstigen Feststoffen sorbierten Prüfsubstanz sowie dem in der Prüfsubstanz enthaltenen Kohlenstoff, der zur Synthese neuen Zellmaterials verwendet und dadurch in die Feststoff-Biomasse aufgenommen wurde. Die Bildung gelösten organischen $^{14}C$-Materials kann als DOA am Ende des biologischen Abbaus (Plateau der Abbau-/Zeit-Kurve) geschätzt werden.

Die Phasenverteilung des $^{14}C$-Restanteils, der auf den ausgewählten Proben nach Filtration auf einem Membranfilter (etwa aus Polycarbonat) mit einer Porengröße von 0,22 µm oder 0,45 µm verblieben ist, wird geschätzt. Wenn die Sorption der Prüfsubstanz auf dem Filter nicht vernachlässigbar gering ist (vor der Durchführung des Versuchs festzustellen), kann anstelle der Filtration eine Zentrifugierung mit hoher Geschwindigkeit (2 000 g; 10 min) erfolgen.

Anschließend ist das Filtrat bzw. das Zentrifugat wie in Anhang 3 für ungefilterte Proben beschrieben zu behandeln. Membranfilter sind in einer geeigneten Szintillationsflüssigkeit zu lösen; die Zählung erfolgt dann in der üblichen Weise; im Allgemeinen werden Korrekturen der jeweiligen Querempfindlichkeit unter Anwendung eines externen Standardverhältnisverfahrens vorgenommen; alternativ kann auch ein Oxydationsmittel verwendet werden. Wenn eine Zentrifugierung erforderlich ist, muss das aus der Partikelfraktion gebildete Pellet in 1-2 ml destilliertem Wasser aufgelöst und in ein Szintillationsfläschchen gegeben werden. Anschließend werden zwei Spülungen mit 1 ml destilliertem Wasser vorgenommen und das Spülwasser in das Fläschchen gebracht. Wenn erforderlich, kann die Suspension zur Flüssigkeitsszintillationszählung in ein Gel eingebettet werden.

▼M1

*Anhang 2*

**Semikontinuierliches Verfahren**

Eine Inkubation über maximal mehrere Monate kann erforderlich sein, um einen hinreichenden Abbau von persistenten Substanzen zu erzielen. Die Testdauer sollte im Allgemeinen höchstens 60 Tage betragen, wenn die Merkmale der ursprünglichen Wasserprobe nicht auch nach einer Erneuerung der Testsuspension unverändert erhalten bleiben. Hat allerdings binnen der ersten 60 Tage der Abbau der Prüfsubstanz noch immer nicht begonnen, kann die Testdauer auf maximal 90 Tage ohne Erneuerung der Testsuspension ausgedehnt werden.

Während der Inkubation über längere Zeiträume kann die Diversität des mikrobiologischen Materials durch verschiedene Verlustprozesse sowie durch den möglichen Verbrauch wesentlicher Nährstoffe und primärer Kohlenstoffsubstrate aus der Wasserprobe reduziert werden. Daher wird empfohlen, mit einem semikontinuierlichen Test in angemessener Weise die Abbaurate langsam abbauender Substanzen zu bestimmen. Der Test sollte mit dem semikontinuierlichen Verfahren begonnen werden, wenn erfahrungsgemäß eine Inkubationsdauer von drei Monaten erforderlich ist, um die Substanz zu 20 % abzubauen. Alternativ kann der normale Batch-Test in einen seminkontinuierlichen Test abgewandelt werden, wenn während der Prüfung im Batch-Test binnen etwa 60 Tagen kein Abbau der Prüfsubstanz erfolgt ist. Das semikontinuierliche Verfahren kann ausgesetzt und der Test als Batch-Test fortgesetzt werden, wenn ein erheblicher Abbau verzeichnet wurde (z. B. > 20 %).

Beim semikontinuierlichen Test wird alle zwei Wochen etwa ein Drittel des Volumens der Testsuspension durch frisch entnommenes Wasser ersetzt, zu dem die Prüfsubstanz in der Ausgangskonzentration hinzugegeben wurde: Sedimentmaterial wird ebenso in der Ausgangskonzentration (zwischen 0,01 und 1 g/l) zum zur Erneuerung zu verwendenden Wasser hinzugegeben, wenn der fakultative Test mit dem suspendierten Sediment durchgeführt wird. Bei der Durchführung des Tests mit den suspendierten Sedimentpartikeln muss gewährleistet sein, dass auch während der Erneuerung des Wassers ein System mit vollständiger Suspension besteht und dass die Verweildauer für Feststoffe und Wasser gleich ist; ansonsten kann die erwünschte Ähnlichkeit mit einem homogenen wässerigen System ohne feste Phasen beeinträchtigt werden kann. Aus diesen Gründen wird für das semikontinuierliche Verfahren eine Ausgangskonzentration der suspendierten Sedimente im unteren Segment des vorgegebenen Konzentrationsbereichs bevorzugt.

Die vorgesehene Zugabe der Prüfsubstanz setzt voraus, dass die Ausgangskonzentration der Prüfsubstanz nicht durch eine teilweise Erneuerung der Testsuspension überschritten und entsprechend — wie häufig bei hohen Prüfsubstanzkonzentrationen festzustellen — eine Anpassung vermieden wird. Da das Verfahren sowohl eine Neubeimpfung als auch einen Ausgleich für abgebaute Nährstoffe und Primärsubstrate beinhaltet, wird die ursprüngliche mikrobiologische Diversität wiederhergestellt, und die Testdauer kann theoretisch unendlich ausgedehnt werden. Beim semikontinuierlichen Verfahren ist darauf zu achten, dass die Restkonzentration der Prüfsubstanz unter Berücksichtigung der jeweiligen Mengen der hinzugegebenen und der entnommenen Prüfsubstanz korrigiert wird. Die Gesamtkonzentration und die Konzentration der gelösten Prüfsubstanz sind für Verbindungen mit schwachem Sorptionsverhalten beliebig austauschbar. Die Sorption ist unter den vorgegebenen Bedingungen (0,1-1 g Feststoffe/l) bei Substanzen mit log Kow < 3 (für neutrale, lipophile Verbindungen) unerheblich (< 5 %). Dies wird aus dem folgenden Berechnungsbeispiel deutlich: 0,1 g/l Feststoffe entsprechen etwa 10 mg Kohlenstoff pro Liter (Kohlenstofffraktion, $f_C$ = 0,01). Wenn angenommen wird, dass

Log $K_{ow}$ (der Prüfsubstanz) = 3,

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$ und

der Verteilungskoeffizient $K_d = f_C \times K_{oc}$ ist,

beträgt die gelöste Fraktion der Gesamtkonzentration (C-Wasser ($C_w$)/C-Gesamt ($C_t$):

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

*Anhang 3*

**Bestimmung des $^{14}CO_2$-Anteils**

**Indirekte $^{14}CO_2$ -Bestimmung**

Bei Routinemessungen ist die indirekte Methode im Allgemeinen am wenigsten zeitaufwändig und am präzisesten, wenn die Prüfsubstanz nicht flüchtig ist und wenn aus der Prüfsubstanz keine flüchtigen Transformationsprodukte gebildet werden. Dazu sind einfach ungefilterte Proben (z. B. 5 ml in Szintillationsfläschchen) zu geben. Für die Tests geeignet ist eine anfängliche Probenaktivität von 5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq); die änfängliche Aktivität sollte mindestens etwa 1 000 dpm betragen. Das $CO_2$ sollte nach dem Ansäuern auf einen pH-Wert von 2-3 mit 1-2 Tropfen konzentriertem $H_3PO_4$ oder HCl erfolgen. Die $CO_2$-Abtrennung kann durch Sprudeln mit Luft über etwa ½-1 Stunde erfolgen. Alternativ können die Fläschchen auch 1-2 Stunden heftig geschüttelt werden (z. B. auf einem Mikroplatten-Schüttler) oder vorsichtiger über Nacht geschüttelt werden. Die Wirksamkeit der $CO_2$-Abtrennung ist zu überprüfen (durch Verlängerung der Belüftung oder der Dauer des Schüttelns). Anschließend sollte eine zur Zählung wässeriger Proben geeignete geeignete Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben, die Probe in einem Wirbelmischer homogenisiert und die Radioaktivität mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt werden; dabei ist die in den Blindproben festgestellte Hintergrundaktivität ($F_B$) abzuziehen. Wenn das im Test verwendete Wasser stark gefärbt ist oder hohe Feststoffkonzentrationen enthält, weisen die Proben im Allgemeinen eine einheitliche Querempfindlichkeit auf; in diesem Fall sind Querempfindlichkeitskorrekturen mit einem externen Standard hinreichend. Ist das im Test verwendete Wasser stark gefärbt, müssen die Querempfindlichkeitskorrekturen unter Umständen durch Zugabe eines internen Standards vorgenommen werden. Bei hoher Feststoffkonzentration kann unter Umständen keine homogene Lösung bzw. kein homogenes Gel hergestellt werden, oder die Proben. weisen sehr unterschiedliche Querempfindlichkeiten auf. In diesem Fall kann die im Folgenden beschriebene Methode zum Zählen von Testschlämmen verwendet werden. Wenn der Test mit einem suspendierten Sediment durchgeführt wird, sollte die $^{14}CO_2$-Messung indirekt durch Entnahme einer homogenen 10-ml-Probe des im Test verwendeten Wassers bzw. der im Test verwendeten Suspension und anschließende Trennung der Phasen durch Zentrifugieren bei geeigneter Geschwindigkeit (z. B. 40 000 $m/s^2$, 15 min) erfolgen. Danach sollte die wässerige Phase wie oben beschrieben behandelt werden. Die $^{14}C$-Aktivität von als Feststoff vorliegendem organischem Kohlenstoff (POA) sollte durch erneute Suspendierung des Sediments in einer kleinen Menge destillierten Wassers, Einbringung in Szintillationsfläschchen und Zugabe einer Szintillationsflüssigkeit zur Bildung eines Gels ermittelt werden. (Für diesen Zweck geeignete Szintillationsflüssigkeiten sind verfügbar.) Je nach Beschaffenheit der Feststoffe (z. B. Anteil an organischem Material) kann die Probe unter Umständen über Nacht mit einem Gewebelöser verarbeitet und dann in einem Wirbelmischer homogenisiert werden, bevor die Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben wird. Alternativ kann die POA durch Verbrennung des überschüssigen Sauerstoffs mit einem Oxydationsmittel bestimmt werden. Beim Zählen sollten grundsätzlich interne Standards einbezogen werden; unter Umständen müssen Querempfindlichkeitskorrekturen unter Zugabe eines internen Standards zu den einzelnen Proben vorgenommen werden.

**Direkte $^{14}CO_2$-Bestimmung**

Wenn das entstandene $^{14}CO_2$ direkt gemessen werden soll, sind bei Beginn des Tests zusätzliche Kolben vorzubereiten. Bei der Probenahme wird jeweils der gesamte Inhalt der Kolben entnommen. Die Kolben werden auf einen pH-Wert von 2-3 angesäuert und das $^{14}CO_2$ in einem internen (bereits bei Beginn des Tests in die Testkolben gebrachten) Absorber oder einem externen Absorber gebunden. Als Absorptionsmedium kann wahlweise Alkali (z. B. 1 N NaOH-Lösung oder ein NaOH-Pellet), Ethanolamin oder ein im Handel erhältlicher Absorber auf Ethanolaminbasis verwendet werden. Für direkte Messungen des $^{14}CO_2$-Gehalts sollten die Kolben z. B. mit Butylkautschuk-Septen verschlossen werden.

▼**M1**

*Abbildung 1a*

**Beispiel einer arithmetischen Darstellung der Daten (Restaktivität/Zeit)**

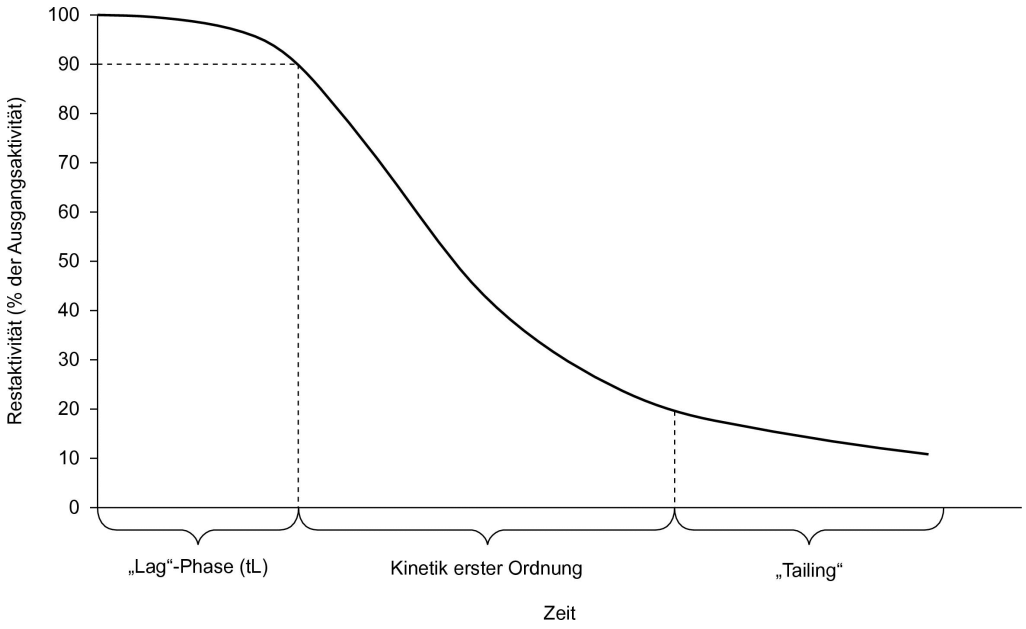
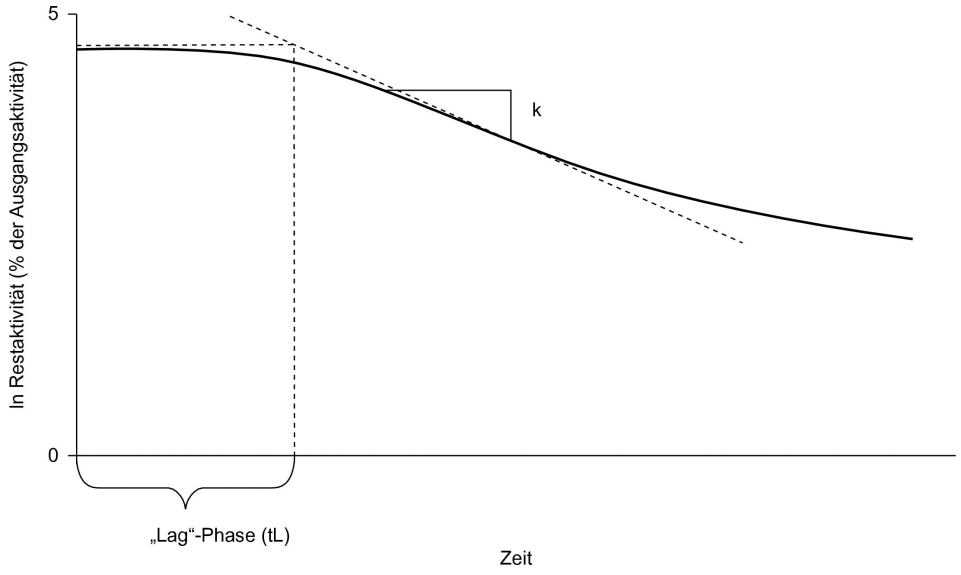



*Abbildung 1b*

**Beispiel einer semilogarithmischen Darstellung der Daten (ln Restaktivität/Zeit)**



▼M1

## C.26. *LEMNA* SP. — WACHSTUMSINHIBITIONSTEST

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der Prüfrichtlinie OECD TG 221 (2006) (1). Unter den Behörden der EU bestand breiter Konsens darüber, dass der *Lemna*-Test bei stark kolorierten Substanzen eine geeignete Alternative zur Prüfung an einer Alge ist (2)(3).

### 1.1. EINLEITUNG

Mit dieser Prüfmethode soll die Toxizität von Substanzen für Süßwasserpflanzen der Gattung *Lemna* (Wasserlinse) beurteilt werden. Die Methode beruht auf bestehenden Leitlinien (4)(5)(6)(7)(8)(9), sieht aber Änderungen der entsprechenden Methoden vor, die neueren Forschungsergebnissen und Anhörungen bezüglich einer Reihe wesentlicher Aspekte Rechnung tragen. Die vorgeschlagene Methode wurde durch einen internationalen Ringtest validiert (10).

Diese Prüfmethode beschreibt Toxizitätstests mit *Lemna gibba* und *Lemna minor*, die beide umfassend untersucht wurden und Gegenstand der genannten Standards waren. Die Taxonomie von *Lemna* spp. ist schwierig; problematisch sind die zahlreichen Phänotypen. Bei *Lemna* kann die Reaktion auf Giftstoffe zu genetischer Variabilität führen; zurzeit sind jedoch keine hinreichenden Daten zu den Ursachen dieser Variabilität verfügbar, welche die Empfehlung eines spezifischen Klons für diese Prüfmethode rechtfertigen würden. Es wird darauf hingewiesen, dass der Test nicht axenisch durchgeführt wird; in verschiedenen Stadien während der Durchführung des Tests wird jedoch mit geeigneten Maßnahmen versucht, Verunreinigungen durch andere Organismen auf ein Minimum zu begrenzen.

Die Durchführung von Tests sowohl unter Erneuerung der Testlösung (semistatische Tests und Durchflusstests) als auch ohne Erneuerung der Testlösung (statische Tests) wird detailliert beschrieben. Abhängig von den Zielsetzungen der Tests sowie von rechtlichen Anforderungen wird empfohlen, den Einsatz von semistatischen Methoden sowie von Durchflussmethoden zu prüfen (z. B. für Substanzen, die durch Verflüchtigung, Photodegradation, Ausfällung oder biologischen Abbau rasch verloren gehen). Weitere Informationen sind Quelle (11) zu entnehmen.

### 1.2. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

Im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode werden die folgenden Begriffsbestimmungen zugrunde gelegt und folgende Abkürzungen verwendet:

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

**Chlorose**: Gelbfärbung des Blattmaterials.

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

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

▼M1

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

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

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

**Aufwölbungen**: Fronds mit einer Wölbung oder Schwellung.

**Wachstum**: Zunahme der Messvariablen, z. B. Frondzahl, Trockengewicht, Feuchtgewicht oder Frondfläche während der Testdauer.

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

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

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

**Monokultur**: Kultur mit einer Pflanzenart.

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

1.3. PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Exponentiell wachsende Pflanzenkulturen der Gattung *Lemna* werden über einen Zeitraum von sieben Tagen als Monokulturen in unterschiedlichen Konzentrationen der Prüfsubstanz kultiviert. Ziel des Tests ist die Quantifizierung von durch die Substanz bedingten Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum während dieses Zeitraums, ausgehend von Bewertungen der ausgewählten Messvariablen. Die Frondzahl ist die primäre Messvariable. Mindestens eine weitere Messvariable (gesamte Frondfläche, Trockengewicht oder Frischgewicht) wird ebenfalls gemessen, da sich einige Substanzen erheblich stärker als die Frondzahlen auf die Messvariablen auswirken können. Um die substanzabhängigen Auswirkungen zu quantifizieren, wird das Wachstum der Testlösungen mit dem Wachstum der Kontrolllösungen verglichen, bei dem eine spezifizierte Wachstumshemmung von x % (z. B. 50 %) festgestellt wird, die dann als $EC_x$ (z. B. $EC_{50}$) anzugeben ist.

Der Endpunkt des Tests ist die Wachstumshemmung ausgedrückt als logarithmische Zunahme der Messvariablen (durchschnittliche spezifische Wachstumsrate) während der Expositionsdauer. Aus den in einer Reihe von Testlösungen erfassten durchschnittlichen spezifischen Wachstumsraten wird die Konzentration bestimmt, bei der sich eine spezifizierte Hemmung der Wachstumsrate von x % (z. B. 50 %) ergibt; diese Konzentration wird als $E_rC_x$ bezeichnet (z. B. $E_rC_{50}$).

Bei dieser Prüfmethode wird als weitere Reaktionsvariable der Zellertrag verwendet; diese Variable kann erforderlich sein, damit in manchen Ländern bestimmte maßgebliche Rechtsvorschriften erfüllt werden. Die Variable ergibt sich aus den Messvariablen am Ende der Expositionsdauer abzüglich der Messvariablen am Beginn der Expositionsdauer. Aus dem in einer Reihe von Testlösungen ermittelten Zellertrag werden die Konzentrationen berechnet, bei denen sich eine festgelegte Zellertrag-Hemmung von x % (z. B. 50 %) ergibt; diese Konzentration wird als $E_yC_x$ bezeichnet (z. B. $E_yC_{50}$).

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

1.4. INFORMATIONEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

Eine Analysemethode mit geeigneter Empfindlichkeit für die Quantifizierung der im Prüfmedium enthaltenen Substanz sollte verfügbar sein.

▼M1

Zur Festlegung der Testbedingungen hilfreiche Informationen zur Prüfsubstanz sind die Strukturformel, die Wasserlöslichkeit, die Stabilität in Wasser, die Lichtbeständigkeit, $pK_a$, $K_{ow}$, der Dampfdruck und die biologische Abbaubarkeit. Aus der Wasserlöslichkeit und dem Dampfdruck kann die Henry-Konstante berechnet werden, aus der zu entnehmen ist, ob während der Testdauer erhebliche Verluste der Prüfsubstanz zu erwarten sind. Die Konstante gibt Aufschluss darüber, ob bestimmte Maßnahmen zur Überwachung dieser Verluste durchgeführt werden sollten. Wenn Informationen zur Löslichkeit und zur Stabilität der Prüfsubstanz nicht zuverlässig sind, sollten die Substanzen unter den Testbedingungen (d. h. Nährmedium, Temperatur und Beleuchtung) untersucht werden.

Wenn der Steuerung des pH-Wertes des Prüfmediums besondere Bedeutung zukommt (z. B. beim Testen von Metallen oder sonstigen hydrolytisch instabilen Substanzen), wird die Zugabe einer Pufferlösung zum Nährmedium empfohlen (siehe Abschnitt 1.7.4 Absatz 1). Weitere Hinweise zu Prüfsubstanzen mit physikalisch-chemischen Merkmalen, welche die Durchführung des Tests erschweren, sind Quelle (11) zu entnehmen.

1.5. REFERENZSUBSTANZ

Um das Prüfverfahren zu testen, können Referenzsubstanzen wie z. B. das im internationalen Ringtest (10) verwendete 3,5-Dichlorphenol geprüft werden. Die Prüfsubstanzen sollten mindestens zweimal jährlich bzw., wenn die Tests seltener durchgeführt werden, gleichzeitig mit der Bestimmung der Toxizität der Prüfsubstanzen getestet werden.

1.6. VALIDITÄT DES TESTS

Die Tests sind nur dann gültig, wenn die Zeit bis zur Verdopplung der Frondzahl der Kontrolle weniger als 2,5 Tage (60 h) und damit etwa einer Erhöhung um das Siebenfache binnen sieben Tagen bei einer durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate von 0,275 $d^{-1}$ entspricht. Für die Medien und Testbedingungen gemäß dieser Methode kann dieses Kriterium mit dem Prüfprotokoll des statischen Tests (8) erfüllt werden. Außerdem wird angenommen, dass dieses Kriterium auch bei den Bedingungen des semistatischen Tests und des Durchflusstests erfüllt wird. Wie die Verdopplungszeit zu berechnen ist, wird in Abschnitt 2.1 beschrieben.

1.7. BESCHREIBUNG DER METHODE

1.7.1. **Apparatur**

Sämtliche Geräte, die mit dem Prüfmedium in Berührung kommen, sollten aus Glas oder einem sonstigen chemisch inerten Material bestehen. Die zur Kultivierung und für die Tests verwendeten Glasgeräte sollten steril sein und von chemischen Verunreinigungen befreit werden, die in das Prüfmedium gelangen könnten. Die Prüfgefäße sollten so groß sein, dass die Fronds der verschiedenen Kolonien in den Kontrollgefäßen wachsen können, ohne sich am Ende der Testdauer zu überlagern. Dass die Wurzeln gegebenenfalls den Boden der Prüfgefäße berühren, ist unerheblich; in jedem Fall ist jedoch eine Mindesttiefe von 20 mm und ein Mindestvolumen von 100 ml pro Prüfgefäß zu empfehlen. Die Art der Prüfgefäße ist nicht entscheidend, sofern diese Anforderungen erfüllt sind. Bewährt haben sich Bechergläser, Kristallisierungsschalen und Petrischalen mit geeigneten Abmessungen. Die Prüfgefäße werden abgedeckt, um die Verdampfung und zufällige Verunreinigungen zu minimieren und trotzdem den erforderlichen Luftaustausch zu ermöglichen. Die Prüfgefäße und insbesondere die verwendeten Abdeckungen dürfen keine Schatten erzeugen und keine Änderungen des Lichtspektrums bewirken.

▼M1

Kulturen und Prüfgefäße sollten nicht zusammen gelagert werden. Um diese Anforderung zu erfüllen, werden am besten getrennte Wachstumskammern bzw. getrennte Inkubatoren oder Räume verwendet. Beleuchtung und Temperatur müssen kontrolliert werden können, und für Beleuchtung und Temperatur müssen gleichbleibende Werte aufrechterhalten werden können (siehe Abschnitt 1.7.8).

1.7.2. **Testorganismus**

Für diesen Test wird entweder *Lemna gibba* oder *Lemna minor* verwendet. In Anlage 1 sind Kurzbeschreibungen von in Toxizitätstests verwendeten Wasserlinsenarten zusammengestellt. Das Pflanzenmaterial kann aus einer Kultursammlung oder aus einem anderen Labor bezogen oder aus der Natur entnommen werden. Bei Entnahme aus der Natur sollten die Pflanzen mindestens acht Wochen vor der Verwendung in dem Medium kultiviert werden, das auch für die Tests verwendet wird. Orte in der freien Natur, aus denen die Ausgangskulturen entnommen werden, dürfen keinen offensichtlichen Quellen von Verunreinigungen ausgesetzt sein. Wenn die Kulturen aus einem anderen Labor oder aus einer Kultursammlung bezogen werden, sollten sie ebenfalls mindestens drei Wochen unter ähnlichen Bedingungen kultiviert werden. Angegeben werden sollten auch die Herkunft des Pflanzenmaterials, der Arten und des Klons (wenn bekannt), die für die Tests verwendet werden.

Für die Tests sollten Monokulturen verwendet werden, die keine sichtbaren Verunreinigungen durch andere Organismen als Algen und Protozoen aufweisen. Gesunde Pflanzen der Art *L. minor* bestehen aus Kolonien mit zwei bis fünf Fronds; gesunde *L. gibba*-Kolonien können bis zu sieben Fronds umfassen.

Qualität und Einheitlichkeit der für die Tests verwendeten Pflanzen haben erhebliche Auswirkungen auf das Ergebnis der Tests; entsprechend sorgfältig sollten die Pflanzen ausgewählt werden. Nach Möglichkeit sollten junge, rasch wachsende Pflanzen ohne sichtbare Läsionen oder Verfärbungen (Chlorose) verwendet werden. Hochwertige Kulturen weisen einen hohen Anteil an Kolonien mit mindestens zwei Fronds auf. Zahlreiche einzelne Fronds deuten auf Umweltstress hin (z. B. auf Nährstoffmangel); Pflanzenmaterial aus diesen Kulturen sollte für die Tests nicht verwendet werden.

1.7.3. **Kultivierung**

Um den Kultivierungsaufwand zu reduzieren (z. B. wenn über einen bestimmten Zeitraum keine Tests mit *Lemna* vorgesehen sind), können die Kulturen bei verringerter Beleuchtung und niedrigerer Temperatur (4-10 °C) gelagert werden. Nähere Informationen zur Kultivierung sind Anlage 2 zu entnehmen. Bei offensichtlichen Anzeichen für Verunreinigungen durch Algen oder sonstige Organismen muss eine Oberflächensterilisation einer Teilprobe der *Lemna*-Fronds vorgenommen werden und anschließend eine Übertragung in ein frisches Medium erfolgen (siehe Anhang 2). In diesem Fall sollte die verbleibende verunreinigte Kultur verworfen werden.

Mindestens sieben Tage vor Durchführung der Tests wird eine hinreichende Anzahl an Kolonien keimfrei in ein frisches steriles Medium gebracht und 7-10 Tage bei Testbedingungen kultiviert.

1.7.4. **Prüfmedium**

Für *Lemna minor* und *Lemna gibba* werden jeweils die im Folgenden genannten Medien empfohlen. Wenn angenommen wird, dass das Medium mit der Prüfsubstanz reagieren und die Toxizitätswirkung beeinflussen könnte, ist sorgfältig zu prüfen, ob eine pH-Pufferlösung zum Prüfmedium gegeben werden sollte (beim *L. minor*-Medium MOPS (4-Morpholinpropan-Sulfonsäure, CAS-Nr: 1132-61-2; EINECS-Nr: 214-478-5) und beim *L. gibba*-Medium $NaHCO_3$). Das Steinberg-Medium (12) ist ebenfalls annehmbar, wenn die Validitätskriterien erfüllt werden.

▼M1

Zur Kultivierung von *L. minor* und für Tests mit *L. minor* wird eine Modifizierung des SIS-*Lemna*-Nährmediums (SIS = schwedisches Standardmedium) empfohlen. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist Anlage 3 zu entnehmen.

Zur Kultivierung von *L. gibba* und für Tests mit *L. gibba* wird das Nährmedium 20X — AAP (siehe Anlage 3) empfohlen.

Das in Anlage 3 beschriebene Steinberg-Medium ist für *L. minor* ebenfalls geeignet, kann aber auch für *L. gibba* verwendet werden, wenn die Validitätskriterien erfüllt sind.

1.7.5. **Testlösungen**

Die Testlösungen werden gewöhnlich durch Verdünnung einer Stammlösung hergestellt. Zum Herstellen von Stammlösungen der Prüfsubstanz wird die Substanz im Allgemeinen im Nährmedium gelöst.

Die höchste getestete Konzentration der Prüfsubstanz sollte in der Regel die Wasserlöslichkeit der Substanz bei den jeweiligen Testbedingungen nicht überschreiten. Allerdings wird darauf hingewiesen, dass *Lemna* spp. auf der Oberfläche treiben und Substanzen ausgesetzt werden könnten, die sich am Übergang zwischen Wasser und Umgebungsluft sammeln (z. B. schlecht wasserlösliche oder hydrophobe Substanzen oder oberflächenaktive Wirkstoffe). Unter diesen Umständen besteht eine Belastung durch nicht in der Lösung enthaltene Materialien, und die Testkonzentrationen können je nach den Merkmalen der Prüfsubstanz die Wasserlöslichkeit überschreiten. Bei Prüfsubstanzen mit geringerer Wasserlöslichkeit muss unter Umständen mit einem organischen Lösungsmittel oder einem Dispergiermittel eine konzentrierte Stammlösung oder eine Dispersion der Substanz hergestellt werden, damit leichter die exakten Mengen der Prüfsubstanz zum Prüfmedium hinzugegeben werden können und damit die Dispergierung und die Auflösung der Substanz begünstigt wird. Es sollte unbedingt versucht werden, die Verwendung dieser Materialien zu vermeiden. Infolge der Verwendung unterstützender Lösungsmittel oder Dispergiermittel sollte keine Phytotoxizität entstehen. Häufig verwendete Lösungsmittel, die bei Konzentrationen bis zu 100 $\mu l \cdot l^{-1}$ keine phototoxische Wirkung haben, sind z. B. Aceton und Dimethylformamid. Wenn ein Lösungsmittel oder ein Dispergiermittel verwendet wird, sollte die Endkonzentration protokolliert und auf ein Minimum ($\leq$ 100 $\mu l \cdot l^{-1}$) beschränkt werden; alle behandelten Proben und die Kontrollproben sollten das Lösungsmittel bzw. das Dispergiermittel in derselben Konzentration enthalten. Weitere Informationen zur Verwendung von Dispergiermitteln sind Quelle (11) zu entnehmen.

1.7.6. **Test- und Kontrollgruppen**

Die vorherige Kenntnis der Toxizität der Prüfsubstanz für *Lemna* (z. B. aufgrund eines Tests zur Bereichsermittlung) erleichtert die Auswahl geeigneter Testkonzentrationen. Beim definitiven Toxizitätstest sollten in der Regel mindestens fünf Testkonzentrationen in geometrischen Reihen angeordnet sein. Der Trennfaktor zwischen den Testkonzentrationen sollte höchstens 3,2 betragen; bei flachen Konzentrations-Reaktionskurven kommen jedoch auch höhere Werte in Betracht. Die Verwendung von weniger als fünf Konzentrationen sollte begründet werden. Für jede Testkonzentration sollten mindestens drei Wiederholungen verwendet werden.

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

▼M1

— Um ein angemessenes Konfidenzintervall sicherzustellen, sollten bei der Bestimmung eines $EC_x$-Wertes die Testkonzentrationen so gewählt werden, dass der $EC_x$-Wert abgedeckt ist. Bei der Schätzung von $EC_{50}$ beispielsweise sollte die höchste Testkonzentration größer als $EC_{50}$ sein. Wenn der $EC_{50}$-Wert außerhalb des Testkonzentrationsbereichs liegt, sind die entsprechenden Konfidenzintervalle groß, und eine angemessene Bewertung der statistischen Eignung des Modells ist unter Umständen nicht möglich.

— Wenn die LOEC oder die NOEC bestimmt werden sollen, sollte die niedrigste Testkonzentration so gering sein, dass das Wachstum nicht signifikant kleiner als das Wachstum der Kontrollgruppe ist. Außerdem sollte die höchste Testkonzentration so hoch sein, dass das Wachstum signifikant geringer ist als das Wachstum der Kontrollgruppe. Ansonsten muss der Test mit einem anderen Konzentrationsbereich wiederholt werden (wenn die höchste Konzentration nicht an der Löslichkeitsgrenze bzw. bei der höchstens erforderlichen Grenzkonzentration [z. B. 100 mg · $l^{-1}$) liegt].

Die Tests sollten jeweils Kontrollen beinhalten, bei denen dasselbe Nährmedium, dieselbe Anzahl an Fronds und Kolonien und die gleichen Umgebungsbedingungen und Verfahren wie in den Prüfgefäßen gegeben sind und nur die Prüfsubstanz fehlt. Wenn ein zusätzliches Lösungsmittel oder Dispergiermittel verwendet wird, sollte eine zusätzliche Kontrollbehandlung mit dem Lösungsmittel/-Dispergiermittel erfolgen, das in derselben Konzentration wie in den Gefäßen mit der Prüfsubstanz vorliegt. Die Anzahl der Kontrollgefäße zur Durchführung von Wiederholungen (sowie ggf. der Lösungsmittelgefäße) sollte mindestens identisch mit der Anzahl der für die verschiedenen Testkonzentrationen verwendeten Gefäße sein; im Idealfall sollten sogar doppelt so viele Gefäße verwendet werden.

Wenn die NOEC nicht bestimmt werden muss, kann das Prüfprotokoll geändert werden, indem die Anzahl der Konzentrationen erhöht und die Anzahl der Wiederholungen verringert wird. Zur Kontrolle sollten mindestens drei Wiederholungen durchgeführt werden.

1.7.7. **Exposition**

Kolonien mit zwei bis vier sichtbaren Fronds werden unter keimfreien Bedingungen aus der Impfkultur übertragen und zufällig den Prüfgefäßen zugewiesen. Die Prüfgefäße sollten jeweils insgesamt neun bis zwölf Fronds enthalten. Die Anzahl der Fronds und Kolonien sollte in allen Prüfgefäßen jeweils identisch sein. Erfahrungen mit dieser Methode sowie Daten aus Ringtests haben gezeigt, dass drei Wiederholungen pro Behandlung und pro Wiederholung anfänglich neun bis zwölf Fronds hinreichend sind, um Unterschiede hinsichtlich der Wachstumshemmungen in der Größenordnung von ca. 4 bis 7 % aufgrund der Wachstumsrate (pro Zellertrag 10 bis 15 % berechnet) zwischen den Behandlungen feststellen zu können (10).

Die Prüfgefäße müssen randomisiert im Inkubator angeordnet werden, um die Auswirkungen räumlich unterschiedlicher Lichtintensitäten und Temperaturen zu minimieren. Außerdem sind eine blockweise Anordnung oder ein zufälliges Einsetzen der Gefäße während der Durchführung der Messungen (oder noch häufiger) erforderlich.

▼M1

Wenn aufgrund eines vorläufigen Stabilitätstests anzunehmen ist, dass die Prüfsubstanzkonzentration während der Testdauer (7 Tage) nicht 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 Kolonien während der Testdauer mindestens zweimal (z. B. an den Tagen 3 und 5) frisch hergestellten Test- und Kontrolllösungen ausgesetzt werden. Wie häufig die Lösungen dem frischen Medium ausgesetzt werden, hängt von der Stabilität der Prüfsubstanz ab. Bei sehr instabilen oder flüchtigen Substanzen ist unter Umständen eine häufigere Exposition erforderlich, um die Konzentrationen annähernd konstant zu halten. Unter gewissen Umständen kann auch die Durchführung eines Durchflusstests erforderlich sein (11)(13).

Das Expositionsszenario beim Besprühen wird in dieser Prüfmethode nicht berücksichtigt; diesbezüglich wird auf Quelle (14) verwiesen.

1.7.8. **Inkubationsbedingungen**

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

Die Temperatur der Prüfgefäße sollte 24 ± 2 °C betragen. 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 jedoch dann nicht ungültig, wenn nachgewiesen werden kann, dass die Validitätskriterien erfüllt sind. Erhöhte Sorgfalt ist bei der Beurteilung von Verschiebungen des pH-Wertes in Sonderfällen geboten (z. B. beim Testen instabiler Substanzen oder beim Testen von Metallen). Weitere Informationen in diesem Zusammenhang sind Quelle (11) zu entnehmen.

1.7.9. **Dauer**

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

1.7.10. **Messungen und analytische Bestimmungen**

Bei Beginn des Tests wird die Anzahl der in den Prüfgefäßen enthaltenen Fronds ermittelt und protokolliert; zu zählen sind alle herausragenden, deutlich erkennbaren Fronds. Die Anzahl der normal oder anomal aussehenden Fronds ist bei Beginn des Tests, alle drei Tage während der Expositionsdauer (d. h. binnen des Zeitraums von sieben Tagen mindestens zweimal) und am Ende des Tests zu bestimmen. Änderungen in der Entwicklung der Pflanzen (z. B. Änderungen der Größe oder des Aussehens der Fronds, Anzeichen für eine Nekrose, Chlorose oder Aufwölbungen, das Aufbrechen von Kolonien oder der Verlust der Schwimmfähigkeit sowie Veränderungen der Wurzellänge oder der sonstigen Beschaffenheit der Wurzeln) sind zu protokollieren. Wesentliche Merkmale des Prüfmediums (z. B. Vorliegen nicht gelösten Materials oder Algenwachstum im Prüfgefäß) sollten ebenfalls verzeichnet werden.

▼M1

Ergänzend zur Ermittlung der Frondzahl während des Tests sind auch die Auswirkungen der Prüfsubstanz auf eine (oder mehrere) der folgenden Messvariablen zu bewerten:

i) Gesamtfläche der Fronds,

ii) Trockengewicht,

iii) Frischgewicht.

Die Gesamtfläche der Fronds hat den Vorteil, dass sie für jedes einzelne Prüfgefäß und für jedes einzelne Kontrollgefäß jeweils bei Beginn des Tests, während der Durchführung des Tests und am Ende des Tests bestimmt werden kann. Das Trockengewicht und das Frischgewicht sollten bei Beginn des Tests an einer Probe der Impfkultur ermittelt werden, die typisch für das bei Beginn des Tests verwendete Material ist; eine weitere Feststellung sollte am Ende des Tests anhand des Pflanzenmaterials jeweils aus den Prüfgefäßen und aus den Kontrollgefäßen erfolgen. Wenn die Frondfläche nicht gemessen wird, sollte eher das Trockengewicht als das Frischgewicht ermittelt werden.

Die Gesamtfläche der Fronds, das Trockengewicht und das Frischgewicht können wie folgt bestimmt werden:

i) *Gesamtfläche der Fronds*: Die Gesamtfläche der Fronds aller Kolonien kann durch Bildanalyse ermittelt werden. Eine Silhouette des Prüfgefäßes und der Pflanzen kann mit einer Videokamera erfasst werden; dazu wird das Gefäß auf einen Leuchtkasten gebracht und das dort aufgenommene Bild anschließend digitalisiert. Durch die Kalibrierung mit flachen Verläufen bekannter Flächen kann dann die Gesamtfläche der Fronds im Prüfgefäß bestimmt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass Störungen durch den Rand des Prüfgefäßes ausgeschlossen werden. Ein alternatives, aber aufwändigeres Verfahren besteht darin, dass Prüfgefäße und Pflanzen fotokopiert und die entsprechenden Silhouetten der Kolonien ausgeschnitten werden; anschließend wird die jeweilige Fläche mit einem Blattflächen-Analysator oder mit Millimeterpapier bestimmt. Geeignet sind unter Umständen aber auch andere Verfahren (z. B. die Ermittlung des Papiergewicht-Verhältnisses zwischen der Fläche der Kolonie-Silhouette und der Fläche der jeweils zugrunde gelegten Einheit).

ii) *Trockengewicht*: Alle Kolonien werden jeweils aus den Prüfgefäßen entnommen und mit destilliertem oder entionisiertem Wasser gespült. Durch anschließendes Ablöschen wird überschüssiges Wasser entfernt; danach werden die Proben bei 60 °C auf ein konstantes Gewicht getrocknet. Wurzelreste sollten einbezogen werden. Das Trockengewicht sollte mit einer Genauigkeit von mindestens 0,1 mg angegeben werden.

iii) *Frischgewicht*: Alle Kolonien werden in zuvor gewogene Röhrchen aus Polystyrol (oder einem sonstigen inerten Material) mit feinen Löchern (1 mm) im gerundeten Boden eingebracht. Anschließend werden die Röhrchen bei Raumtemperatur 10 Minuten mit 3 000 Umdrehungen/min. zentrifugiert. Die Röhrchen mit den nun getrockneten Kolonien werden nun noch einmal gewogen; danach wird das Frischgewicht durch Subtraktion des Gewichts der leeren Röhrchen bestimmt.

1.7.10.1. *Häufigkeit der Messungen und der analytischen Bestimmungen*

Bei statischen Tests sollte jeweils bei Beginn des Tests und am Ende des Tests der pH-Wert der behandelten Lösungen gemessen werden. Bei semistatischen Tests sollte für alle Batches der „frischen“ Testlösung jeweils vor den Erneuerungen der pH-Wert ermittelt werden; außerdem sollte der pH-Wert der „verbrauchten“ Lösungen bestimmt werden.

▼M1

Die Lichtintensität sollte in der Wachstumskammer, im Inkubator oder im jeweiligen Raum in dem Abstand von der Lichtquelle gemessen werden, der auch für die *Lemna*-Fronds gegeben ist. Während des Tests sollte mindestens eine Messung vorgenommen werden. Die Temperatur des Mediums in einem Surrogatgefäß, das Bedingungen ausgesetzt wird, die in der Wachstumskammer bzw. im Inkubator oder im jeweiligen Raum gegeben sind, sollte mindestens täglich protokolliert werden.

Während des Tests wird die Konzentration der Prüfsubstanz in geeigneten Intervallen bestimmt. Bei statischen Tests ist die Konzentration mindestens bei Beginn des Tests und am Ende des Tests zu ermitteln.

Bei semistatischen Tests, bei denen davon ausgegangen wird, dass die Konzentration der Prüfsubstanz nicht im Bereich von 20 % der Nennkonzentration aufrechterhalten werden kann, müssen alle frisch hergestellten Testlösungen sowie alle Lösungen jeweils nach einer Erneuerung analysiert werden (siehe Abschnitt 1.7.7 Absatz 3). Bei Tests, bei denen die gemessene Ausgangskonzentration der Prüfsubstanz zwar nicht im Bereich von 20 % der Nennkonzentration liegt, bei denen jedoch 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 bei der niedrigsten Konzentration erforderlich. In jedem Fall brauchen die Prüfsubstanzkonzentrationen für alle Testkonzentrationen vor der Erneuerung jeweils nur bei einer einzigen Wiederholung (bzw. bei Gefäßen mit zusammengefassten Wiederholungen jeweils bei nur einem Gefäß) erneut bestimmt zu werden.

Bei Durchflusstests ist ähnlich zu verfahren, wie bei den semistatischen Tests, d. h. Analysen sind jeweils bei Beginn des Tests, während des Tests und am Ende des Tests durchzuführen; Messungen der „verbrauchten“ Lösungen sind jedoch nicht erforderlich. Bei diesem Testtyp sollten der Durchfluss des Verdünnungsmittels und der Prüfsubstanz-Stammlösung täglich geprüft werden.

Wenn nachgewiesen wird, dass die Konzentration der Prüfsubstanz während der gesamten Testdauer in befriedigender Weise im Bereich von 20 % der Nennkonzentration oder der gemessenen Ausgangskonzentration aufrechterhalten werden konnte, können die Ergebnisse auch ausgehend von den Nennwerten bzw. von den gemessenen Ausgangswerten durchgeführt werden. Beträgt die Abweichung von der Nennkonzentration oder von der gemessenen Ausgangskonzentration mehr als 20 %, sollte bei der Analyse der Ergebnisse von der geometrischen mittleren Konzentration während der Expositionsdauer oder von Modellen ausgegangen werden, die den Rückgang der Prüfsubstanzkonzentration beschreiben (11).

1.7.11. **Limit-Test**

Unter gewissen Umständen, z. B. wenn ein vorläufiger Test darauf hindeutet, dass die Prüfsubstanz bei Konzentrationen bis zu 100 mg · $l^{-1}$ bzw. bis zur Löslichkeitsgrenze im Prüfmedium (maßgeblich ist die jeweils niedrigere Konzentration) keine toxische Wirkung hat, kann ein Limit-Test durchgeführt werden, in dem die Reaktionen einer Kontrollgruppe und einer Behandlungsgruppe (100 mg · $l^{-1}$ bzw. eine mit der Löslichkeitsgrenze identische Konzentration) verglichen werden. Es wird nachdrücklich empfohlen, diese Tests durch Analysen der Expositionskonzentration zu verifizieren. Alle oben beschriebenen Testbedingungen und Validitätskriterien beziehen sich auf einen Limit-Test; allerdings sollte die Anzahl der behandelten Wiederholungen 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-Test).

▼M1

2. **DATEN UND ABSCHLUSSBERICHT**

2.1. VERDOPPLUNGSZEIT

Um die Dauer bis zur Verdopplung der Frondzahl ($T_d$) zu bestimmen und um sicherzustellen, dass dieses Validitätskriterium von der Studie erfüllt wird (siehe Abschnitt 1.6), ist mit den Daten der Kontrollgefäße die folgende Gleichung zu berechnen:

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

Dabei steht $\mu$ für die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate, die bestimmt wurde, wie in Abschnitt 2.2.1 in Absatz 2 beschrieben.

2.2. REAKTIONSVARIABLEN

Mit der Prüfung sollen die Auswirkungen der Prüfsubstanz auf das vegetative Wachstum von *Lemna* bestimmt werden. Diese Prüfmethode beschreibt zwei Reaktionsvariablen, da in den Mitgliedsländern unterschiedliche Präferenzen und rechtliche Anforderungen bestehen. Damit die Testergebnisse in allen Mitgliedsländern anerkannt werden können, sollten die Auswirkungen mit Hilfe der beiden im Folgenden beschriebenen Reaktionsvariablen a) und b) beurteilt werden.

a) Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate: Diese Reaktionsvariable wird aufgrund von Veränderungen der Frondzahlen-Logarithmen sowie ausgehend von den Veränderungen der Logarithmen sonstiger Messparameter der Kontrollen und der einzelnen Behandlungsgruppen (gesamte Frondfläche, Trockengewicht oder Frischgewicht) während eines bestimmten Zeitraums (jeweils pro Tag ausgedrückt) berechnet. Gelegentlich wird diese Wachstumsrate auch als relative Wachstumsrate bezeichnet (15).

b) Zellertrag: Diese Reaktionsvariable wird ausgehend von Änderungen der Frondzahl sowie aufgrund von Änderungen anderer Messparameter der Kontrollen und der einzelnen Behandlungsgruppen (gesamte Frondfläche, Trockengewicht oder Frischgewicht) bis zum Ende der Testdauer berechnet.

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

▼M1

Toxizitätsschätzungen sollten auf der Frondzahl sowie auf einer weiteren Messvariablen (gesamte Frondfläche, Trockengewicht oder Frischgewicht) beruhen, da sich manche Substanzen erheblich stärker auf andere Messvariablen auswirken können als die Frondzahl. Diese Auswirkungen würden nicht festgestellt, wenn ausschließlich die Frondzahl berechnet würde.

Die Anzahl der Fronds sowie alle sonstigen protokollierten Messvariablen (gesamte Frondfläche, Trockengewicht oder Frischgewicht) werden zusammen mit den Konzentrationen der Prüfsubstanz für jede Messung tabellarisch zusammengestellt. Anschließende Datenanalysen z. B. zur Schätzung von LOEC-, NOEC- oder $EC_x$-Werten sollten auf den Werten der einzelnen Wiederholungen, nicht aber auf berechneten Mittelwerten der einzelnen Behandlungsgruppen beruhen.

2.2.1. **Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate**

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

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

wobei

— $\mu_{i-j}$: 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 sowie die Varianzschätzungen zu berechnen.

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

▼M1

Die Hemmung der Wachstumsrate in Prozent ($I_r$) kann anschließend für jede Testkonzentration (Behandlungsgruppe) nach der folgenden Formel berechnet werden:

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

wobei

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

— $\mu_C$: Mittelwert für μ der Kontrollgruppe

— $\mu_T$: Mittelwert für μ der Behandlungsgruppe

2.2.2. **Zellertrag**

Die Auswirkungen auf den Zellertrag werden ausgehend von zwei Messvariablen, d. h. der Frondzahl und einer sonstigen Messvariablen (der gesamten Frondfläche, dem Trockengewicht oder dem Frischgewicht) der jeweiligen Prüfgefäße am Anfang und am Ende des Tests bestimmt. Für das Trockengewicht und das Frischgewicht wird die Ausgangsbiomasse ausgehend von einer Frond-Probe aus dem betreffenden Batch bestimmt, aus der die Prüfgefäße geimpft wurden (siehe Abschnitt 1.7.3 Absatz 2). Für die Testkonzentrationen und für die Kontrolllösungen ist jeweils ein mittlerer Zellertrag zu berechnen; die Varianzen sind jeweils zu schätzen. Die prozentuale Hemmung des Zellertrags (% $I_y$) kann für die Behandlungsgruppen wie folgt berechnet werden:

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

wobei

— % $I_y$: Verringerung des Zellertrags in Prozent,

— $b_C$: Biomasse am Ende des Tests abzüglich der Biomasse der Kontrollgruppe am Anfang des Tests,

— $b_T$: Biomasse am Ende des Tests abzüglich der Biomasse der Behandlungsgruppe am Anfang des Tests.

2.2.3. **Darstellung der Konzentrations-Reaktionskurven**

Die Konzentrations-Reaktionskurven der mittleren Hemmung der Reaktionsvariablen in Prozent ($I_r$ bzw. $I_y$ berechnet gemäß der Anweisung im letzten Absatz in Abschnitt 2.2.1 bzw. gemäß der Anweisung in Abschnitt 2.2.2) und die logarithmische Konzentration der Prüfsubstanz sollten grafisch dargestellt werden.

2.2.4. **Schätzung von $EC_x$**

Schätzungen der $EC_x$-Werte (z. B. $EC_{50}$) 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 Frondzahl und von einer weiteren Messvariablen (gesamte Frondfläche, Trockengewicht oder Frischgewicht) ausgehen, weil sich manche Prüfsubstanzen in besonderer Weise auf die Frondzahl und sonstige Messvariablen auswirken. Die gewünschten Toxizitätsparameter bestehen entsprechend aus vier $EC_x$-Werten für alle berechneten Hemmkonzentrationen x: $E_rC_x$ (Frondzahl), $E_rC_x$ (gesamte Frondfläche, Trockengewicht oder Frischgewicht), $E_yC_x$ (Frondzahl), und $E_yC_x$ (gesamte Frondfläche, Trockengewicht oder Frischgewicht).

▼M1

2.3. STATISTISCHE VERFAHREN

Ziel ist die Ermittlung einer quantitativen Konzentrations-Reaktionsbeziehung durch Regressionsanalyse. Im Anschluss an eine linearisierte Transformation der Reaktionsdaten (z. B. in Einheiten nach dem Probit-, Logit- oder Weibull-Modell) (16) kann eine gewichtete lineare Regression vorgenommen werden; nicht-lineare Regressionsverfahren, mit denen die unvermeidlichen Unregelmäßigkeiten der Daten und Abweichungen von gleichförmigen Verteilungen besser verarbeitet werden können, werden jedoch bevorzugt. Gegen null bzw. gegen die vollständige Hemmung können diese Unregelmäßigkeiten durch die Transformation vergrößert werden und die Analyse beeinträchtigen (16). Es wird darauf hingewiesen, dass Standard-Analysmethoden mit Probit-, Logit- oder Weibull-Transformationen für quantitative Daten (z. B. Mortalität oder Überlebensraten) vorgesehen sind und zur Verwendung in Verbindung mit Wachstums- oder Zellertragsdaten entsprechend modifiziert werden müssen. Spezifische Verfahren zur Bestimmung von $EC_x$-Werten aus kontinuierlichen Daten sind den Quellen (17), (18) und (19) zu entnehmen.

Für jede zu analysierende Reaktionsvariable sind aufgrund der Konzentrations-Reaktionsbeziehung Punktschätzungen für die $EC_x$-Werte zu ermitteln. Nach Möglichkeit sollten für jede Schätzung die 95%-Konfidenzintervalle bestimmt werden. Die Qualität der Übereinstimmung der Reaktionsdaten mit dem Regressionsmodell sollte grafisch oder statistisch bewertet werden. Die Regressionsanalyse sollte mit den Reaktionen der einzelnen Wiederholungen (und nicht mit den Mittelwerten der Behandlungsgruppe) durchgeführt werden.

Schätzwerte für $EC_{50}$ und für die Konfidenzintervalle können auch durch lineare Interpolation mit einem Bootstrapping-Algorithmus (20) erzielt werden, wenn die verfügbaren Regressionsmodelle/-methoden für die betreffenden Daten nicht geeignet sind.

Für eine Schätzung der LOEC und entsprechend auch der NOEC müssen die Mittelwerte der behandelten Lösungen durch Varianzanalyseverfahren (ANOVA) verglichen werden. Der Mittelwert der einzelnen Konzentrationen ist dann mit einer geeigneten Methode zur Durchführung von Mehrfachvergleichen bzw. zur Durchführung von Trendtests mit dem Mittelwert der Kontrollgruppe zu vergleichen. Dunnett- und Williams-Tests können hilfreich sein (21)(22)(23)(24). 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 (25). Geeignet sind Levene- und Bartlett-Tests. Wenn die Annahme der Varianzhomogenität nicht erfüllt ist, kann gelegentlich eine Korrektur durch logarithmische Datentransformation erfolgen. Bei außerordentlicher Varianzheterogenität, die durch Transformation nicht korrigiert werden kann, sollten Analysen durch Methoden wie z. B. Jonckheere-Trendtests (Stepdown) erwogen werden. Weitere Hinweise zur Bestimmung von NOEC-Werten sind Quelle (19) zu entnehmen.

Aufgrund neuer Forschungsergebnisse wird empfohlen, das Konzept der NOEC aufzugeben und durch Punktschätzungen von $EC_x$-Werten zu ersetzen, die durch Regression ermittelt wurden. Für diesen *Lemna*-Test wurde noch kein geeigneter Wert für x definiert. Ein Bereich von 10 bis 20 % scheint jedoch geeignet (abhängig von der auswählten Reaktionsvariablen); vorzugsweise sollten sowohl $EC_{10}$ als auch $EC_{20}$ protokolliert werden.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muss folgende Informationen enthalten:

Prüfsubstanz:

— physikalische Beschaffenheit und physikalisch-chemische Merkmale einschließlich der Wasserlöslichkeitsgrenze,

▼M1

— chemische Kenndaten (z. B. CAS-Nummer) einschließlich der Reinheit.

Im Test verwendete Art:

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

Prüfbedingungen:

— verwendetes Testverfahren (statisch, semistatisch oder Durchfluss),

— Datum des Testbeginns und Dauer des Tests,

— Prüfmedium,

— Beschreibung des Prüfprotokolls: Prüfgefäße und Abdeckungen, Lösungsvolumina, Anzahl der Kolonien und Fronds pro Prüfgefäß am Anfang des Tests,

— Testkonzentrationen (Nennkonzentrationen bzw. gemessene Konzentrationen) und Anzahl der Wiederholungen 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,

— Prüfsubstanzkonzentrationen und Analysemethode mit geeigneten Daten zur Qualitätsbewertung (Validierungsstudien, Standardabweichungen oder Konfidenzintervalle der Analysen),

— Methoden zur Bestimmung der Frondzahl und sonstiger Messvariablen (z. B. Trockengewicht, Frischgewicht oder Frondfläche),

— sämtliche Abweichungen von dieser Prüfmethode.

Ergebnisse:

— Ausgangsdaten: Anzahl der Fronds und sonstige Messvariablen der einzelnen Prüfgefäße und der Kontrollgefäße jeweils bei einer Beobachtung und Analyse,

— Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Messvariablen,

— Wachstumskurven bei den verschiedenen Konzentrationen (möglichst mit logarithmisch transformierter Messvariable, siehe Abschnitt 2.2.1 Absatz 2),

— Verdopplungszeit/Wachstumsrate in der Kontrolllösung bezogen auf die Frondzahl,

— berechnete Reaktionsvariablen für alle behandelten Wiederholungen mit Mittelwerten und dem Variationskoeffizienten für Wiederholungen,

— grafische Darstellung der Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung,

— Schätzungen der Endpunkte der Toxizität für die verschiedenen Reaktionsvariablen (z. B. $EC_{50}$, $EC_{10}$ und $EC_{20}$) und entsprechende Konfidenzintervalle; wenn berechnet, sind die LOEC und/oder die NOEC sowie die zur jeweiligen Berechnung verwendeten statistischen Methoden anzugeben,

▼M1

— bei Durchführung von Varianzanalysen (ANOVA) der Umfang der nachzuweisenden Auswirkungen (z. B. geringster signifikanter Unterschied),

— jegliche in behandelten Proben festgestellte Wachstumsstimulation,

— alle offensichtlichen Anzeichen einer Phytotoxizität sowie Beobachtungen an den Testlösungen,

— Diskussion der Ergebnisse einschließlich aller Auswirkungen auf das Testergebnis, die auf Abweichungen von dieser Prüfmethode zurückzuführen sind.

4. **LITERATUR**


1. OECD TG 221 (2006) *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test.

2. Die Nutzung von *Lemna*-Studien für kolorierte Substanzen ist in Abschnitt 13.5.3 des EU-Handbuchs für Entscheidungen/ Beschlüsse vom Juli 2006 ausgeführt: http://ecb.jrc.ec.europa.eu/ new-chemicals.

3. Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Kapitel R.7b: Endpoint specific guidance; Tabelle 7.8.3: Summary of difficult substance testing issues, verfügbar unter

   http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/ information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

4. ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). S. 733-742. Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

5. USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96-156. 8pp.

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

7. SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 S. (Schwedisch).

8. Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37-120 S.

9. Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

10. Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

11. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

12. ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

▼**M1**

13. Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor L.*). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

14. Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia 118/119, S. 353-359.

15. Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry 12, S. 481-483.

16. Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, S. 713-718.

17. Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, S. 157-167.

18. Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, S. 1485-1494.

19. OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

20. Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

21. Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50, S. 1096-1121.

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

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

24. Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, S. 510-531.

25. Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research 29, S. 93-96.

▼M1

*Anlage 1*

**Beschreibung Lemna spp.**

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

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

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

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

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

*Lemna minor*: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft". EPA 712-C-96-156. 8pp.

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

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 S. (Schwedisch).

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

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

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

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

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

▼M1

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

**Bezugsquellen für Lemna-Arten**

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

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
United States
Telefon 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE -106 91 Stockholm
Schweden
Tel: +46 8 674 7240
+46 8 674 7636
Umweltbundesamt (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Deutschland
E-Mail: Lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

**Literatur**

1. Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review 27 S. 221-287.

2. Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

3. Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

4. Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B 11, S. 1-14.

5. Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52, S. 7-22.

▼M1

*Anlage 2*

**Haltung der Stammkultur**

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

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

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

▼M1

*Anlage 3*

**Medien**

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

**Schwedisches Standard-*Lemna*-Nährmedium (SIS)**

— Die Stammlösungen I-V werden durch Autoklavieren (120 °C, 15 Minuten) oder durch Membranfiltration (Porengröße ca. 0,2 μm) sterilisiert.

— Die Stammlösung VI (sowie optional Stammlösung VII) ist ausschließlich durch Membranfiltration zu sterilisieren; diese Lösungen sollten nicht autoklaviert werden.

— Sterile Stammlösungen sollten kühl und dunkel gelagert werden. Die Stammlösungen I-V sollten nach sechs Monaten entsorgt werden; die Stammlösung VI (sowie optional Stammlösung VII) kann einen Monat gelagert werden.

| Stammlösung Nr. | Substanz | Konzentration in der Stammlösung ($g \cdot l^{-1}$) | Konzentration im hergestellten Medium ($mg \cdot l^{-1}$) | Hergestelltes Medium | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Element | Konzentration ($mg \cdot l^{-1}$) |
| I | $NaNO_3$ | 8,50 | 85 | Na; N | 32; 14 |
| | $KH_2PO4$ | 1,34 | 13,4 | K; P | 6,0; 2,4 |
| II | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 15 | 75 | Mg; S | 7,4; 9,8 |
| III | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 7,2 | 36 | Ca; Cl | 9,8; 17,5 |
| IV | $Na_2CO_3$ | 4,0 | 20 | C | 2,3 |
| V | $H_3BO_3$ | 1,0 | 1,00 | B | 0,17 |
| | $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 0,20 | 0,20 | Mn | 0,056 |
| | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0,010 | 0,010 | Mo | 0,0040 |
| | $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,050 | 0,050 | Zn | 0,011 |
| | $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,0050 | 0,0050 | Cu | 0,0013 |
| | $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ | 0,010 | 0,010 | Co | 0,0020 |
| VI | $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0,17 | 0,84 | Fe | 0,17 |
| | $Na_2$-EDTA$\cdot 2H_2O$ | 0,28 | 1,4 | — | — |
| VII | MOPS (Puffer) | 490 | 490 | — | — |

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

— 10 ml Stammlösung I

— 5 ml Stammlösung II

— 5 ml Stammlösung III

— 5 ml Stammlösung IV

▼M1

— 1 ml Stammlösung V

— 5 ml Stammlösung VI

— 1 ml Stammlösung VII (optional)

*Hinweis:* Bei bestimmten Prüfsubstanzen kann eine weitere Stammlösung VII (MOPS-Pufferlösung) erforderlich sein (siehe Abschnitt 1.4 letzter Absatz).

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

**Nährmedium 20X AAP**

Die Stammlösungen werden in sterilem destilliertem oder entionisiertem Wasser hergestellt.

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

Für das Medium 20X AAP werden fünf Stamm-Nährlösungen (A1, A2, A3, B und C) hergestellt; dabei sind chemische Stoffe mit Reagenzienqualität zu verwenden. Jeweils 20 ml der Stamm-Nährlösungen werden zu etwa 850 ml entionisiertem Wasser hinzugegeben, um das Nährmedium herzustellen. Der pH-Wert wird wahlweise mit 0,1 oder 1 mol HCl oder NaOH auf 7,5 ± 0,1 eingestellt; durch Hinzugabe von entionisiertem Wasser wird ein Volumen von einem Liter hergestellt. Anschließend wird das Medium durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von (etwa) 0,2 µm in einen sterilen Behälter gefiltert.

Das für die Prüfung vorgesehene Nährmedium sollte 1-2 Tage vor der Verwendung hergestellt werden, damit sich der pH-Wert stabilisieren kann. Der pH-Wert des Nährmediums sollte vor der Verwendung geprüft und ggf. durch Zugabe von 0,1 oder 1 M NaOH oder HCl wie oben beschrieben korrigiert werden.

| Stammlösung Nr. | Substanz | Konzentration in der Stammlösung ($g \cdot l^{-1}$) (*) | Konzentration im hergestellten Medium ($mg \cdot l^{-1}$) (*) | Hergestelltes Medium | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Element | Konzentration ($mg \cdot l^{-1}$) (*) |
| A1 | $NaNO_3$ | 26 | 510 | Na; N | 190; 84 |
| | $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 12 | 240 | Mg | 58,08 |
| | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 4,4 | 90 | Ca | 24.04 |
| A2 | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 15 | 290 | S | 38,22 |
| A3 | $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ | 1,4 | 30 | K; P | 9,4;3,7 |
| B | $H_3BO_3$ | 0,19 | 3,7 | B | 0,65 |
| | $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 0,42 | 8,3 | Mn | 2,3 |
| | $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0,16 | 3,2 | Fe | 0,66 |
| | $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 0,30 | 6,0 | — | — |
| | $ZnCl_2$ | 3,3 $mg \cdot l^{-1}$ | 66 $\mu g \cdot l^{-1}$ | Zn | 31 $\mu g \cdot l^{-1}$ |
| | $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1,4 $mg \cdot l^{-1}$ | 29 $\mu g \cdot l^{-1}$ | Co | 7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$ |
| | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 7,3 $mg \cdot l^{-1}$ | 145 $\mu g \cdot l^{-1}$ | Mo | 58 $\mu g \cdot l^{-1}$ |
| | $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,012 $mg \cdot l^{-1}$ | 0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$ | Cu | 0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$ |
| C | $NaHCO_3$ | 15 | 300 | Na; C | 220; 43 |

(*) Wenn nicht anders angegeben.

▼M1

Fußnote: Die theoretisch geeignete Bicarbonat-Endkonzentration (bei der eine nennenswerte Anpassung des pH-Werts nicht erforderlich ist) liegt bei 15 mg/l (und nicht bei 300 mg/l). Trotzdem wird das Medium 20X-AAP — auch im Ringtest dieser Methode — in einer Konzentration von 300 mg/l verwendet. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

**STEINBERG-Medium (nach ISO 20079)**

*Konzentrationen und Stammlösungen*

— Das modifizierte Steinberg-Medium ist in ISO 20079 nur für *Lemna minor* vorgesehen (da dort ausschließlich *Lemna minor* zugelassen wird); in Tests wurden gute Ergebnisse aber auch mit *Lemna gibba* erzielt.

— Bei der Herstellung des Mediums sollten chemische Stoffe in Reagenzien- oder Analysequalität und entionisiertes Wasser verwendet werden.

— Das Nährmedium ist aus Stammlösungen oder aus dem 10fach konzentrierten Medium herzustellen, damit ohne Ausfällungen eine größtmögliche Konzentration des Mediums erzielt werden kann.

*Tabelle 1*

**STEINBERG-Medium mit stabilisiertem pH-Wert (modifiziert nach Altenburger)**

| Substanz | | Nährmedium | |
|---|---|---|---|
| **Makroelemente** | Molmasse | mg/l | mmol/l |
| $KNO_3$ | 101,12 | 350,00 | 3,46 |
| $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ | 236,15 | 295,00 | 1,25 |
| $KH_2PO_4$ | 136,09 | 90,00 | 0,66 |
| $K_2HPO_4$ | 174,18 | 12,60 | 0,072 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 246,37 | 100,00 | 0,41 |
| **Mikroelemente** | Molmasse | µg/l | µmol/l |
| $H_3BO_3$ | 61,83 | 120,00 | 1,94 |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 287,43 | 180,00 | 0,63 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 241,92 | 44,00 | 0,18 |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 197,84 | 180,00 | 0,91 |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 270,21 | 760,00 | 2,81 |
| EDTA-Dinatrium-Dihydrat | 372,24 | 1 500,00 | 4,03 |

▼M1

*Tabelle 2*

**Stammlösungen (Makroelemente)**

| 1. **Makroelemente (50fach konzentriert)** | g/l |
|---|---|
| *Stammlösung 1:* | |
| $KNO_3$ | 17,50 |
| $KH_2PO_4$ | 4,5 |
| $K_2HPO_4$ | 0,63 |
| *Stammlösung 2:* | |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 5,00 |
| *Stammlösung 3:* | |
| $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ | 14,75 |

*Tabelle 3*

**Stammlösungen (Mikroelemente)**

| 2. **Mikroelemente (1 000fach konzentriert)** | mg/l |
|---|---|
| *Stammlösung 4:* | |
| $H_3BO_3$ | 120,0 |
| *Stammlösung 5:* | |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 180,0 |
| *Stammlösung 6:* | |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 44,0 |
| *Stammlösung 7:* | |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 180,0 |
| *Stammlösung 8:* | |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 760,00 |
| EDTA-Dinatrium-Dihydrat | 1 500,00 |

— Die Stammlösungen 2 und 3 sowie getrennt auch die Stammlösungen 4 bis 7 können zusammengefasst werden. (Dabei sind die jeweils erforderlichen Konzentrationen zu berücksichtigen.)

— Um die Lagerfähigkeit zu verlängern, sind die Stammlösungen 20 Minuten bei 121 °C zu autoklavieren oder einer Sterilfiltration (Porengröße 0,2 µm) zu unterziehen. Für die Stammlösung 8 wird eine Sterilfiltration (0,2 µm) nachdrücklich empfohlen.

**Herstellung der Endkonzentration des STEINBERG-Mediums (modifiziert)**

— 20 ml der Stammlösungen 1, 2 und 3 (siehe Tabelle 2) sind etwa 900 ml entionisiertes Wasser zuzugeben, um eine Ausfällung zu vermeiden.

— 1,0 ml der Stammlösungen 4, 5, 6, 7 und 8 werden hinzugegeben (siehe Tabelle 3).

— Der pH-Wert sollte auf 5,5 ± 0,2 eingestellt werden (durch Zugabe eines minimalen Volumens einer NaOH- oder HCl-Lösung).

▼**M1**

— Anschließend sind die Lösungen mit Wasser auf ein Volumen von 1 000 ml aufzufüllen.

— Wenn die Stammlösungen sterilisiert werden und geeignetes Wasser verwendet wird, ist eine weitere Sterilisierung nicht mehr erforderlich. Wird das endgültige Medium sterilisiert, sollte die Stammlösung 8 nach dem Autoklavieren (20 Minuten bei 121 °C) hinzugegeben werden.

**Herstellung des 10fach konzentrierten STEINBERG-Mediums (modifiziert) zur Zwischenlagerung**

— 20 ml der Stammlösungen 1, 2 und 3 (siehe Tabelle 2) sind etwa 30 ml entionisiertes Wasser zuzugeben, um eine Ausfällung zu vermeiden.

— 1,0 ml der Stammlösungen 4, 5, 6, 7 und 8 werden hinzugegeben (siehe Tabelle 3). Anschließend sind die Lösungen mit Wasser auf ein Volumen von 100 ml aufzufüllen.

— Wenn die Stammlösungen sterilisiert werden und geeignetes Wasser verwendet wird, ist eine weitere Sterilisierung nicht mehr erforderlich. Wird das endgültige Medium sterilisiert, sollte die Stammlösung 8 nach dem Autoklavieren (20 Minuten bei 121 °C) hinzugegeben werden.

— Der pH-Wert des Mediums sollte in der Endkonzentration 5,5 ± 0,2 betragen.

▼M4

## C.27 CHIRONOMIDEN-TOXIZITÄTSTEST IN SEDIMENT-WASSER-SYSTEMEN MIT GESPIKTEM SEDIMENT

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 218 (2004). Sie dient der Bewertung der Wirkung einer Langzeitexposition gegenüber Chemikalien auf die sedimentbewohnenden Larven von *Chironomus* sp., einem in Frischwasser lebenden Zweiflügler. Die Methode basiert auf bestehenden Protokollen für Toxizitätstests mit *Chironomus riparius* und *Chironomus tentans*, die in Europa (1)(2)(3) und Nordamerika (4)(5)(6)(7)(8) entwickelt und Ringtests (1)(6)(9) unterzogen wurden. Auch andere gut dokumentierte Chironomid-Arten wie *Chironomus yoshimatsui* (10)(11) sind geeignet.

2. Bei dem für diese Prüfmethode verwendeten Expositionsszenario wird das Sediment mit der Prüfsubstanz gespikt. Die Wahl des Szenarios hängt vom jeweiligen Testziel ab. Durch Dotieren (Spiken) des Sediments soll die Akkumulation von persistenten Chemikalien im Sediment simuliert werden. Dieser Vorgang erfolgt in einem Sediment-Wasser-System.

3. In der Regel haben die an sedimentbewohnenden Organismen zu testenden Substanzen eine lange Verweildauer in diesem Kompartiment. Sedimentbewohner können über verschiedene Wege exponiert werden. Die relative Bedeutung der einzelnen Expositionspfade und die Geschwindigkeit, mit der diese jeweils zu den gesamten toxischen Wirkungen beitragen, hängen von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der betreffenden Substanz ab. Für stark adsorbierende Substanzen (z. B. log $K_{ow}$ > 5) oder für kovalent an das Sediment gebundene Substanzen kann die Aufnahme von Schadstoffen über die Nahrung einen wichtigen Expositionspfad darstellen. Die Toxizität hoch lipophiler Substanzen sollte nicht unterschätzt werden, weshalb gegebenenfalls vor Applikation der Prüfsubstanz dem Sediment Futter hinzugegeben werden sollte. Um alle potenziellen Expositionspfade zu berücksichtigen, liegt der Schwerpunkt bei dieser Prüfmethode auf der Langzeitexposition. Die Testdauer beträgt 20 bis 28 Tage für *C. riparius* und *C. yoshimatsui* und 28 bis 65 Tage für *C. tentans*. Falls aus einem besonderen Grund, z. B. zur Untersuchung der Wirkungen von instabilen Chemikalien, Kurzzeitdaten benötigt werden, können nach dem 10. Versuchstag zusätzliche Replikate entnommen werden.

4. Als Endpunkte werden die Gesamtzahl der geschlüpften Imagines und die Emergenzzeit gemessen. Falls zusätzlich Kurzzeitdaten benötigt werden, sollten die Messungen der Überlebensrate und des Wachstums der Larven erst nach dem 10. Tag gegebenenfalls anhand zusätzlicher Replikate vorgenommen werden.

5. Es wird empfohlen, formuliertes Sediment zu verwenden, da es gegenüber natürlichen Sedimenten mehrere Vorteile hat:

   — Die Variabilität zwischen den Versuchen ist nicht so groß, da formuliertes Sediment eine reproduzierbare „standardisierte Matrix“ ergibt und es nicht erforderlich ist, Quellen für unkontaminiertes, sauberes Sediment ausfindig zu machen;

   — es kann jederzeit mit den Versuchen begonnen werden, ohne durch jahreszeitliche Schwankungen gestört zu werden und ohne dass eine Vorbehandlung zur Defaunierung des Sediments erforderlich wäre; die Verwendung von formuliertem Sediment reduziert auch die Kosten, die bei Feldprobenahmen ausreichender Sedimentmengen für Routineprüfungen anfallen;

   — die Verwendung formulierter Sedimente ermöglicht Toxizitätsvergleiche und die entsprechende Einstufung der Substanzen.

6. Die verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

▼M4

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

7. Chironomidlarven des 1. Larvenstadiums (L1-Larven) werden gegenüber der Prüfsubstanz in verschiedenen Konzentrationen in Sediment-Wasser-Systemen exponiert. Das Sediment wird mit der Prüfsubstanz dotiert (gespikt); anschließend werden L1-Larven in Bechergläser mit stabilisierten Sediment- und Wasserkonzentrationen eingesetzt. Zum Versuchsende werden Emergenz und Entwicklungsrate der Chironomiden bestimmt. Sofern erforderlich, können (gegebenenfalls anhand zusätzlicher Replikate) nach 10 Tagen Messungen der Überlebensrate und des Gewichts der Larven vorgenommen werden. Analysiert werden diese Daten entweder anhand eines Regressionsmodells, um die Konzentration zu ermitteln, die zu einer ×-%igen Verringerung der Emergenz-, Überlebens- oder Wachstumsrate der Larven führt (z. B. $EC_{15}$, $EC_{50}$ usw.), oder anhand statistischer Hypothesentests zur Bestimmung von NOEC/LOEC-Werten. Hierzu sind die Wirkungswerte anhand statistischer Tests mit Kontrollwerten zu vergleichen.

ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

8. Wasserlöslichkeit und Dampfdruck der Prüfsubstanz, ihre gemessene oder berechnete Verteilung im Sediment sowie ihre Stabilität im Wasser und im Sediment sollten bekannt sein. Ein zuverlässiges Analyseverfahren für die Quantifizierung der Prüfsubstanz im Überstandswasser, Porenwasser und Sediment mit bekannter und dokumentierter Genauigkeit und Nachweisgrenze sollte vorhanden sein. Weitere nützliche Informationen sind die Strukturformel und der Reinheitsgrad der Prüfsubstanz sowie das chemische Schicksal der Prüfsubstanz (z. B. Verlustrate, abiotischer und biotischer Abbau usw.). Weitere Hinweise zu Prüfsubstanzen mit physikalisch-chemischen Merkmalen, welche die Durchführung des Tests erschweren, sind Quelle (12) zu entnehmen.

REFERENZSUBSTANZEN

9. Referenzsubstanzen können regelmäßig getestet werden, um auf diese Weise die Zuverlässigkeit des Prüfprotokolls und der Prüfbedingungen zu gewährleisten. Beispiele von Referenzgiftstoffen, die erfolgreich in Ringtests und Validierungsstudien verwendet werden: Lindan, Trifluralin, Pentachlorphenol, Cadmiumchlorid und Kaliumchlorid (1)(2)(5)(6)(13).

GÜLTIGKEIT DER ERGEBNISSE

10. Der Test ist gültig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

— Die Emergenz in den Kontrollen muss am Ende des Tests mindestens 70 % betragen. (1)(6);

— erste Imagines von *C. riparius* und *C. yoshimatsui* sollten zwischen dem 12. und dem 23. Tag nach dem Einsetzen der Tiere in die Prüfgefäße schlüpfen; für *C. tentans* sind 20 bis 65 Tage erforderlich;

— zum Versuchsende sind der pH-Wert und die Konzentration an gelöstem Sauerstoff zu messen. Der Sauerstoffgehalt sollte mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes betragen und der pH-Wert des Überstandswassers sollte in allen Prüfgefäßen zwischen 6 und 9 liegen;

— die Wassertemperatur sollte nicht mehr als ±1,0 °C schwanken; sie kann mit Hilfe einer Klimakammer kontrolliert werden, wobei in diesem Fall die Raumtemperatur in angemessenen Zeitabständen zu bestimmen ist.

▼M4

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Prüfgefäße**

11. Der Versuch wird in 600-ml-Glasbechergläsern mit einem Durchmesser von 8 cm durchgeführt. Andere Gefäße sind ebenfalls geeignet, sofern sie eine entsprechende Höhe von Überstandswasser und Sediment fassen. Die Sedimentoberfläche sollte 2 bis 3 $cm^2$ pro Larve bieten. Das Verhältnis zwischen Sedimentschicht und Überstandswasser sollte 1:4 betragen. Die Prüfgefäße und sonstigen Geräte, die mit dem Prüfsystem in Kontakt kommen, müssen vollständig aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Material (z. B. Teflon) bestehen.

**Wahl der Testspezies**

12. Als Testspezies sollte bevorzugt *Chironomus riparius* eingesetzt werden. *Chironomus tentans* ist ebenfalls geeignet, lässt sich aber schwieriger handhaben und erfordert eine längere Prüfdauer. Auch *Chironomus yohimatsui* kann verwendet werden. Einzelheiten zu den Anzuchtverfahren für *Chironomus riparius* sind in Anlage 2 enthalten. Informationen zu den Anzuchtbedingungen sind auch für andere Arten (*Chironomus tentans* (4) und *Chironomus yoshimatsui* (11)) verfügbar. Die Identität der Spezies ist vor der Prüfung zu bestätigen, allerdings ist dies nicht vor jedem Test erforderlich, wenn die Organismen aus laboreigener Zucht stammen.

**Sediment**

13. Vorzugsweise ist formuliertes Sediment (so genanntes rekonstituiertes, künstliches oder synthetisches Sediment) zu verwenden. Wenn jedoch natürliches Sediment verwendet wird, so ist es zu charakterisieren (zumindest pH-Wert und Gehalt an organischem Kohlenstoff; die Bestimmung sonstiger Parameter wie C/N-Verhältnis und Granulometrie wird ebenfalls empfohlen). Auch sollte es frei von Verunreinigungen sowie Konkurrenten und Fressfeinden der Chironomiden sein. Ferner wird empfohlen, natürliches Sediment vor seiner Verwendung in einem Chironomiden-Toxizitätstest für sieben Tage unter denselben Bedingungen, wie sie im anschließenden Test herrschen, zu konditionieren. Für diesen Test wird auf der Grundlage der in der Prüfmethode C.8 (14) verwendeten Kunsterde folgendes formuliertes Sediment empfohlen (1)(15)(16):

a) 4-5 % (bezogen auf die Trockenmasse) Torf: so nahe wie möglich bei pH 5,5 bis 6,0; wichtig: Torf in Pulverform, feingemahlen (Partikelgröße ≤ 1 mm) und nur luftgetrocknet, verwenden;

b) 20 % (bezogen auf die Trockenmasse) Kaolin-Ton (Kaolingehalt vorzugsweise über 30 %);

c) 75-76 % (bezogen auf die Trockenmasse) Quarzsand (hauptsächlich Feinsand, der zu mehr als 50 % eine Korngröße von 50 bis 200 µm aufweist);

d) der Feuchtegehalt der fertigen Mischung wird durch die Zugabe von entionisiertem Wasser auf einen Wert zwischen 30 % und 50 % eingestellt;

e) durch die Zugabe von chemisch reinem Calciumcarbonat ($CaCO_3$) wird die fertige Mischung des Sediments auf einen pH-Wert von 7,0 ± 0,5 eingestellt. Der Gehalt der fertigen Mischung an organischem Kohlenstoff sollte 2 % (± 0,5 %) betragen und ist durch Zugabe geeigneter Mengen Torf und Sand (siehe Buchstaben a und c) zu gewährleisten.

14. Die Herkunft von Torf, Kaolin-Ton und Sand sollte bekannt sein. Es sollte kontrolliert werden, dass die Bestandteile des Sediments nicht chemisch verunreinigt sind (z. B. durch Schwermetalle, chlororganische Verbindungen, phosphororganische Verbindungen usw.). Ein Beispiel für die Herstellung des formulierten Sediments ist in Anlage 3 beschrieben. Die Bestandteile können auch in trockenem Zustand gemischt werden, sofern nachgewiesen ist, dass es nach Zugabe des Überstandswassers nicht zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile kommt (z. B. schwimmende Torfpartikel) und dass der Torf oder das Sediment ausreichend konditioniert ist.

▼M4

**Wasser**

15. Alle Wassersorten, die den chemischen Eigenschaften von zugelassenem Verdünnungswasser gemäß den Anlagen 2 und 4 entsprechen, sind als Testwasser geeignet. Natürliches Wasser (Oberflächen- oder Grundwasser), rekonstituiertes Wasser (siehe Anlage 2) oder entchlortes Leitungswasser sind als Hälterungs- und Verdünnungswasser zulässig, wenn die Chironomiden hierin während der Zucht- und Testphase ohne Stressanzeichen überleben. Zu Testbeginn sollte der pH-Wert des Testwassers zwischen 6 und 9 liegen und die Gesamthärte des Wassers sollte nicht mehr als 400 mg/l (in $CaCO_3$) betragen. Wird jedoch ein Ionenaustausch zwischen den Härteionen und der Prüfsubstanz vermutet, ist Wasser geringerer Härte zu verwenden (und somit in diesem Fall das Elendt-Medium M4 zu vermeiden). Das Wasser muss über die gesamte Testdauer von gleichbleibender Qualität sein. Die Qualitätsparameter des Wassers gemäß Anlage 4 sind mindestens zweimal jährlich bzw. immer dann zu messen, wenn der Verdacht besteht, dass sie sich erheblich verändert haben.

**Stammlösungen — Gespikte Sedimente**

16. Die gespikten Sedimente der gewünschten Konzentration werden in der Regel zubereitet, indem eine Lösung der Prüfsubstanz direkt in das Sediment gegeben wird. Eine Stammlösung der in entionisiertem Wasser gelösten Prüfsubstanz wird mit Hilfe eines Walzwerks oder Futtermischers oder per Hand mit dem formulierten Sediment gemischt. Wenn die Prüfsubstanz im Wasser schwer löslich ist, kann sie in dem kleinstmöglichen Volumen eines geeigneten organischen Lösungsmittels (z. B. Hexan, Aceton oder Chloroform) gelöst werden. Diese Lösung wird anschließend mit 10 g feinem Quarzsand je Prüfgefäß gemischt. Nach vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels aus dem Sand wird dieser mit einer geeigneten Menge Sediment pro Prüfgefäß gemischt. Um die Prüfsubstanz zu lösen, zu dispergieren oder zu emulgieren, dürfen nur sich leicht verflüchtigende Lösungsmittel verwendet werden. Bei der Zubereitung des Sediments ist die in der Mischung von Prüfsubstanz und Sand enthaltene Sandmenge zu berücksichtigen (d. h. das Sediment sollte mit weniger Sand zubereitet werden). Es ist darauf zu achten, dass die Prüfsubstanz mit dem Sediment gut durchmischt wird, damit sie in dem Sediment homogen verteilt ist. Gegebenenfalls können Teilproben analysiert werden, um den Homogenitätsgrad zu bestimmen.

VERSUCHSAUFBAU

17. Unter „Versuchsaufbau“ sind die gewählte Anzahl und der Abstand der Testkonzentrationen, die Anzahl der Prüfgefäße je Konzentration und die Anzahl der Larven je Gefäß zu verstehen. Beschrieben werden die Verfahren für die Bestimmung der EC-Werte und der NOEC-Werte und für die Durchführung eines Limit-Tests.

**Versuchsaufbau für die Regressionsanalyse**

18. Die im Test verwendeten Konzentrationen müssen in jedem Fall die Wirkungskonzentration (z. B. $EC_{15}$, $EC_{50}$) und den Konzentrationsbereich, in dem die Wirkung der Prüfsubstanz von Interesse ist, einschließen. Bei der Bestimmung von Wirkungskonzentrationen ($EC_x$) wird in der Regel eine größere Genauigkeit und insbesondere Validität erzielt, wenn die Wirkungskonzentration im Bereich der getesten Konzentrationen liegt. Extrapolierungen weit unter der niedrigsten positiven Konzentration oder über der höchsten Konzentration sind zu vermeiden. Ein Vorversuch kann die Auswahl der zu verwendenden Konzentrationsspanne erleichtern (siehe Nummer 27).

▼M4

19. Für die Bestimmung von $EC_x$ sollten mindestens fünf Konzentrationen und drei Replikate jeder Konzentration getestet werden. Im Interesse einer angemessenen Modellierung ist es in jedem Fall ratsam, eine hinreichende Anzahl an Konzentrationen zu testen. Die Konzentrationen sollten sich um einen Faktor von nicht mehr als 2 unterscheiden (außer bei einer schwachen Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve). Die Anzahl der Replikate pro Behandlung kann reduziert werden, wenn die Anzahl der Prüfkonzentrationen mit unterschiedlicher Wirkung erhöht wird. Eine höhere Anzahl an Replikaten oder eine Verkürzung der Intervalle zwischen den Prüfkonzentrationen führt tendenziell zu engeren Konfidenzintervallen für den Test. Zur Bestimmung der Überlebensrate und des Wachstums der Larven nach 10 Tagen sind zusätzliche Replikate erforderlich.

**Versuchsaufbau für die Bestimmung von NOEC/LOEC-Werten**

20. Zur Bestimmung von LOEC- oder NOEC-Werten sollten fünf Prüfkonzentrationen mit mindestens vier Replikaten pro Konzentration verwendet werden, wobei sich die Konzentrationen um einen Faktor von nicht mehr als 2 unterscheiden sollten. Es sollten so viele Replikate verwendet werden, dass sich im Hinblick auf eine angemessene statistische Aussagekraft bei einem Signifikanzniveau von 5 % (p = 0,05) eine Differenz von 20 % zur Kontrollkonzentration nachweisen lässt. Für die Entwicklungsrate eignen sich in der Regel Varianzanalysen (ANOVA) wie der Dunnett-Test und der Williams-Test (17)(18)(19)(20). Für die Schlupfrate kann der Cochran-Armitage-Test, der Exakte Test nach Fisher (mit Bonferroni-Korrektur) oder der Mantel-Haenszel-Test herangezogen werden.

**Limit-Test**

21. Falls der Vorversuch keine Wirkungen zeigt, kann ein Limit-Test (mit je einer Prüfkonzentration und einer Kontrolle) durchgeführt werden. Der Limit-Test wird mit einer Konzentration durchgeführt, die hoch genug ist, dass Entscheidungsträger jegliche möglichen toxischen Wirkungen der Prüfsubstanz ausschließen können; dabei wird das Limit auf einen Konzentrationswert festgesetzt, der unter realen Bedingungen nicht erreicht werden dürfte. Empfohlen wird eine Konzentration von 1 000 mg/kg (Trockengewicht). In der Regel sind jeweils mindestens sechs Replikate pro Behandlung und pro Kontrolle erforderlich. Es ist nachzuweisen, dass die statistische Aussagekraft ausreicht, um bei einem Signifikanzniveau von 5 % (p = 0,05) eine Differenz von 20 % zur Kontrollkonzentration festzustellen. Für metrische Merkmale (Entwicklungsrate und Gewicht) ist der t-Test eine geeignete statistische Methode, sofern die Daten die Bedingungen für diesen Test (Normalverteilung, Varianzhomogenität) erfüllen. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so kann ein t-Test für ungleiche Varianzen oder ein nicht-parametrischer Test wie der Wilcoxon-Mann-Whithey-Test verwendet werden. Für die Schlupfrate eignet sich der Exakte Test nach Fisher.

PRÜFVERFAHREN

**Expositionsbedingungen**

*Zubereitung des Sediment-Wasser-Systems mit gespiktem Sediment*

22. Für die Applikation der Prüfsubstanz wird das in der Prüfmethode C.8: Toxizität für Regenwürmer‘ beschriebene Spiking-Verfahren empfohlen (14). Gespiktes Sediment wird in die Prüfgefäße gefüllt und anschließend mit Wasser überschichtet, bis ein Verhältnis von Sediment zu Wasser von 1:4 erreicht ist (siehe Nummern 11 und 15). Die Sedimentschicht sollte 1,5 bis 3 cm dick sein. Um zu verhindern, dass es während der Zugabe von Prüfwasser in die Wassersäule zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile und einer Resuspension der feinen Partikel kommt, kann das Sediment beim Einfüllen des Wassers mit einer Plastikschale abgedeckt werden, die anschließend sofort entfernt wird. Andere Hilfsmittel sind ebenfalls geeignet.

23. Die Prüfgefäße sollten abgedeckt werden (z. B. mit Glasplatten). Etwaige Verdunstungsverluste im Laufe des Versuchs sind auszugleichen, und zwar mit destilliertem oder entionisiertem Wasser, um Salzfreiheit zu gewährleisten.

▼M4

*Stabilisierung*

24. Nach Fertigstellung des gespikten Sediments mit dem überschichteten Wasser ist abzuwarten, bis sich die Prüfsubstanz zwischen Wasserphase und Sediment verteilt hat (3)(4)(6)(13). Dies sollte bevorzugt unter denselben Temperatur- und Belüftungsbedingungen wie im Versuch erfolgen. Die erforderliche Zeit für die Einstellung des Gleichgewichts hängt vom Sediment und der Chemikalie ab. In einigen Fällen reichen ein paar Stunden oder Tage, in selten Fällen können sogar mehrere Wochen (4 bis 5 Wochen) erforderlich sein. Es sollte nicht abgewartet werden, bis die Gleichgewichtseinstellung abgeschlossen ist, da es in dieser Zeit bei vielen Chemikalien zu Abbauprozessen kommen kann, aber eine Wartezeit von 48 Std. wird empfohlen. Am Ende dieser Gleichgewichtseinstellungszeit wird die Konzentration der Prüfsubstanz im Überstandswasser, Porenwasser und Sediment gemessen, zumindest die Höchstkonzentration und eine niedrigere Konzentration (siehe Nummer 38). Diese analytischen Bestimmungen der Prüfsubstanz ermöglichen es, die Massenbilanz zu berechnen und die Ergebnisse auf der Grundlage der gemessenen Konzentrationen darzustellen.

*Einsetzen der Testorganismen*

25. Vier bis fünf Tage vor dem Einsetzen der Testorganismen in die Prüfgefäße werden Eigelege aus der Zucht entnommen und in kleinen Gefäßen in das Kulturmedium eingesetzt. Es kann „altes“ Medium aus den Stammkulturen oder frisch zubereitetes Medium verwendet werden. In letzterem Fall wird eine geringe Futtermenge, z. B. Grünalgen und/oder einige Tropfen des Filtrats einer Suspension aus fein zerkleinerten Fischfutterflocken, zum Kulturmedium hinzugegeben (siehe Anlage 2). Es sollten nur frische Eigelege verwendet werden. Normalerweise beginnen die Larven einige Tage nach dem Einsetzen der Eier zu schlüpfen (*Chironomus riparius*: 2 bis 3 Tage bei 20 °C, *Chironomus tentans* und *Chironomus yoshimatsui*: 1 bis 4 Tage bei 23 °C bzw. 25 °C) und durchlaufen während ihres Wachstums vier Stadien von jeweils 4 bis 8 Tagen. Für den Versuch sollten Larven des ersten Larvenstadiums (L1) (2 bis 3 Tage oder 1 bis 4 Tage nach dem Schlüpfen) verwendet werden. Das Larvenstadium kann anhand der Kopfkapselbreite bestimmt werden (6).

26. Jeweils 20 L1-Larven werden nach dem Zufallsprinzip mit einer stumpfen Pipette in die einzelnen Prüfgefäße eingesetzt, die das gespikte Sediment und das Wasser enthalten. Während des Einsetzens der Larven in das Prüfgefäß und der folgenden 24 Std. (siehe Nummern 25 und 32) wird die Belüftung gestoppt. Je nach Versuchsaufbau (siehe Nummern 19 und 20) werden pro Konzentration mindestens 60 Larven zur Bestimmung der EC-Punktschätzung und mindestens 80 Larven zur Bestimmung der NOEC-Werte verwendet.

*Prüfkonzentrationen*

27. Zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs für den endgültigen Test kann ein Vorversuch hilfreich sein. Hierzu wird eine Reihe von weit auseinander liegenden Konzentrationen der Prüfsubstanz verwendet. Um dieselbe Besiedlungsdichte der Oberfläche durch die Chironomiden wie im eigentlichen Versuch zu reproduzieren, werden die Chironomiden jeder Konzentration der Prüfsubstanz über einen Zeitraum ausgesetzt, mit dem sich die geeigneten Prüfkonzentrationen ermitteln lassen; Replikate sind nicht erforderlich.

28. Die Prüfkonzentrationen für den endgültigen Test werden auf der Grundlage der Ergebnisse des Vorversuchs festgelegt. Es sollten mindestens fünf Konzentrationen (siehe Nummern 18 bis 20) ausgewählt und verwendet werden.

▼M4

*Kontrollgefäße*

29. In den Versuch sind Kontrollgefäße mit unbehandeltem Sediment und einer ausreichenden Anzahl von Replikaten einzubeziehen (siehe Nummern 19 und 20). Wurde die Prüfsubstanz mit Hilfe eines Lösungsmittel appliziert (siehe Nummer 16), so ist ein Kontrollgefäß hinzuzufügen, dessen Sediment das Lösungsmittel enthält.

*Prüfsystem*

30. Es werden statische Prüfsysteme verwendet. Semi-statische oder Durchflusssysteme, bei denen das Überstandswasser in bestimmten Intervallen bzw. kontinuierlich ersetzt wird, können in Ausnahmefällen verwendet werden, z. B. wenn die Spezifikationen zur Wasserqualität für den Testorganismus nicht mehr geeignet sind oder sich auf das chemische Gleichgewicht auswirken (z. B. wenn die Konzentration an gelöstem Sauerstoff zu stark abnimmt, die Konzentration der Ausscheidungen zu stark zunimmt oder aus dem Sediment ausgewaschene Mineralien den pH-Wert und/oder die Wasserhärte beeinflussen). Allerdings reichen andere Methoden zur Verbesserung der Qualität des Überstandswassers wie die Belüftung aus und sollten bevorzugt angewendet werden.

*Futter*

31. Die Larven sollten täglich, mindestens jedoch dreimal pro Woche gefüttert werden. Für jüngere Larven scheinen in den ersten 10 Tagen 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg für *C. yoshimatui*) Fischfutter (in Wasser suspendiertes oder fein zerkleinertes Futter, z. B. TetraMin oder TetraPhyll; Einzelheiten siehe Anlage 2) pro Larve und Tag angemessen. Ältere Larven benötigen etwas mehr Nahrung: Für den Rest des Versuchs dürften 0,5-1 mg Futter pro Larve und Tag ausreichen. Bei Pilzbesatz oder Absterben von Kontrollorganismen wird die Futterration für alle behandelten Organismen und Kontrollorganismen reduziert. Lässt sich die Pilzentwicklung nicht stoppen, muss der Versuch wiederholt werden. Bei Versuchen mit stark adsorbierenden Substanzen (z. B. log $K_{ow}$ > 5) oder kovalent an das Sediment gebundenen Substanzen kann dem formulierten Sediment die für das Überleben und natürliche Wachstum der Organismen erforderliche Futtermenge vor der Stabilisierungsphase hinzugefügt werden. In diesem Fall wird das Fischfutter durch pflanzliches Material ersetzt, z. B. durch Zugabe von 0,5 % (Trockengewicht) feingeriebene Blätter z. B. von Brennnessel (*Urtica dioica*), Maulbeere (*Morus alba*), Weiß-Klee (*Trifolium repens*) oder Spinat (*Spinacia oleracea*) oder von sonstigem pflanzlichen Material (*Cerophyl* oder Alphacellulose).

*Inkubationsbedingungen*

32. Das Überstandswasser in den Prüfgefäßen wird vorzugsweise 24 Std. nach dem Einsetzen der Larven über den gesamten Versuchszeitraum moderat belüftet (Es ist darauf zu achten, dass die Konzentration an gelöstem Sauerstoff nicht unter 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes fällt). Für die Belüftung (eine oder mehrere Blasen/sek.) wird eine Glaspasteurpipette 2-3 cm über der Sedimentschicht angebracht. Bei flüchtigen Prüfsubstanzen ist gegebenenfalls von einer Belüftung des Sediment-Wasser-Systems abzusehen.

33. Der Test wird bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 °C (± 2 °C) durchgeführt. Für *C. tentans* und *C. yoshimatui* wird eine Temperatur von 23 °C bzw. 25 °C (± 2 °C) empfohlen. Die Photoperiode beträgt 16 Std. und die Beleuchtungsstärke 500 bis 1 000 lux.

▼M4

*Expositionsdauer*

34. Die Exposition beginnt mit dem Einsetzen der Larven in die Gefäße mit dem gespikten Sediment und in die Kontrollgefäße. Die maximale Expositionsdauer beträgt 28 Tage für *C. riparius* und *C. yoshimatsui* und 65 Tage für *C. tentans*. Falls die Mücken früher schlüpfen, kann der Versuch frühestens fünf Tage nach dem Schlüpfen der letzten Kontrollimago beendet werden.

**Beobachtungen**

*Emergenz*

35. Es werden die Entwicklungsdauer und die Anzahl der vollständig geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken bestimmt. Männchen sind leicht an den gefiederten Antennen zu erkennen.

36. Die Prüfgefäß sollten dreimal wöchentlich visuell auf Verhaltensänderungen (z. B. Verlassen des Sediments, ungewöhnliches Schwimmverhalten) gegenüber den Kontrollgefäßen überprüft werden. Während der Schlupfzeit müssen täglich die geschlüpften Tiere gezählt werden. Geschlecht und Anzahl der vollständig geschlüpften Mücken sind täglich festzuhalten. Danach werden die geschlüpften Mücken aus den Prüfgefäßen entfernt. Vor dem Versuchsende abgelegte Eigelege sind im Protokoll zu vermerken und anschließend zu entfernen, um zu verhindern, dass erneut Larven in das Sediment gelangen. Die Anzahl der sichtbaren Puppen, die nicht geschlüpft sind, wird ebenfalls protokolliert. Anweisungen zur Messung der Emergenz sind Anlage 5 zu entnehmen.

*Wachstum und Überleben*

37. Müssen Daten zum Überleben und Wachstum der Larven nach 10 Tagen ermittelt werden, so sollten bereits ab Versuchsbeginn zusätzliche Prüfgefäße hinzugefügt werden, die dann später verwendet werden können. Das Sediment aus diesen zusätzlichen Gefäßen wird durch ein 250-µm-Sieb gesiebt, um die Larven auszusieben. Kriterien zur Bestimmung des Todes sind Bewegungslosigkeit oder mangelnde Reaktion auf mechanische Reize. Nicht wiedergefundene Larven sollten auch zu den Todesfällen gerechnet werden (Larven, die zu Versuchsbeginn gestorben sind, wurden möglicherweise durch Mikroben zersetzt). Nachdem das (aschefreie) Trockengewicht der überlebenden Larven pro Prüfgefäß bestimmt wurde, wird das mittlere Trockengewicht der einzelnen Larven pro Prüfgefäß berechnet. Es ist nützlich festzustellen, zu welchem Larvenstadium die überlebenden Larven gehören, was anhand der Kopfkapselbreite der einzelnen Larven bestimmt werden kann.

**Analysemessungen**

*Konzentration der Prüfsubstanz*

38. Vor Versuchsbeginn (d. h. vor dem Einsetzen der Larven) werden aus mindestens einem Gefäß pro Behandlung Sedimentproben für die analytische Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz im Sediment entnommen. Es wird empfohlen, zu Beginn (siehe Nummer 24) und am Ende des Versuchs Proben des Überstandswassers, des Porenwassers und des Sediments zumindest in der Höchstkonzentration und einer niedrigeren Konzentration zu analysieren. Diese Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz gibt Aufschluss über das Verhalten/die Verteilung der Prüfsubstanz im Wasser-Sediment-System.

39. Falls Zwischenmessungen (z. B. am 7. Tag) vorgenommen werden und für die Analyse größere Proben erforderlich sind, die nicht aus den Prüfgefäßen entnommen werden können, ohne das Testsystem zu beeinflussen, sollten Analysemessungen an Proben aus zusätzlichen Prüfgefäßen vorgenommen werden, die derselben Behandlung (einschließlich Präsenz von Testorganismen) unterzogen, aber nicht für biologische Beobachtungen verwendet wurden.

▼M4

40. Eine 30-minütige Zentrifugation bei z. B. 10 000 g und 4 °C wird empfohlen, um das Interstitialwasser abzutrennen. Bei Prüfsubstanzen, die nachweislich nicht an Filtern anlagern, kann auch filtriert werden. Bei zu kleinen Proben kann es passieren, dass sich die Konzentrationen im Porenwasser nicht analysieren lassen.

*Physikalisch-chemische Parameter*

41. pH-Wert und Temperatur der Prüfgefäße sind auf geeignete Weise zu messen (siehe Nummer 10). Zu Beginn und am Ende des Versuchs sind Härte und Ammonium-Gehalt in den Kontrollgefäßen und in einem Prüfgefäß zu bestimmen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

*Auswertung der Ergebnisse*

42. Ziel dieses Versuchs ist, die Wirkung der Prüfsubstanz auf die Entwicklungsrate und die Gesamtanzahl der vollständig geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken bzw. im Falle des 10-Tage-Versuchs die Wirkungen auf Überleben und Gewicht der Larven zu bestimmen. Gibt es keinerlei Hinweise auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Geschlechter, werden die Ergebnisse für Männchen und Weibchen für die statistischen Analysen gepoolt. Unterschiedliche Empfindlichkeiten der Geschlechter können statistisch z. B. anhand eines Tafeltests mit $\chi^2$-r × 2 bewertet werden. Erforderlichenfalls sind nach 10 Tagen Daten zur Überlebensrate der Larven und zum mittleren Trockengewicht der einzelnen Larven pro Prüfgefäß zu ermitteln.

43. Die nach Trockengewicht ausgedrückten Effektkonzentrationen sind möglichst auf der Grundlage der zu Testbeginn gemessenen Sedimentkonzentrationen (siehe Nummer 38) zu berechnen.

44. Für eine Punktschätzung von $EC_{50}$ oder einem anderen $EC_x$ können die pro Gefäß erstellten Statistiken als echte Replikate dienen. Bei der Berechnung eines Konfidenzintervalls für einen beliebigen $EC_x$-Wert ist die Variabilität zwischen den Gefäßen zu berücksichtigen oder nachzuweisen, dass diese Variabilität so klein ist, dass sie übergangen werden kann. Wird das Modell nach der Methode der geringsten Abweichungsquadrate angepasst, so sollten die pro Gefäß erstellten Statistiken transformiert werden, um die Varianzhomogenität zu verbessern. Allerdings werden die $EC_x$-Werte berechnet, nachdem die Ergebnisse auf den ursprünglichen Wert rücktransformiert wurden.

45. Wenn die statistische Analyse darauf abzielt, NOEC/LOEC-Werte anhand von Hypothesentests zu bestimmen, so ist die Variabilität zwischen den Prüfgefäßen zu berücksichtigen, z. B. mit Hilfe einer geschachtelten (nested) Varianzanalyse (ANOVA). Alternativ können in den Fällen, in denen von den herkömmlichen ANOVA-Annahmen abgewichen wird, robustere Tests (21) angewendet werden.

*Schlupfrate*

46. Schlupfraten sind quantale Daten und können anhand des Cochran-Armitage-Tests im Step-Down-Verfahren analysiert werden, wenn eine monotone Dosis-Antwort erwartet wird und die Schlupfdaten dieser Erwartung entsprechen. Andernfalls können ein Exakter Test nach Fisher oder ein Mantel-Haenszel-Test mit Bonferroni-Holm-angepassten p-Werten verwendet werden. Ist die Variabilität zwischen den Replikaten mit derselben Konzentration nachweislich größer als eine Binomialverteilung ergeben würde (häufig als „extra-binomiale“ Variation bezeichnet), so sollte ein robusterer Test (Cochran-Armitage-Test oder Exakter Test nach Fisher), wie in (21) vorgeschlagen, angewendet werden.

▼M4

Die Summe geschlüpfter Mücken (ne) je Prüfgefäß wird bestimmt und durch die Anzahl der eingesetzten Larven (na) dividiert:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

Dabei sind:

$ER$ = Schlupfrate

$n_e$ = Anzahl der geschlüpften Mücken je Prüfgefäß

$n_a$ = Anzahl der eingesetzten Larven je Prüfgefäß

47. Eine alternative Methode, die sich bei größeren Proben im Falle einer extra-binomialen Varianz eher eignet, besteht darin, die Schlupfrate als kontinuierliche Antwort zu behandeln und Methoden wie den Williams-Test anzuwenden, wenn eine monotone Dosis-Antwort erwartet wird und die Schlupfraten dies bestätigen. Der Dunnett's-Test eignet sich für den Fall, dass die Monotonie nicht anhält. Als große Probe gilt hier eine Probe, bei der die Anzahl der geschlüpften Mücken und die Anzahl der nicht geschlüpften Mücken jeweils mehr als fünf pro Replikat(gefäß) beträgt.

48. Für die Anwendung von ANOVA-Methoden sollten die ER-Werte zunächst einer arcsin-Wurzel-Transformation oder Freeman-Tukey-Transformation unterzogen werden, um annähernd normal verteilte Daten und Homogenität der Varianzen zu erreichen. Bei der Verwendung von absoluten Frequenzen können auch der Cochran-Armitage-, der Exakte Test nach Fisher (mit Bonferroni-Korrektur) oder der Mantel-Haenszel-Test angewendet werden. Bei der arcsin-Wurzel-Transformation wird die Umkehrfunktion des Sinus ($\sin^{-1}$) der Wurzel von ER berechnet.

49. Für Schlupfraten werden die $EC_x$-Werte mittels Regressionsanalyse (oder z. B. mit der Probit- (22), Logit-, Weibull-Methode, geeigneter kommerzieller Software usw.) berechnet. Versagt die Regressionsanalyse (z. B. bei weniger als zwei Teilantworten), so werden andere nicht-parametrische Methoden wie die Berechnung des gleitenden Durchschnitts oder eine einfache Interpolation angewendet.

*Entwicklungsrate*

50. Die mittlere Entwicklungszeit repräsentiert die mittlere Zeitspanne zwischen dem Einsetzen der Larven (Tag 0 des Versuchs) und dem Schlupf der in die Prüfgefäße eingesetzten Mückenkohorten. (Für die Berechnung der reellen Entwicklungszeit ist das Alter der Larven beim Einsetzen in die Prüfgefäße zu berücksichtigen). Die Entwicklungsrate ist der Reziprokwert der Entwicklungszeit (Einheit: 1/Tag) und repräsentiert den Teil der Larven, die sich pro Tag entwickeln. Für die Bewertung der Sedimenttoxizität ist die Entwicklungsrate zu bevorzugen, da sie im Vergleich zur Entwicklungszeit eine geringere Varianz aufweist und ihre Werte homogener sind und näher an der Normalverteilung liegen. Aus diesem Grund eignen sich parametrische Verfahren mit großer Teststärke eher für die Entwicklungsrate als für die Entwicklungszeit. Wird die Entwicklungsrate als kontinuierliche Antwort behandelt, so können die $EC_x$-Werte mittels Regressionsanalyse geschätzt werden (z. B. (23), (24)).

51. Für folgende statistische Tests gilt die Anzahl der am Kontrolltag × beobachteten Mücken als die Anzahl der Mücken, die in der Mitte des Zeitintervalls zwischen dem Tag x und dem Tag x-l geschlüpft sind (l = Länge des Kontrollintervalls, gewöhnlich 1 Tag). Die mittlere Entwicklungsrate je Prüfgefäß berechnet sich folgendermaßen:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

Dabei sind:

($\bar{x}$): mittlere Entwicklungsrate je Prüfgefäß

i: Index des Kontrollintervalls

m: maximale Anzahl der Kontrollintervalle

$f_i$: Anzahl der Mücken, die im Kontrollintervall i geschlüpft sind

$n_e$: Gesamtzahl der geschlüpften Mücken bei Versuchsende ($=\sum f_i$)

$x_i$: Entwicklungsrate der geschlüpften Mücken im Intervall i

$$x_i = \frac{1}{\left(Tag_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

Dabei sind:

$Tag_i$: Kontrolltag (Tage seit der Applikation)

$l_i$: Länge des Kontrollintervalls i (Tage, in der Regel 1 Tag)

**Prüfbericht**

52. Der Prüfbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

*Prüfsubstanz:*

— physikalischer Zustand und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften (Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Verteilungskoeffizient im Boden (oder — falls verfügbar — im Sediment), Stabilität im Wasser usw.);

— chemische Kenndaten (Common name, chemische Bezeichnung, Strukturformel, CAS-Nummer usw.) einschließlich Reinheitsgrad und Analyseverfahren zur Quantifizierung der Prüfsubstanz.

*Testspezies:*

— eingesetzte Testtiere: Art, wissenschaftlicher Name, Bezugsquelle der Testorganismen und Zuchtbedingungen;

— Informationen über die Handhabung der Eigelege und Larven;

— Alter der Tiere beim Einsetzen in die Prüfgefäße.

*Prüfbedingungen:*

— verwendetes Sediment, d. h. natürliches oder formuliertes Sediment;

— für natürliches Sediment: Ort und Beschreibung der Probenahmestelle(n) für das Sediment, möglichst einschließlich etwaiger früherer Kontaminationen; Merkmale: pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff, C/N-Verhältnis und gegebenenfalls Granulometrie;

— Zubereitung des formulierten Sediments: Zutaten und Merkmale (Gehalt an organischem Kohlenstoff, pH-Wert, Feuchte usw. zu Versuchsbeginn);

— Zubereitung des Prüfwassers (falls rekonstituiertes Wasser verwendet wird) und Merkmale des Wassers (Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Leitfähigkeit, Härte usw. zu Testbeginn);

— Tiefe des Sediments und des Überstandswassers;

— Volumen des Überstandswassers und des Porenwassers; Gewicht des feuchten Sediments mit und ohne Porenwasser;

▼M4

— Prüfgefäße (Material und Größe);

— Verfahren für das Spiken des Sediments: verwendete Prüfkonzentrationen, Anzahl der Replikate und gegebenenfalls Verwendung von Lösungsmitteln;

— Phase der Gleichgewichtseinstellung des Sediment-Wasser-Systems: Dauer und Bedingungen;

— Inkubationsbedingungen: Temperatur, Lichtzyklus und Beleuchtungsstärke, Belüftung (Häufigkeit und Intensität);

— genaue Angaben zur Fütterung, einschließlich Art des Futters, Präparation des Futters, Futtermenge und Fütterungsregime.

*Ergebnisse:*

— die nominellen Prüfkonzentrationen, die gemessenen Prüfkonzentrationen und die Ergebnisse sämtlicher Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz im Prüfgefäß;

— Qualität des Wassers in den Prüfgefäßen, d. h. pH-Wert, Temperatur, Gehalt an gelöstem Kohlenstoff, Härte und Ammonium;

— gegebenenfalls Ausgleich von Verdunstungsverlusten;

— Anzahl der geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken pro Gefäß und Tag;

— Anzahl der Larven pro Gefäß, die sich nicht zu Mücken entwickelt haben;

— mittleres Trockengewicht der einzelnen Larven pro Gefäß und gegebenenfalls pro Larvenstadium;

— prozentuale Emergenzrate pro Replikat und Prüfkonzentration (männliche und weibliche Mücken gepoolt);

— mittlere Entwicklungsrate der vollentwickelten Mücken pro Replikat und Behandlungsrate (männliche und weibliche Mücken gepoolt);

— Schätzung der toxischen Endpunkte, z. B. $EC_x$ (und dazugehörige Konfidenzintervalle), NOEC- und/oder LOEC-Werte und die zu ihrer Bestimmung verwendeten statistischen Methoden;

— Diskussion der Ergebnisse, einschließlich der Auswirkungen etwaiger Abweichungen von dieser Prüfmethode auf die Prüfergebnisse.

*LITERATUR:*

1. BBA (1995): Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Herausgeber: M. Streloke und H. Köpp. Berlin 1995.

2. Fleming R. *et al.* (1994): Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Abschlussbericht an die Europäische Kommission. Bericht Nr.: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3. SETAC (1993): Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Aus dem WOSTA-Workshop in den Niederlanden.

4. ASTM International/E1706-00 (2002): Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, S. 1125-1241. In: ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

5. Environment Canada (1997): Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Dezember 1997.

▼M4


6. US-EPA (2000): Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Zweite Ausgabe. EPA 600/R-99/064. März 2000. Überarbeitung der ersten Ausgabe vom Juni 1994.

7. US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8. US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9. Milani D., Day K.E., McLeay D.J. and Kirby R.S. (1996): Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technischer Bericht. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.

10. Sugaya Y. (1997): Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

11. Kawai K. (1986): Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

12. OECD (2000): Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13. Environment Canada (1995): Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14. Prüfmethode C.8 dieses Anhangs: Toxizität für Regenwürmer.

15. Suedel B.C. and Rodgers J.H. (1994): Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

16. Naylor C. and Rodrigues C. (1995): Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

17. Dunnett C.W. (1964): A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

18. Dunnett C.W. (1964): New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

19. Williams D.A. (1971): A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

20. Williams D.A. (1972): The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

21. Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992): A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

22. Christensen E.R. (1984): Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

23. Bruce and Versteeg (1992): A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

24. Slob W. (2002): Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼M4

*Anlage 1*

DEFINITIONEN

Für diese Prüfmethode gelten folgende Definitionen:

**Formuliertes Sediment** oder rekonstitutiertes, künstliches oder synthetisches Sediment: ein Gemisch aus Stoffen, mit denen die Bestandteile eines natürlichen Sediments nachgeahmt werden sollen.

**Überstandswasser:** das auf das Sediment im Prüfgefäß aufgebrachte Wasser.

**Interstitialwasser** oder Porenwasser: das Wasser in den Zwischenräumen zwischen Sediment- und Bodenpartikeln.

**Gespiktes Sediment:** Sediment, dem Prüfsubstanz hinzugefügt wurde.

**Prüfsubstanz:** jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

▼M4

*Anlage 2*

**Empfehlungen für die Anzucht von *Chironomus riparius***

1. Für die Anzucht von *Chironomus*-Larven können Kristallisierschalen oder größere Behälter verwendet werden. Auf dem Boden des Behälters wird eine 5 bis 10 mm dicke Schicht feiner Quarzsand aufgetragen. Kieselguhr (z. B. Merck, Art 8117) hat sich ebenfalls als Substrat bewährt (eine dünnere Schicht von nur ein paar Millimetern ist ausreichend). Anschließend wird mit geeignetem Wasser auf mehrere Zentimeter Höhe aufgefüllt. Soweit erforderlich ist bei Verdunstungsverlusten Wasser nachzufüllen, um ein Austrocknen zu verhindern. Nötigenfalls kann das Wasser ausgetauscht werden. Leicht belüften. Die Larvenzuchtgefäße sind in geeignete Käfige zu setzen, um zu verhindern, dass die schlüpfenden Imagines entweichen. Der Käfig muss groß genug sein (Mindestgröße ca. 30 × 30 × 30 cm), damit die geschlüpften Imagines schwärmen können, da es andernfalls nicht zur Paarung kommt.

2. Die Käfige sind bei Raumtemperatur oder in einer Klimakammer bei 20 ± 2 °C und einer Licht-/Dunkelphase von 16:8 Std. (Lichtintensität ca. 1 000 lux) zu halten. Eine relative Luftfeuchte von weniger als 60 % soll offensichtlich die Vermehrung verhindern.

**Verdünnungswasser**

3. Es kann jedes natürliche oder synthetische Wasser verwendet werden. Im Allgemeinen wird Brunnenwasser, entchlortes Leitungswasser und künstliches Medium (z. B. Elendt-Medium „M4“ oder „M7“, siehe unten) verwendet. Das Wasser muss vor Verwendung belüftet werden. Soweit erforderlich kann das Anzuchtwasser durch vorsichtiges Abgießen oder Absaugen des gebrauchten Wassers aus den Prüfgefäßen erneuert werden; dabei ist darauf zu achten, dass die Wohnröhren der Larven nicht zerstört werden.

**Fütterung der Larven**

4. *Chironomus*-Larven sollten mit ca. 250 mg Fischfutterflocken (TetraMin®, TetraPhyll® oder einer anderen entsprechenden Fischfuttermarke) pro Gefäß und Tag gefüttert werden. Hierzu kann trockengemahlenes Pulver oder eine Suspension in Wasser (1,0 g Futterflocken, mit 20 ml Verdünnungswasser zu einer homogenen Masse gemischt) verwendet werden. Diese Zubereitung kann in Portionen von 5 ml pro Gefäß und pro Tag verfüttert werden (vor Gebrauch schütteln). Ältere Larven können etwas mehr Futter erhalten.

5. Das Futter ist an die Wasserqualität anzupassen. Bei Trübung des Kulturmediums ist die Futterration zu reduzieren. Die Futterzugaben sind sorgfältig zu notieren. Zu wenig Futter kann dazu führen, dass die Larven in die Wassersäule abwandern, während zu viel Futter die mikrobielle Aktivität verstärkt und die Sauerstoffkonzentrationen verringert. In beiden Fällen kann es zu einer Verlangsamung des Wachstums der Organismen kommen.

6. Wenn neue Kulturgefäße angesetzt werden, können auch einige Grünalgenzellen (z. B. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) hinzugefügt werden.

**Fütterung der geschlüpften Imagines**

7. Einige Experimentatoren empfehlen, als Futter für die geschlüpften Imagines ein mit gesättigter Zuckerlösung getränktes Wattepad zu verwenden.

▼M4

**Emergenz**

8. Nach ca. 13 bis 15 Tagen bei einer Temperatur von 20 ± 2 °C beginnen die Imagines in den Larvenzuchtgefäßen zu schlüpfen. Männchen sind leicht an den gefiederten Antennen zu erkennen.

**Eigelege**

9. Sobald sich Imagines in den Zuchtkäfigen befinden, sind alle Larvenzuchtgefäße dreimal wöchentlich auf gallertartige Eigelege zu kontrollieren. Diese sind vorsichtig zu entfernen und in eine kleine Schale mit einer Probe Anzuchtwasser umzusetzen. Mit den Eigelegen werden neue Kulturen angesetzt (z. B. 2 bis 4 Eigelege pro Gefäß) oder Toxizitätstests durchgeführt.

10. Nach 2 bis 3 Tagen sollten L1-Larven schlüpfen.

**Ansetzen neuer Kulturen**

11. Sobald die Zucht etabliert ist, sollte es möglich sein, je nach Prüfungsanforderungen wöchentlich oder weniger häufig frische Kulturen anzusetzen und die älteren Prüfgefäße nach dem Schlüpfen der Imagines zu entfernen. Auf diese Weise ist es möglich, mit nur geringem Aufwand ständig über Imagines zu verfügen.

**Zubereitung der Prüflösungen M4 und M7**

12. Das Medium M4 wurde von Elendt (1990) beschrieben. Das Medium M7 wird wie das Medium M4 zubereitet, mit Ausnahme der in Tabelle 1 angegebenen Substanzen, deren Konzentration bei M7 viermal niedriger ist als bei M4. Eine Veröffentlichung zum Medium M7 wird derzeit ausgearbeitet (Elendt, persönliche Mitteilung). Die Prüflösungen nicht nach den Anweisungen von Elendt und Bias (1990) zubereiten, da die für die Zubereitung der Stammlösungen angegebenen Konzentrationen von $NaSiO_3$ 5 $H_2O$, $NaNO_3$, $KH_2PO_4$ und $K_2HPO_4$ nicht geeignet sind.

**Herstellung des M7-Mediums**

13. Zunächst wird jede Stammlösung (I) einzeln zubereitet; diese Stammlösungen werden anschließend zu einer kombinierten Stammlösung (II) zusammengegossen (I) (siehe Tabelle 1). 50 ml der kombinierten Stammlösung (II) und die in Tabelle 2 angegebenen jeweiligen Mengen der Makronährstoffe werden zur Herstellung des M7-Mediums mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Durch Zugabe von drei Vitaminen gemäß Tabelle 3 zu entionisiertem Wasser wird eine kombinierte Vitamin-Stammlösung hergestellt, von der 0,1 ml vor der Verwendung dem fertigen M7-Medium zugesetzt werden. (Die Vitaminstammlösung wird in kleinen Portionen tiefgefroren aufbewahrt). Das Medium wird belüftet und stabilisiert.

*LITERATUR*

BBA (1995): Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Herausgeber: M. Streloke und H. Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

*Tabelle 1*

**Stammlösungen der Spurenelemente für das M4- und das M7-Medium**

| Stammlösungen (I) | Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird | Zur Herstellung der kombinierten Stammlösung (II): Folgende Mengen (ml) der Stammlösungen (I) mischen und mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter auffüllen | | Endkonzentrationen der Prüflösungen (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ (1) | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1) | 7 210 | 1,0 | 0,25 | 0,361 | 0,090 |
| LiCl (1) | 6 120 | 1,0 | 0,25 | 0,306 | 0,077 |
| RbCl (1) | 1 420 | 1,0 | 0,25 | 0,071 | 0,018 |
| $SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1) | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr (1) | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 1,0 | 1,0 | 0,013 | 0,013 |
| $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$ | 200 | 1,0 | 1,0 | 0,010 | 0,010 |
| KI | 65 | 1,0 | 1,0 | 0,0033 | 0,0033 |
| $Na_2SeO_3$ | 43,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0022 | 0,0022 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 1,0 | 1,0 | 0,00058 | 0,00058 |
| $Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2) | 5 000 | 20,0 | 5,0 | 2,5 | 0,625 |
| $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2) | 1 991 | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,249 |

(1) Diese Stoffe sind in M4 und M7 unterschiedlich dosiert (siehe oben).
(2) Diese Lösungen werden einzeln hergestellt, zusammengegossen und sofort autoklaviert.

*Tabelle 2*

**Makronährstoff-Stammlösungen für das M4- und das M7-Medium**

| | Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird | Zur Herstellung des M4- und des M7-Mediums zugesetzte Menge an Makronährstoff-Stammlösungen (ml/l) | Endkonzentrationen der Prüflösungen M4 und M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ | 293 800 | 1,0 | 293,8 |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 246 600 | 0,5 | 123,3 |
| KCl | 58 000 | 0,1 | 5,8 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1,0 | 64,8 |
| $NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$ | 50 000 | 0,2 | 10,0 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 0,1 | 0,274 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 0,1 | 0,143 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 0,1 | 0,184 |

▼**M4**

*Tabelle 3*

**Vitamin-Stammlösung für das M4- und das M7-Medium. Aus den drei Vitaminlösungen wird eine einzige Vitamin-Stammlösung hergestellt.**

| | Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird | Zur Herstellung des M4- und des M7-Mediums zugesetzte Menge an Vitamin-Stammlösung (ml/l) | Endkonzentrationen der Prüflösungen M4 und M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| Thiaminhydrochlorid | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Cyanocobalamin (B12) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Biotin | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

*LITERATUR*

Elendt B.P. (1990): Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. & W.-R. Bias (1990): Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

*Anlage 3*

ZUBEREITUNG DES FORMULIERTEN SEDIMENTS

**Zusammensetzung des Sediments**

Das formulierte Sediment sollte die folgende Zusammensetzung haben:

| Bestandteil | Charakterisierung | % des Trockengewichts des Sediments |
|---|---|---|
| Torf | Sphagnum-Torf, so nahe wie möglich bei pH 5,5 bis 6,0, ohne sichtbare Pflanzenreste, fein gemahlen (Partikelgröße ≤ 1 mm) und luftgetrocknet | 4 - 5 |
| Quarzsand | Korngröße: > 50 % der Partikel sollten Größen zwischen 50 und 200 µm aufweisen | 75 - 76 |
| Kaolin-Ton | Kaolinit-Gehalt ≥ 30 % | 20 |
| Organischer Kohlenstoff | Eingestellt durch Zugabe von Torf und Sand | 2 (± 0,5) |
| Calciumcarbonat | $CaCO_3$, pulverisiert, chemisch rein | 0,05 - 0,1 |
| Wasser | Leitfähigkeit ≤ 10 µS/cm | 30 - 50 |

**Zubereitung**

Der Torf wird luftgetrocknet und zu feinem Pulver zermahlen. Die erforderliche Menge an Torfpulver wird mit Hilfe eines Hochleistungshomogenisators in entionisiertem Wasser suspendiert und durch Zugabe von $CaCO_3$ auf einen pH-Wert von 5,5 ± 0,5 eingestellt. Diese Suspension wird bei 20 ± 2 °C für mindestens zwei Tage unter sanftem Rühren konditioniert, um den pH-Wert zu stabilisieren und eine Etablierung der mikrobiellen Fauna zu ermöglichen. Der pH-Wert wird erneut bestimmt und sollte bei 6,0 ± 0,5 liegen. Nun werden die übrigen Komponenten (Sand und Kaolin-Ton) sowie entionisiertes Wasser zur Torf-Wasser-Suspension hinzugegeben und zu einem homogenen Sediment vermischt, dessen Wassergehalt 30 bis 50 % des Trockengewichts des Sediments betragen sollte. Der pH-Wert der fertigen Mischung wird erneut gemessen und erforderlichenfalls mit $CaCO_3$ auf 6,5 bis 7,5 eingestellt. Sedimentproben nehmen, um das Trockengewicht und den Gehalt an organischem Kohlenstoff zu bestimmen. Es wird empfohlen, das formulierte Sediment vor dem Einsatz in einem Chironomiden-Toxizitätstest für sieben Tage unter denselben Bedingungen, wie sie im anschließenden Test herrschen, zu konditionieren.

**Lagerung**

Die trockenen Bestandteile für die Zubereitung des künstlichen Sediments können an einem trockenen und kühlen Ort bei Raumtemperatur gelagert werden. Das formulierte (feuchte) Sediment darf vor seiner Verwendung im Prüfversuch nicht gelagert werden. Es ist unmittelbar nach Ablauf der siebentägigen Konditionierung, mit der die Zubereitung abschließt, zu verwenden.

*LITERATUR*

Kapitel C.8 dieses Anhangs: Toxizität für Regenwürmer.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998): Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼M4

Anlage 4

**Chemische Eigenschaften eines geeigneten Verdünnungswassers**

| Substanz | Konzentration |
|---|---|
| Partikel | < 20 mg/l |
| Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffen | < 2 mg/l |
| Nichtionisiertes Ammonium | < 1 µg/l |
| Härte in $CaCO_3$ | < 400 mg/l (*) |
| Restchlor | < 10 µg/l |
| Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden | < 50 ng/l |
| Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen | < 50 ng/l |
| Gesamtgehalt an organischem Chlor | < 25 ng/l |

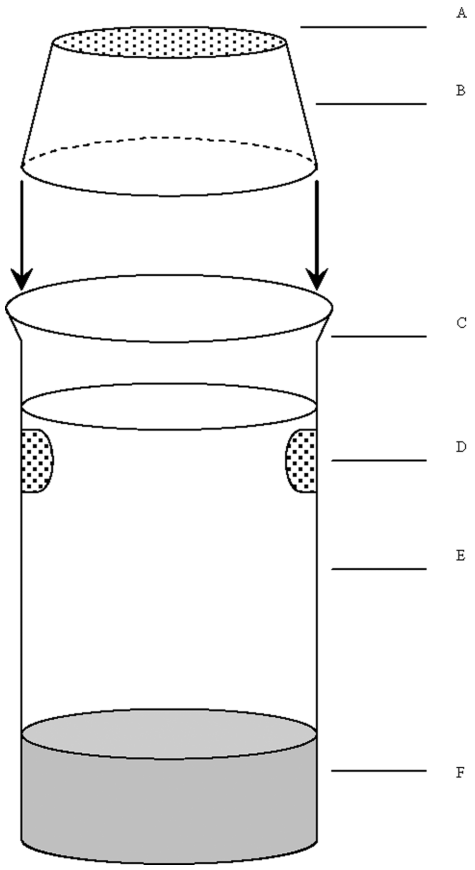
(*) Wird jedoch ein Ionenaustausch zwischen den Härteionen und der Prüfsubstanz vermutet, ist Wasser geringerer Härte zu verwenden (und somit ist in diesem Fall das Elendt-Medium M4 zu vermeiden).

▼**M4**

*Anlage 5*

**Empfehlungen für die Beobachtung des Schlüpfens der Chironomidenlarven**

Die Bechergläser werden ab dem 20. Tag bis zum Versuchsende mit Emergenzfallen abgedeckt. Nachstehend ist ein Beispiel für eine derartige Falle abgebildet:




A: Nylongaze

B: umgedrehte Plastikschalen

C: Becherglas ohne Ausguss

D: abgedeckte Öffnungen für den Wasseraustausch

E: Wasser

F: Sediment

▼M4

C. 28 **CHIRONOMIDEN-TOXIZITÄTSTEST IN SEDIMENT-WASSER-SYSTEMEN MIT GESPIKTEM WASSER**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 219 (2004). Sie dient der Bewertung der Wirkung einer Langzeitexposition gegenüber Chemikalien auf die sedimentbewohnenden Larven von *Chironomus* sp., einem in Frischwasser lebenden Zweiflügler. Die Methode basiert hauptsächlich auf der BBA-Richtlinie, bei der die Exposition anhand eines Sediment-Wasser-Testsystems mit Kunsterde und Wassersäule vorgenommen wird (1). Sie berücksichtigt auch die bestehenden Protokolle für Toxizitätstests mit *Chironomus riparius* und *Chironomus tentans*, die in Europa und Nordamerika (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) entwickelt und Ringtests (1)(6)(9) unterzogen wurden. Auch andere gut dokumentierte Chironomid-Arten wie *Chironomus yoshimatsui* (10)(11) sind geeignet.

2. Bei dem für diese Prüfmethode verwendeten Expositionsszenario wird das Wasser mit der Prüfsubstanz gespikt. Die Wahl des Szenarios hängt vom jeweiligen Testziel ab. Durch Dotieren (Spiken) der Wassersäule sollen Sprühverluste beim Aufbringen von Pestiziden simuliert und die Anfangsspitzen der Konzentrationen im Porenwasser erfasst werden. Die Methode eignet sich auch für andere Expositionsarten (einschließlich Austritt von Chemikalien), ausgenommen für Akkumulationsvorgänge, die länger dauern als der Test.

3. In der Regel haben die an sedimentbewohnenden Organismen zu testenden Substanzen eine lange Verweildauer in diesem Kompartiment. Sedimentbewohner können über verschiedene Wege exponiert werden. Die relative Bedeutung der einzelnen Expositionspfade und die Geschwindigkeit, mit der diese jeweils zu den gesamten toxischen Wirkungen beitragen, hängen von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der betreffenden Substanz ab. Für stark adsorbierende Substanzen (z. B. log $K_{ow}$ > 5) oder für kovalent an das Sediment gebundene Substanzen kann die Aufnahme von Schadstoffen über die Nahrung einen wichtigen Expositionspfad darstellen. Die Toxizität hoch lipophiler Substanzen sollte nicht unterschätzt werden, weshalb gegebenenfalls vor Applikation der Prüfsubstanz dem Sediment Futter hinzugegeben werden sollte. Um alle potenziellen Expositionspfade zu berücksichtigen, liegt der Schwerpunkt bei dieser Prüfmethode auf der Langzeitexposition. Die Testdauer beträgt 20 bis 28 Tage für *C. riparius* und *C. yoshimatsui* und 28 bis 65 Tage für *C. tentans*. Falls aus einem besonderen Grund, z. B. zur Untersuchung der Wirkungen von instabilen Chemikalien, Kurzzeitdaten benötigt werden, können nach dem 10. Versuchstag zusätzliche Replikate entnommen werden.

4. Als Endpunkte werden die Gesamtzahl der geschlüpften Imagines und die Emergenzzeit gemessen. Falls zusätzlich Kurzzeitdaten benötigt werden, sollten die Messungen der Überlebensrate und des Wachstums der Larven erst nach dem 10. Tag gegebenenfalls anhand zusätzlicher Replikate vorgenommen werden.

5. Es wird empfohlen, formuliertes Sediment zu verwenden, da es gegenüber natürlichen Sedimenten mehrere Vorteile hat:

— Die Variabilität zwischen den Versuchen ist nicht so groß, da formuliertes Sediment eine reproduzierbare „standardisierte Matrix“ ergibt und es nicht erforderlich ist, Quellen für unkontaminiertes, sauberes Sediment ausfindig zu machen;

— es kann jederzeit mit den Versuchen begonnen werden, ohne durch jahreszeitliche Schwankungen gestört zu werden und ohne dass eine Vorbehandlung zur Defaunierung des Sediments erforderlich wäre; die Verwendung von formuliertem Sediment reduziert auch die Kosten, die bei Feldprobenahmen ausreichender Sedimentmengen für Routineprüfungen anfallen;

▼M4

— die Verwendung formulierter Sedimente ermöglicht Toxizitätsvergleiche und die entsprechende Einstufung der Substanzen: Versuche mit natürlichen und künstlichen Sedimenten haben vergleichbare Toxizitätsdaten für mehrere Chemikalien ergeben (2).

6. Die verwendeten Begriffe sind in Anlage 1 definiert.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

7. Chironomidlarven des 1. Larvenstadiums (L1-Larven) werden gegenüber der Prüfsubstanz in verschiedenen Konzentrationen in Sediment-Wasser-Systemen exponiert. Der Versuch beginnt mit dem Einsetzen von L1-Larven in die Bechergäser mit dem Sediment-Wasser-System und dem Dotieren (Spiken) des Wassers mit der Prüfsubstanz. Zum Versuchsende werden Emergenz und Entwicklungsrate der Chironomiden bestimmt. Sofern erforderlich, können (gegebenenfalls anhand zusätzlicher Replikate) nach 10 Tagen Messungen der Überlebensrate und des Gewichts der Larven vorgenommen werden. Analysiert werden diese Daten entweder anhand eines Regressionsmodells, um die Konzentration zu ermitteln, die zu einer ×-%igen Verringerung der Emergenz-, Überlebens- oder Wachstumsrate der Larven führt (z. B. $EC_{15}$, $EC_{50}$ usw.), oder anhand statistischer Hypothesentests zur Bestimmung von NOEC/LOEC-Werten. Hierzu sind die Wirkungswerte anhand statistischer Tests mit Kontrollwerten zu vergleichen.

ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

8. Wasserlöslichkeit und Dampfdruck der Prüfsubstanz, ihre gemessene oder berechnete Verteilung im Sediment sowie ihre Stabilität im Wasser und im Sediment sollten bekannt sein. Ein zuverlässiges analytisches Verfahren für die Quantifizierung der Prüfsubstanz im Überstandswasser, Porenwasser und Sediment mit bekannter und dokumentierter Genauigkeit und Nachweisgrenze sollte vorhanden sein. Weitere nützliche Informationen sind die Strukturformel und der Reinheitsgrad der Prüfsubstanz sowie das chemische Schicksal der Prüfsubstanz (z. B. Verlustrate, abiotischer und biotischer Abbau usw.). Weitere Hinweise zu Prüfsubstanzen mit physikalisch-chemischen Merkmalen, welche die Durchführung des Tests erschweren, sind Quelle (12) zu entnehmen.

REFERENZSUBSTANZEN

9. Referenzsubstanzen können regelmäßig getestet werden, um auf diese Weise die Zuverlässigkeit des Prüfprotokolls und der Prüfbedingungen zu gewährleisten. Beispiele von Referenzgiftstoffen, die erfolgreich in Ringtests und Validierungsstudien verwendet werden: Lindan, Trifluralin, Pentachlorphenol, Cadmiumchlorid und Kaliumchlorid (1)(2)(5)(6)(13).

GÜLTIGKEIT DER ERGEBNISSE

10. Der Test ist gültig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

— Die Emergenz in den Kontrollen muss am Ende des Tests mindestens 70 % betragen. (1)(6);

— erste Imagines von *C. riparius* und *C. yoshimatsui* sollten zwischen dem 12. und dem 23. Tag nach dem Einsetzen der Tiere in die Prüfgefäße schlüpfen; für *C. tentans* sind 20 bis 65 Tage erforderlich;

— zum Versuchsende sind der pH-Wert und die Konzentration an gelöstem Sauerstoff zu messen. Der Sauerstoffgehalt sollte mindestens 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes betragen und der pH-Wert des Überstandswassers sollte in allen Prüfgefäßen zwischen 6 und 9 liegen;

▼M4

— die Wassertemperatur sollte nicht mehr als ± 1,0 °C schwanken; sie kann mit Hilfe einer Klimakammer kontrolliert werden, wobei in diesem Fall die Raumtemperatur in angemessenen Zeitabständen zu bestimmen ist.

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Prüfgefäße**

11. Der Versuch wird in 600-ml-Glasbechergläsern mit einem Durchmesser von 8 cm durchgeführt. Andere Gefäße sind ebenfalls geeignet, sofern sie eine entsprechende Höhe von Überstandswasser und Sediment fassen. Die Sedimentoberfläche sollte 2 bis 3 $cm^2$ pro Larve bieten. Das Verhältnis zwischen Sedimentschicht und Überstandswasser sollte 1:4 betragen. Die Prüfgefäße und sonstigen Geräte, die mit dem Prüfsystem in Kontakt kommen, müssen vollständig aus Glas oder einem anderen chemisch inerten Material (z. B. Teflon) bestehen.

**Wahl der Testspezies**

12. Als Testspezies sollte bevorzugt *Chironomus riparius* eingesetzt werden. *Chironomus tentans* ist ebenfalls geeignet, lässt sich aber schwieriger handhaben und erfordert eine längere Prüfdauer. Auch *Chironomus yohimatsui* kann verwendet werden. Einzelheiten zu den Anzuchtverfahren für *Chironomus riparius* sind in Anlage 2 enthalten. Informationen zu den Anzuchtbedingungen sind auch für andere Arten (*Chironomus tentans* (4) und *Chironomus yoshimatsui* (11)) verfügbar. Die Identität der Spezies ist vor der Prüfung zu bestätigen, allerdings ist dies nicht vor jedem Test erforderlich, wenn die Organismen aus laboreigener Zucht stammen.

**Sediment**

13. Vorzugsweise ist formuliertes Sediment (so genanntes rekonstituiertes, künstliches oder synthetisches Sediment) zu verwenden. Wenn jedoch natürliches Sediment verwendet wird, so ist es zu charakterisieren (zumindest pH-Wert und Gehalt an organischem Kohlenstoff; die Bestimmung sonstiger Parameter wie C/N-Verhältnis und Granulometrie wird ebenfalls empfohlen). Auch sollte es frei von Verunreinigungen sowie Konkurrenten und Fressfeinden der Chironomiden sein. Ferner wird empfohlen, natürliches Sediment vor seiner Verwendung in einem Chironomiden-Toxizitätstest für sieben Tage unter denselben Bedingungen, wie sie im anschließenden Test herrschen, zu konditionieren. Für diesen Test wird auf der Grundlage der in der Prüfmethode C.8 (14) verwendeten Kunsterde folgendes formuliertes Sediment empfohlen (1)(15)(16):

a) 4-5 % (bezogen auf die Trockenmasse) Torf: so nahe wie möglich bei pH 5,5 bis 6,0; wichtig: Torf in Pulverform, feingemahlen (Partikelgröße ≤ 1 mm) und nur luftgetrocknet, verwenden;

b) 20 % (bezogen auf die Trockenmasse) Kaolin-Ton (Kaolingehalt vorzugsweise über 30 %);

c) 75-76 % (bezogen auf die Trockenmasse) Quarzsand (hauptsächlich Feinsand, der zu mehr als 50 % eine Korngröße von 50 bis 200 µm aufweist;

d) der Feuchtegehalt der fertigen Mischung wird durch die Zugabe von entionisiertem Wasser auf einen Wert zwischen 30 % und 50 % eingestellt;

e) durch die Zugabe von chemisch reinem Calciumcarbonat ($CaCO_3$) wird die fertige Mischung des Sediments auf einen pH-Wert von 7,0 ± 0,5 eingestellt.

f) der Gehalt der fertigen Mischung an organischem Kohlenstoff sollte 2 % (± 0,5 %) betragen und ist durch Zugabe geeignete Mengen Torf und Sand (siehe Buchstaben a und c) zu gewährleisten.

▼M4

14. Die Herkunft von Torf, Kaolin-Ton und Sand sollte bekannt sein. Es sollte kontrolliert werden, dass die Bestandteile des Sediments nicht chemisch verunreinigt sind (z. B. durch Schwermetalle, chlororganische Verbindungen, phosphororganische Verbindungen usw.). Ein Beispiel für die Herstellung des formulierten Sediments ist in Anlage 3 beschrieben. Die Bestandteile können auch in trockenem Zustand gemischt werden, sofern nachgewiesen ist, dass es nach Zugabe des Überstandswassers nicht zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile kommt (z. B. schwimmende Torfpartikel) und dass der Torf oder das Sediment ausreichend konditioniert ist.

**Wasser**

15. Alle Wassersorten, die den chemischen Eigenschaften von zugelassenem Verdünnungswasser gemäß den Anlagen 2 und 4 entsprechen, sind als Testwasser geeignet. Natürliches Wasser (Oberflächen- oder Grundwasser), rekonstituiertes Wasser (siehe Anlage 2) oder entchlortes Leitungswasser sind als Hälterungs- und Verdünnungswasser zulässig, wenn die Chironomiden hierin während der Zucht- und Testphase ohne Stressanzeichen überleben. Zu Testbeginn sollte der pH-Wert des Testwassers zwischen 6 und 9 liegen und die Gesamthärte des Wassers sollte nicht mehr als 400 mg/l (in $CaCO_3$) betragen. Wird jedoch ein Ionenaustausch zwischen den Härteionen und der Prüfsubstanz vermutet, ist Wasser geringerer Härte zu verwenden (und somit in diesem Fall das Elendt-Medium M4 zu vermeiden). Das Wasser muss über die gesamte Testdauer von gleichbleibender Qualität sein. Die Qualitätsparameter des Wassers gemäß Anlage 4 sind mindestens zweimal jährlich bzw. immer dann zu messen, wenn der Verdacht besteht, dass sie sich erheblich verändert haben.

**Stammlösungen — Gespiktes Wasser**

16. Die Testkonzentrationen werden auf der Grundlage der Konzentrationen in der Wassersäule, d. h. im Überstandswasser, berechnet. Die Prüflösungen werden in der Regel durch Verdünnung einer Stammlösung in den gewünschten Konzentrationen zubereitet. Stammlösungen sollten möglichst durch Auflösung der Substanz im Prüfmedium hergestellt werden. In einigen Fällen kann der Einsatz von Lösungs- oder Dispersionsmitteln erforderlich sein, um eine Stammlösung von geeigneter Konzentration zu erzielen. Geeignete Lösungsmittel sind beispielsweise Aceton, Ethanol, Methanol, Ethylenglykol-Monomethylether, Ethylenglykol-Dimethylether, Dimethylformamid und Triethylenglykol. Geeignete Dispersionsmittel sind beispielsweise Cremophor RH40, Tween 80, Methylzellulose 0,01 % und HCO-40. Die Konzentration des Lösungsvermittlers in dem endgültigen Prüfmedium sollte auf ein Mindestmaß (d.h. $\leq$ 0,1 ml/l) beschränkt und bei allen Behandlungen gleich sein. Wird ein Lösungsvermittler verwendet, so darf er keine signifikanten Auswirkungen auf das Überleben und keine erkennbaren nachteiligen Auswirkungen auf die Chironomiden-Larven haben, was durch eine nur mit Lösungsmittel vorgenommene Kontrolle nachzuweisen ist. Es sollten jedoch alle Anstrengungen unternommen werden, um den Einsatz derartiger Stoffe zu vermeiden.

VERSUCHSAUFBAU

17. Unter „Versuchsaufbau“ sind die gewählte Anzahl und der Abstand der Testkonzentrationen, die Anzahl der Prüfgefäße je Konzentration und die Anzahl der Larven je Gefäß zu verstehen. Beschrieben werden die Verfahren für die Bestimmung der EC-Werte und der NOEC-Werte und für die Durchführung eines Limit-Tests. Regressionsanalysen sind Hypothesentest vorzuziehen.

*Versuchsaufbau für die Regressionsanalyse*

18. Die im Test verwendeten Konzentrationen müssen in jedem Fall die Wirkungskonzentration (z. B. $EC_{15}$, $EC_{50}$) und den Konzentrationsbereich, in dem die Wirkung der Prüfsubstanz von Interesse ist, einschließen. Bei der Bestimmung von Wirkungskonzentrationen ($EC_x$) wird in der Regel eine größere Genauigkeit und insbesondere Validität erzielt, wenn die

▼M4

Wirkungskonzentration im Bereich der getesten Konzentrationen liegt. Extrapolierungen weit unter der niedrigsten positiven Konzentration oder über der höchsten Konzentration sind zu vermeiden. Ein Vorversuch kann die Auswahl der zu verwendenden Konzentrationsspanne erleichtern (siehe Nummer 27).

19. Für die Bestimmung von $EC_x$ sollten mindestens fünf Konzentrationen und drei Replikate jeder Konzentration getestet werden. Im Interesse einer angemessenen Modellierung ist es in jedem Fall ratsam, eine hinreichende Anzahl an Konzentrationen zu testen. Die Konzentrationen sollten sich um einen Faktor von nicht mehr als 2 unterscheiden (außer bei einer schwachen Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve). Die Anzahl der Replikate pro Behandlung kann reduziert werden, wenn die Anzahl der Prüfkonzentrationen mit unterschiedlicher Wirkung erhöht wird. Eine höhere Anzahl an Replikaten oder eine Verkürzung der Intervalle zwischen den Prüfkonzentrationen führt tendenziell zu engeren Konfidenzintervallen für den Test. Zur Bestimmung der Überlebensrate und des Wachstums der Larven nach 10 Tagen sind zusätzliche Replikate erforderlich.

*Versuchsaufbau für die Bestimmung von NOEC/LOEC-Werten*

20. Zur Bestimmung von LOEC- oder NOEC-Werten sollten fünf Prüfkonzentrationen mit mindestens vier Replikaten pro Konzentration verwendet werden, wobei sich die Konzentrationen um einen Faktor von nicht mehr als 2 unterscheiden sollten. Es sollten so viele Replikate verwendet werden, dass sich im Hinblick auf eine angemessene statistische Aussagekraft bei einem Signifikanzniveau von 5 % ($p = 0,05$) eine Differenz von 20 % zur Kontrollkonzentration nachweisen lässt. Für die Entwicklungsrate eignen sich in der Regel Varianzanalysen (ANOVA) wie der Dunnett-Test und der Williams-Test (17)(18)(19)(20). Für die Schlupfrate kann der Cochran-Armitage-Test, der Exakte Test nach Fisher (mit Bonferroni-Korrektur) oder der Mantel-Haenszel-Test herangezogen werden.

*Limit-Test*

21. Falls der Vorversuch keine Wirkungen zeigt, kann ein Limit-Test (mit einer Prüfkonzentration und einer Kontrolle) durchgeführt werden. Mit dem Limit-Test soll nachgewiesen werden, dass der toxische Wert der Prüfsubstanz über der getesteten Limitkonzentration liegt. Für diese Prüfmethode kann keine Konzentration empfohlen werden; dies bleibt den Regulierungsbehörden überlassen. In der Regel sind jeweils mindestens sechs Replikate pro Behandlung und Kontrolle erforderlich. Es ist nachzuweisen, dass die statistische Aussagekraft ausreicht, um bei einem Signifikanzniveau von 5 % ($p = 0,05$) eine Differenz von 20 % zur Kontrollkonzentration festzustellen. Für metrische Merkmale (Entwicklungsrate und Gewicht) ist der t-Test eine geeignete statistische Methode, sofern die Daten die Bedingungen für diesen Test (Normalverteilung, Varianzhomogenität) erfüllen. Sind diese Bedingungen nicht erfüllt, so kann ein t-Test für ungleiche Varianzen oder ein nicht-parametrischer Test wie der Wilcoxon-Mann-Whithey-Test verwendet werden. Für die Schlupfrate eignet sich der Exakte Test nach Fisher.

PRÜFVERFAHREN

**Expositionsbedingungen**

*Zubereitung des Wasser-Sediment-Systems mit gespiktem Wasser*

22. In die Prüfgefäße wird formuliertes Sediment (siehe Nummern 13 und 14 sowie Anlage 3) in ausreichender Menge gegebenen, um eine mindestens 1,5 cm dicke Schicht zu erhalten, die anschließend mit 6 cm Wasser (siehe Nummer 15) überschichtet wird. Das Verhältnis von Sediment zu Wasser sollte nicht mehr als 1:4 und die Sedimenthöhe nicht mehr als 3 cm betragen. Das Sediment-Wasser-System sollte vor dem Einsetzen der Testorganismen für 7 Tage moderat belüftet werden (siehe Nummer 14 und Anlage 3). Um zu verhindern, dass es während der Zugabe von Prüfwasser in die Wassersäule zu einer Auftrennung der Sedimentbestandteile und einer Resuspension der feinen Partikel kommt, kann das Sediment beim Einfüllen des Wassers mit einer Plastikschale abgedeckt werden, die anschließend sofort entfernt wird. Andere Hilfsmittel sind ebenfalls geeignet.

▼M4

23. Die Prüfgefäße sollten abgedeckt werden (z. B. mit Glasplatten). Etwaige Verdunstungsverluste im Laufe des Versuchs sind auszugleichen, und zwar mit destilliertem oder entionisiertem Wasser, um Salzfreiheit zu gewährleisten.

*Einsetzen der Testorganismen*

24. Vier bis fünf Tage vor dem Einsetzen der Testorganismen in die Prüfgefäße werden Eigelege aus der Zucht entnommen und in kleinen Gefäßen in das Kulturmedium eingesetzt. Es kann „altes" Medium aus den Stammkulturen oder frisch zubereitetes Medium verwendet werden. In letzterem Fall wird eine geringe Futtermenge, z. B. Grünalgen und/oder einige Tropfen des Filtrats einer Suspension aus fein zerkleinerten Fischfutterflocken, zum Kulturmedium hinzugegeben (siehe Anlage 2). Es sollten nur frische Eigelege verwendet werden. Normalerweise beginnen die Larven einige Tage nach dem Einsetzen der Eier zu schlüpfen (*Chironomus riparius*: 2 bis 3 Tage bei 20 °C, *Chironomus tentans* und *Chironomus yoshimatsui*: 1 bis 4 Tage bei 23 °C bzw. 25 °C) und durchlaufen während ihres Wachstums vier Stadien von jeweils 4 bis 8 Tagen. Für den Versuch sollten Larven des ersten Larvenstadiums (L1) (2 bis 3 Tage oder 1 bis 4 Tage nach dem Schlüpfen) verwendet werden. Das Larvenstadium kann anhand der Kopfkapselbreite bestimmt werden (6).

25. Jeweils 20 L1-Larven werden nach dem Zufallsprinzip mit einer stumpfen Pipette in die einzelnen Prüfgefäße eingesetzt, die das gespikte Sediment und Wasser enthalten. Während des Einsetzens der Larven in das Prüfgefäß und der folgenden 24 Std. (siehe Nummern 24 und 32) wird die Belüftung gestoppt. Je nach Versuchsaufbau (siehe Nummern 19 und 20) werden pro Konzentration mindestens 60 Larven zur Bestimmung der EC-Punktschätzung und mindestens 80 Larven zur Bestimmung der NOEC-Werte verwendet.

26. 24 Std. nach dem Einsetzen der Larven wird die Prüfsubstanz in die Wassersäule gespikt, und es wird erneut leicht belüftet. Kleine Mengen der Prüfsubstanz werden mit Hilfe einer Pipette unterhalb der Oberfläche der Wassersäule injiziert. Anschließend sollte das Überstandswasser vorsichtig gemischt werden, um das Sediment nicht aufzuwirbeln.

*Prüfkonzentrationen*

27. Zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs für den endgültigen Test kann ein Vorversuch hilfreich sein. Hierzu wird eine Reihe von weit auseinander liegenden Konzentrationen der Prüfsubstanz verwendet. Um dieselbe Besiedlungsdichte der Oberfläche durch die Chironomiden wie im eigentlichen Versuch zu reproduzieren, werden die Chironomiden jeder Konzentration der Prüfsubstanz über einen Zeitraum ausgesetzt, mit dem sich die geeigneten Prüfkonzentrationen ermitteln lassen; Replikate sind nicht erforderlich.

28. Die Prüfkonzentrationen für den endgültigen Test werden auf der Grundlage der Ergebnisse des Vorversuchs festgelegt. Es sollten mindestens fünf Konzentrationen (siehe Nummern 18 bis 20) ausgewählt und verwendet werden.

*Kontrollgefäße*

29. In den Versuch sind Kontrollgefäße mit unbehandeltem Sediment und einer ausreichenden Anzahl von Replikaten einzubeziehen (siehe Nummern 19 und 20). Wurde die Prüfsubstanz mit Hilfe eines Lösungsmittel appliziert (siehe Nummer 16), so ist ein Kontrollgefäß hinzuzufügen, dessen Sediment das Lösungsmittel enthält.

▼M4

*Prüfsystem*

30. Es werden statische Prüfsysteme verwendet. Semi-statische oder Durchflusssysteme, bei denen das Überstandswasser in bestimmten Intervallen bzw. kontinuierlich ersetzt wird, können in Ausnahmefällen verwendet werden, z. B. wenn die Spezifikationen zur Wasserqualität für den Testorganismus nicht mehr geeignet sind oder sich auf das chemische Gleichgewicht auswirken (z. B. wenn die Konzentration an gelöstem Sauerstoff zu stark abnimmt, die Konzentration der Ausscheidungen zu stark zunimmt oder aus dem Sediment ausgewaschene Mineralien den pH-Wert und/oder die Wasserhärte beeinflussen). Allerdings reichen andere Methoden zur Verbesserung der Qualität des Überstandswassers wie die Belüftung aus und sollten bevorzugt angewendet werden.

*Futter*

31. Die Larven sollten täglich, mindestens jedoch dreimal pro Woche gefüttert werden. Für jüngere Larven scheinen in den ersten 10 Tagen 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg für *C. yoshimatui*) Fischfutter (in Wasser suspendiertes oder fein zerkleinertes Futter, z. B. TetraMin oder TetraPhyll; Einzelheiten siehe Anlage 2) pro Larve und Tag angemessen. Ältere Larven benötigen etwas mehr Nahrung: Für den Rest des Versuchs dürften 0,5-1 mg Futter pro Larve und Tag ausreichen. Bei Pilzbesatz oder Absterben von Kontrollorganismen wird die Futterration für alle behandelten Organismen und Kontrollorganismen reduziert. Lässt sich die Pilzentwicklung nicht stoppen, muss der Versuch wiederholt werden. Bei Versuchen mit stark adsorbierenden Substanzen (z. B. log $K_{ow}$ > 5) oder kovalent an das Sediment gebundenen Substanzen kann dem formulierten Sediment die für das Überleben und natürliche Wachstum der Organismen erforderliche Futtermenge vor der Stabilisierungsphase hinzugefügt werden. In diesem Fall wird das Fischfutter durch pflanzliches Material ersetzt, z. B. durch Zugabe von 0,5 % (Trockengewicht) feingeriebene Blätter z. B. von Brennnessel (*Urtica dioica*), Maulbeere (*Morus alba*), Weiß-Klee (*Trifolium repens*) oder Spinat (*Spinacia oleracea*) oder von sonstigem pflanzlichen Material (*Cerophyl* oder Alphacellulose).

*Inkubationsbedingungen*

32. Das Überstandswasser in den Prüfgefäßen wird vorzugsweise 24 Std. nach dem Einsetzen der Larven über den gesamten Versuchszeitraum moderat belüftet (Es ist darauf zu achten, dass die Konzentration an gelöstem Sauerstoff nicht unter 60 % des Luftsauerstoff-Sättigungswertes fällt). Für die Belüftung (eine oder mehrere Blasen/sek.) wird eine Glaspasteurpipette 2 bis 3 cm über der Sedimentschicht angebracht. Bei flüchtigen Prüfsubstanzen ist gegebenenfalls von einer Belüftung des Sediment-Wasser-Systems abzusehen.

33. Der Test wird bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 °C (± 2 °C) durchgeführt. Für *C. tentans* und *C. yoshimatsui* wird eine Temperatur von 23 °C bzw. 25 °C (± 2 °C) empfohlen. Die Photoperiode beträgt 16 Std. und die Beleuchtungsstärke 500 bis 1 000 lux.

*Expositionsdauer*

34. Die Exposition beginnt mit dem Einsetzen der Larven in die Gefäße mit dem gespikten Wasser und in die Kontrollgefäße. Die maximale Expositionsdauer beträgt 28 Tage für *C. riparius* und *C yoshimatsui* und 65 Tage für *C. tentans*. Falls die Mücken früher schlüpfen, kann der Versuch frühestens fünf Tage nach dem Schlüpfen der letzten Kontrollimago beendet werden.

BEOBACHTUNGEN

*Emergenz*

35. Es werden die Entwicklungsdauer und die Anzahl der vollständig geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken bestimmt. Männchen sind leicht an den gefiederten Antennen zu erkennen.

▼M4

36. Die Prüfgefäß sollten dreimal wöchentlich visuell auf Verhaltensänderungen (z. B. Verlassen des Sediments, ungewöhnliches Schwimmverhalten) gegenüber den Kontrollgefäßen überprüft werden. Während der Schlupfzeit müssen täglich die geschlüpften Tiere gezählt werden. Geschlecht und Anzahl der vollständig geschlüpften Mücken sind täglich festzuhalten. Danach werden die geschlüpften Mücken aus den Prüfgefäßen entfernt. Vor dem Versuchsende abgelegte Eigelege sind im Protokoll zu vermerken und anschließend zu entfernen, um zu verhindern, dass erneut Larven in das Sediment gelangen. Die Anzahl der sichtbaren Puppen, die nicht geschlüpft sind, wird ebenfalls protokolliert. Anweisungen zur Messung der Emergenz sind Anlage 5 zu entnehmen.

*Wachstum und Überleben*

37. Müssen Daten zum Überleben und Wachstum der Larven nach 10 Tagen ermittelt werden, so sollten bereits ab Versuchsbeginn zusätzliche Prüfgefäße hinzugefügt werden, die dann später verwendet werden können. Das Sediment aus diesen zusätzlichen Gefäßen wird durch ein 250-µm-Sieb gesiebt, um die Larven auszusieben. Kriterien zur Bestimmung des Todes sind Bewegungslosigkeit oder mangelnde Reaktion auf mechanische Reize. Nicht wiedergefundene Larven sollten auch zu den Todesfällen gerechnet werden (Larven, die zu Versuchsbeginn gestorben sind, wurden möglicherweise durch Mikroben zersetzt). Nachdem das (aschefreie) Trockengewicht der überlebenden Larven pro Prüfgefäß bestimmt wurde, wird das mittlere Trockengewicht der einzelnen Larven pro Prüfgefäß berechnet. Es ist nützlich festzustellen, zu welchem Larvenstadium die überlebenden Larven gehören, was anhand der Kopfkapselbreite der einzelnen Larven bestimmt werden kann.

**Analysemessungen**

*Konzentration der Prüfsubstanz*

38. Es wird unbedingt empfohlen, zu Beginn (vorzugsweise 1 Stunde nach Applikation der Prüfsubstanz) und am Ende des Versuchs Proben des Überstandswassers, des Porenwassers und des Sediments zumindest in der Höchstkonzentration und einer niedrigeren Konzentration zu analysieren. Diese Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz gibt Aufschluss über das Verhalten/die Verteilung der Prüfsubstanz im Wasser-Sediment-System. Die Entnahme von Sedimentproben zu Versuchsbeginn kann das Prüfsystem beeinflussen (Entfernen von Testlarven), so dass zusätzliche Prüfgefäße vorzusehen sind, um die Analysemessungen zu Beginn und gegebenenfalls während des Versuchs (siehe Nummer 39) vorzunehmen. Es ist nicht unbedingt notwendig, das Sediment zu analysieren, wenn die Verteilung der Prüfsubstanz zwischen Wasser und Sediment eindeutig in einer unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführten Wasser/Sediment-Studie bestimmt wurde (z. B. Sediment-Wasser-Verhältnis, Applikationsart, Gehalt an organischem Kohlenstoff im Sediment).

39. Falls Zwischenmessungen (z. B. am 7. Tag) vorgenommen werden und für die Analyse größere Proben erforderlich sind, die nicht aus den Prüfgefäßen entnommen werden können, ohne das Testsystem zu beeinflussen, sollten die Analysemessungen an Proben aus zusätzlichen Prüfgefäßen vorgenommen werden, die derselben Behandlung (einschließlich Präsenz von Testorganismen) unterzogen, aber nicht für biologische Beobachtungen verwendet wurden.

40. Eine 30-minütige Zentrifugation bei z. B. 10 000 g und 4 °C wird empfohlen, um das Interstitialwasser abzutrennen. Bei Prüfsubstanzen, die nachweislich nicht an Filtern anlagern, kann auch filtriert werden. Bei zu kleinen Proben kann es passieren, dass sich die Konzentrationen im Porenwasser nicht analysieren lassen.

▼M4

*Physikalisch-chemische Parameter*

41. pH-Wert, Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Prüfwasser und Temperatur der Prüfgefäße sind auf geeignete Weise zu messen (siehe Nummer 10). Zu Beginn und am Ende des Versuchs sind Härte und Ammonium-Gehalt in den Kontrollgefäßen und in einem Prüfgefäß in der Höchstkonzentration zu bestimmen.

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

*Auswertung der Ergebnisse*

42. Ziel dieses Versuchs ist, die Wirkung der Prüfsubstanz auf die Entwicklungsrate und die Gesamtanzahl der vollständig geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken bzw. im Falle des 10-Tage-Versuchs die Wirkungen auf Überleben und Gewicht der Larven zu bestimmen. Gibt es keinerlei Hinweise auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Geschlechter, werden die Ergebnisse für Männchen und Weibchen für die statistischen Analysen gepoolt. Unterschiedliche Empfindlichkeiten der Geschlechter können statistisch z. B. anhand eines Tafeltests mit $\chi^2$-r × 2 bewertet werden. Erforderlichenfalls sind nach 10 Tagen Daten zur Überlebensrate der Larven und zum mittleren Trockengewicht der einzelnen Larven pro Prüfgefäß zu ermitteln.

43. Die als Konzentration im Überstandswasser ausgedrückten Effektkonzentrationen sind möglichst auf der Grundlage der zu Testbeginn gemessenen Konzentrationen (siehe Nummer 38) zu berechnen.

44. Für eine Punktschätzung von $EC_{50}$ oder einem anderen $EC_x$ können die pro Gefäß erstellten Statistiken als echte Replikate dienen. Bei der Berechnung eines Konfidenzintervalls für einen beliebigen $EC_x$-Wert ist die Variabilität zwischen den Gefäßen zu berücksichtigen oder nachzuweisen, dass diese Variabilität so klein ist, dass sie übergangen werden kann. Wird das Modell nach der Methode der geringsten Abweichungsquadrate angepasst, so sollten die pro Gefäß erstellten Statistiken transformiert werden, um die Varianzhomogenität zu verbessern. Allerdings werden die $EC_x$-Werte berechnet, nachdem die Ergebnisse auf den ursprünglichen Wert rücktransformiert wurden.

45. Wenn die statistische Analyse darauf abzielt, NOEC/LOEC-Werte anhand von Hypothesentests zu bestimmen, so ist die Variabilität zwischen den Prüfgefäßen zu berücksichtigen, z. B. mit Hilfe einer geschachtelten (nested) Varianzanalyse (ANOVA). Alternativ können in den Fällen, in denen von den herkömmlichen ANOVA-Annahmen abgewichen wird, robustere Tests (21) angewendet werden.

*Schlupfrate*

46. Schlupfraten sind quantale Daten und können anhand des Cochran-Armitage-Tests im Step-Down-Verfahren analysiert werden, wenn eine monotone Dosis-Antwort erwartet wird und die Schlupfdaten dieser Erwartung entsprechen. Andernfalls können ein Exakter Test nach Fisher oder ein Mantel-Haenszel-Test mit Bonferroni-Holm-angepassten p-Werten verwendet werden. Ist die Variabilität zwischen den Replikaten mit derselben Konzentration nachweislich größer als eine Binomialverteilung ergeben würde (häufig als „extra-binomiale“ Variation bezeichnet), so sollte ein robusterer Test (Cochran-Armitage-Test oder Exakter Test nach Fisher), wie in (21) vorgeschlagen, angewendet werden.

47. Die Summe geschlüpfter Mücken (ne) je Prüfgefäß wird bestimmt und durch die Anzahl der eingesetzten Larven (na) dividiert:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼**M4**

Dabei sind:

$ER$ = Schlupfrate

$n_e$ = Anzahl der geschlüpften Mücken je Prüfgefäß

$n_a$ = Anzahl der eingesetzten Larven je Prüfgefäß

48. Eine alternative Methode, die sich bei größeren Proben im Falle einer extra-binomialen Varianz eher eignet, besteht darin, die Schlupfrate als kontinuierliche Antwort zu behandeln und Methoden wie den Williams-Test anzuwenden, wenn eine monotone Dosis-Antwort erwartet wird und die Schlupfraten dies bestätigen. Der Dunnett's-Test eignet sich für den Fall, dass die Monotonie nicht anhält. Als große Probe gilt hier eine Probe, bei der die Anzahl der geschlüpften Mücken und die Anzahl der nicht geschlüpften Mücken jeweils mehr als fünf pro Replikat(gefäß) beträgt.

49. Für die Anwendung von ANOVA-Methoden sollten die ER-Werte zunächst einer arcsin-Wurzel-Transformation oder Freeman-Tukey-Transformation unterzogen werden, um annähernd normal verteilte Daten und Homogenität der Varianzen zu erreichen. Bei der Verwendung von absoluten Frequenzen können auch der Cochran-Armitage-, der Exakte Test nach Fisher (mit Bonferroni-Korrektur) oder der Mantel-Haenszel-Test angewendet werden. Bei der arcsin-Wurzel-Transformation wird die Umkehrfunktion des Sinus ($\sin^{-1}$) der Wurzel von ER berechnet.

50. Für Schlupfraten werden die $EC_x$-Werte mittels Regressionsanalyse (oder z. B. mit der Probit- (22), Logit-, Weibull-Methode, geeigneter kommerzieller Software usw.) berechnet. Versagt die Regressionsanalyse (z. B. bei weniger als zwei Teilantworten), so werden andere nicht-parametrische Methoden wie die Berechnung des gleitenden Durchschnitts oder eine einfache Interpolation angewendet.

*Entwicklungsrate*

51. Die mittlere Entwicklungszeit repräsentiert die mittlere Zeitspanne zwischen dem Einsetzen der Larven (Tag 0 des Versuchs) und dem Schlupf der in die Prüfgefäße eingesetzten Mückenkohorten. (Für die Berechnung der reellen Entwicklungszeit ist das Alter der Larven beim Einsetzen in die Prüfgefäße zu berücksichtigen). Die Entwicklungsrate ist der Reziprokwert der Entwicklungszeit (Einheit: 1/Tag) und repräsentiert den Teil der Larven, die sich pro Tag entwickeln. Für die Bewertung der Sedimenttoxizität ist die Entwicklungsrate zu bevorzugen, da sie im Vergleich zur Entwicklungszeit eine geringere Varianz aufweist und ihre Werte homogener sind und näher an der Normalverteilung liegen. Aus diesem Grund eignen sich parametrische Verfahren mit großer Teststärke eher für die Entwicklungsrate als für die Entwicklungszeit. Wird die Entwicklungsrate als kontinuierliche Antwort behandelt, so können die $EC_x$-Werte mittels Regressionsanalyse geschätzt werden (z. B. (23), (24)).

52. Für folgende statistische Tests gilt die Anzahl der am Kontrolltag × beobachteten Mücken als die Anzahl der Mücken, die in der Mitte des Zeitintervalls zwischen dem Tag x und dem Tag x - l geschlüpft sind (l = Länge des Kontrollintervalls, gewöhnlich 1 Tag). Die mittlere Entwicklungsrate je Prüfgefäß berechnet sich folgendermaßen:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

Dabei sind:

($\bar{x}$): mittlere Entwicklungsrate je Prüfgefäß

i: Index des Kontrollintervalls

m: maximale Anzahl der Kontrollintervalle

▼**M4**

$f_i$: Anzahl der Mücken, die im Kontrollintervall i geschlüpft sind

$n_e$: Gesamtzahl der geschlüpften Mücken bei Versuchsende ($=\sum f_i$)

$x_i$: Entwicklungsrate der geschlüpften Mücken im Intervall i

$$x_i = 1/\left(\mathrm{Tag}_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

Dabei sind:

$\mathrm{Tag}_i$: Kontrolltag (Tage seit der Applikation)

$l_i$: Länge des Kontrollintervalls i (Tage, in der Regel 1 Tag)

**Prüfbericht**

53. Der Prüfbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

*Prüfsubstanz:*

— physikalischer Zustand und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften (Wasserlöslichkeit, Dampfdruck, Verteilungskoeffizient im Boden (oder — falls verfügbar — im Sediment), Stabilität im Wasser usw.);

— chemische Kenndaten (Common name, chemische Bezeichnung, Strukturformel, CAS-Nummer usw.) einschließlich Reinheitsgrad und Analyseverfahren zur Quantifizierung der Prüfsubstanz.

*Testspezies:*

— eingesetzte Testtiere: Art, wissenschaftlicher Name, Bezugsquelle der Testorganismen und Zuchtbedingungen;

— Informationen über die Handhabung der Eigelege und Larven;

— Alter der Tiere beim Einsetzen in die Prüfgefäße.

*Prüfbedingungen:*

— verwendetes Sediment, d. h. natürliches oder formuliertes Sediment;

— für natürliches Sediment: Ort und Beschreibung der Probenahmestelle(n) für das Sediment, möglichst einschließlich etwaiger früherer Kontaminationen; Merkmale: pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff, C/N-Verhältnis und gegebenenfalls Granulometrie;

— Zubereitung des formulierten Sediments: Zutaten und Merkmale (Gehalt an organischem Kohlenstoff, pH-Wert, Feuchte usw. zu Versuchsbeginn);

— Zubereitung des Prüfwassers (falls rekonstituiertes Wasser verwendet wird) und Merkmale des Wassers (Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Leitfähigkeit, Härte usw. zum Testbeginn);

— Höhe des Sediments und des Überstandswassers;

— Volumen des Überstandswassers und des Porenwassers; Gewicht des feuchten Sediments mit und ohne Porenwassers;

— Prüfgefäße (Material und Größe);

— Methode für die Zubereitung der Stammlösungen und Prüfkonzentrationen;

▼M4

— Applikation der Prüfsubstanz: verwendete Prüfkonzentrationen, Anzahl der Replikate und gegebenenfalls Verwendung von Lösungsmitteln;

— Inkubationsbedingungen: Temperatur, Lichtzyklus und Beleuchtungsstärke, Belüftung (Häufigkeit und Intensität);

— genaue Angaben zur Fütterung, einschließlich Art des Futters, Präparation des Futters, Futtermenge und Fütterungsregime.

*Ergebnisse:*

— die nominellen Prüfkonzentrationen, die gemessenen Prüfkonzentrationen und die Ergebnisse sämtlicher Analysen zur Bestimmung der Konzentration der Prüfsubstanz im Prüfgefäß;

— Qualität des Wassers in den Prüfgefäßen, d. h. pH-Wert, Temperatur, Gehalt an gelöstem Kohlenstoff, Härte und Ammonium;

— gegebenenfalls Ausgleich von Verdunstungsverlusten;

— Anzahl der geschlüpften männlichen und weiblichen Mücken pro Gefäß und pro Tag;

— Anzahl der Larven pro Gefäß, die sich nicht zu Mücken entwickelt haben;

— mittleres Trockengewicht der einzelnen Larven pro Gefäß und gegebenenfalls pro Larvenstadium;

— prozentuale Emergenzrate pro Replikat und Testkonzentration (männliche und weibliche Mücken gepoolt);

— mittlere Entwicklungsrate von voll entwickelten Mücken pro Replikat und Behandlungsrate (männliche und weibliche Mücken gepoolt);

— Schätzung der toxischen Endpunkte, z. B. $EC_x$ (und dazugehörige Konfidenzintervalle), NOEC- und/oder LOEC-Werte und die zu ihrer Bestimmung verwendeten statistischen Methoden;

— Diskussion der Ergebnisse, einschließlich der Auswirkungen etwaiger Abweichungen von dieser Prüfmethode auf die Prüfergebnisse.

*LITERATUR:*

1. BBA (1995): Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Herausgeber: M. Streloke und H. Köpp. Berlin 1995.

2. Fleming R. *et al.* (1994): Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Abschlussbericht an die Europäische Kommission. Bericht Nr.: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

3. SETAC (1993): Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Aus dem WOSTA-Workshop in den Niederlanden.

4. ASTM International/E1706-00 (2002): Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, S. 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5. Environment Canada (1997): Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Dezember 1997.

6. US-EPA (2000): Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Zweite Ausgabe. EPA 600/R-99/064. März 2000. Überarbeitung der ersten Ausgabe vom Juni 1994.

▼M4


7. US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8. US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9. Milani D., Day K.E., McLeay D.J., Kirby R.S. (1996): Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.

10. Sugaya Y. (1997): Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

11. Kawai K. (1986): Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

12. OECD (2000): Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13. Environment Canada (1995): Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14. Kapitel C.8 dieses Anhangs: Toxizität für Regenwürmer,

15. Suedel B.C. and Rodgers J.H. (1994): Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

16. Naylor C. and Rodrigues C. (1995): Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

17. Dunnett C.W. (1964): A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

18. Dunnett C.W. (1964): New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

19. Williams D.A. (1971): A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

20. Williams D.A. (1972): The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

21. Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992): A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577-585.

22. Christensen E.R. (1984): Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

23. Bruce and Versteeg (1992): A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

24. Slob W: (2002): Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

*Anlage 1*

DEFINITIONEN

Für diese Prüfmethode gelten folgende Definitionen:

**Formuliertes Sediment** oder rekonstitutiertes, künstliches oder synthetisches Sediment: ein Gemisch aus Stoffen, mit denen die physikalischen Bestandteile eines natürlichen Sediments nachgeahmt werden sollen.

**Überstandswasser:** das auf das Sediment im Prüfgefäß aufgebrachte Wasser.

**Interstitialwasser** oder Porenwasser: das Wasser in den Zwischenräumen zwischen Sediment- und Bodenpartikeln.

**Gespiktes Wasser:** Wasser, dem Prüfsubstanz hinzugefügt wurde.

**Prüfsubstanz:** jeder Stoff oder jedes Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

▼M4

*Anlage 2*

**Empfehlungen für die Anzucht von *Chironomus riparius***

1. Für die Anzucht von *Chironomus*-Larven können Kristallisierschalen oder größere Behälter verwendet werden. Auf dem Boden des Behälters wird eine 5 bis 10 mm dicke Schicht feiner Quarzsand aufgetragen. Kieselguhr (z. B. Merck, Art 8117) hat sich ebenfalls als Substrat bewährt (eine dünnere Schicht von nur ein paar Millimetern ist ausreichend). Anschließend wird mit geeignetem Wasser auf mehrere Zentimeter Höhe aufgefüllt. Soweit erforderlich ist bei Verdunstungsverlusten Wasser nachzufüllen, um ein Austrocknen zu verhindern. Nötigenfalls kann das Wasser ausgetauscht werden. Leicht belüften. Die Larvenzuchtgefäße sind in geeignete Käfige zu setzen, um zu verhindern, dass die schlüpfenden Imagines entweichen. Der Käfig muss groß genug sein (Mindestgröße ca. 30 x 30 x 30 cm), damit die geschlüpften Imagines schwärmen können, da es andernfalls nicht zur Paarung kommt.

2. Die Käfige sind bei Raumtemperatur oder in einer Klimakammer bei 20 ± 2 °C und einer Licht-/Dunkelphase von 16:8 Std. (Lichtintensität ca. 1 000 lux) zu halten. Eine relative Luftfeuchte von weniger als 60 % soll offensichtlich die Vermehrung verhindern.

**Verdünnungswasser**

3. Es kann jedes natürliche oder synthetische Wasser verwendet werden. Im Allgemeinen wird Brunnenwasser, entchlortes Leitungswasser und künstliches Medium (z. B. Elendt-Medium „M4“ oder „M7“, siehe unten) verwendet. Das Wasser muss vor Verwendung belüftet werden. Soweit erforderlich kann das Anzuchtwasser durch vorsichtiges Abgießen oder Absaugen des gebrauchten Wassers aus den Prüfgefäßen erneuert werden; dabei ist darauf zu achten, dass die Wohnröhren der Larven nicht zerstört werden.

**Fütterung der Larven**

4. *Chironomus*-Larven sollten mit ca. 250 mg Fischfutterflocken (TetraMin®, TetraPhyll® oder einer anderen entsprechenden Fischfuttermarke) pro Gefäß und Tag gefüttert werden. Hierzu kann trockengemahlenes Pulver oder eine Suspension in Wasser (1,0 g Futterflocken mit 20 ml Verdünnungswasser zu einer homogenen Masse gemischt) verwendet werden. Diese Zubereitung kann in Portionen von 5 ml pro Gefäß und pro Tag verfüttert werden (vor Gebrauch schütteln). Ältere Larven können etwas mehr Futter erhalten.

5. Das Futter ist an die Wasserqualität anzupassen. Bei Trübung des Kulturmediums ist die Futterration zu reduzieren. Die Futterzugaben sind sorgfältig zu notieren. Zu wenig Futter kann dazu führen, dass die Larven in die Wassersäule abwandern, während zu viel Futter die mikrobielle Aktivität verstärkt und die Sauerstoffkonzentrationen verringert. In beiden Fällen kann es zu einer Verlangsamung des Wachstums der Organismen kommen.

6. Wenn neue Kulturgefäße angesetzt werden, können auch einige Grünalgenzellen (z. B. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) hinzugefügt werden.

**Fütterung der geschlüpften Imagines**

7. Einige Experimentatoren empfehlen, als Futter für die geschlüpften Imagines ein mit gesättigter Zuckerlösung getränktes Wattepad zu verwenden.

▼M4

**Emergenz**

8. Nach ca. 13 bis 15 Tagen bei einer Temperatur von 20 ± 2 °C beginnen die Imagines in den Larvenzuchtgefäßen zu schlüpfen. Männchen sind leicht an den gefiederten Antennen zu erkennen.

**Eiergelege**

9. Sobald sich Imagines in den Zuchtkäfigen befinden, sind alle Larvenzuchtgefäße dreimal wöchentlich auf gallertartige Eigelege zu kontrollieren. Diese sind vorsichtig zu entfernen und in eine kleine Schale mit einer Probe Anzuchtwasser umzusetzen. Mit den Eigelegen werden neue Kulturen angesetzt (z. B. 2 bis 4 Eigelege pro Gefäß) oder Toxizitätstests durchgeführt.

10. Nach 2 bis 3 Tagen sollten L1-Larven schlüpfen.

**Ansetzen neuer Kulturen**

11. Sobald die Zucht etabliert ist, sollte es möglich sein, je nach Prüfungsanforderungen wöchentlich oder weniger häufig frische Kulturen anzusetzen und die älteren Prüfgefäße nach dem Schlüpfen der Imagines zu entfernen. Auf diese Weise ist es möglich, mit nur geringem Aufwand ständig über Imagines zu verfügen.

**Zubereitung der Prüflösungen M4 und M7**

12. Das Medium M4 wurde von Elendt (1990) beschrieben. Das Medium M7 wird wie das Medium M4 zubereitet, mit Ausnahme der in Tabelle 1 angegebenen Substanzen, deren Konzentration bei M7 viermal niedriger ist als bei M4. Eine Veröffentlichung zum Medium M7 wird derzeit ausgearbeitet (Elendt, persönliche Mitteilung). Die Prüflösungen nicht nach den Anweisungen von Elendt und Bias (1990) zubereiten, da die für die Zubereitung der Stammlösungen angegebenen Konzentrationen von $NaSiO_3$ 5 $H_2O$, $NaNO_3$, $KH_2PO_4$ und $K_2HPO_4$ nicht geeignet sind.

**Herstellung des M7-Mediums**

13. Zunächst wird jede Stammlösung (I) einzeln zubereitet; diese Stammlösungen werden anschließend zu einer kombinierten Stammlösung (II) zusammengegossen (I) (siehe Tabelle 1). 50 ml der kombinierten Stammlösung (II) und die in Tabelle 2 angegebenen jeweiligen Mengen der Makronährstoffe werden zur Herstellung des M7-Mediums mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Durch Zugabe von drei Vitaminen gemäß Tabelle 3 zu entionisiertem Wasser wird eine kombinierte Vitamin-Stammlösung hergestellt, von der 0,1 ml vor der Verwendung dem fertigen M7-Medium zugesetzt werden. (Die Vitaminstammlösung wird in kleinen Portionen tiefgefroren aufbewahrt). Das Medium wird belüftet und stabilisiert.

*Tabelle 1*

**Stammlösungen der Spurenelemente für das M4- und das M7-Medium**

| Stammlösungen (I) | Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird | Zur Herstellung der kombinierten Stammlösung (II): Folgende Mengen (ml) der Stammlösungen (I) mischen und mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter auffüllen | | Endkonzentrationen der Prüflösungen (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ (1) | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1) | 7 210 | 1,0 | 0,25 | 0,361 | 0,090 |
| LiCl (1) | 6 120 | 1,0 | 0,25 | 0,306 | 0,077 |

▼**M4**

| Stammlösungen (I) | Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird | Zur Herstellung der kombinierten Stammlösung (II): Folgende Mengen (ml) der Stammlösungen (I) mischen und mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter auffüllen | | Endkonzentrationen der Prüflösungen (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| RbCl (1) | 1 420 | 1,0 | 0,25 | 0,071 | 0,018 |
| $SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1) | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr (1) | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 1,0 | 1,0 | 0,013 | 0,013 |
| $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$ | 200 | 1,0 | 1,0 | 0,010 | 0,010 |
| KI | 65 | 1,0 | 1,0 | 0,0033 | 0,0033 |
| $Na_2SeO_3$ | 43,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0022 | 0,0022 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 1,0 | 1,0 | 0,00058 | 0,00058 |
| Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2) | 5 000 | 20,0 | 5,0 | 2,5 | 0,625 |
| FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2) | 1 991 | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,249 |

(1) Diese Stoffe sind in M4 und M7 unterschiedlich dosiert (siehe oben).
(2) Diese Lösungen werden einzeln hergestellt, zusammengegossen und sofort autoklaviert.

*Tabelle 2*

**Makronährstoff-Stammlösung für das M4- und das M7-Medium**

| | Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird | Zur Herstellung des M4- und des m7-Mediums zugesetzte Menge an Makronährstoff-Stammlösungen (ml/l) | Endkonzentrationen der Prüflösungen M4 und M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ | 293 800 | 1,0 | 293,8 |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 246 600 | 0,5 | 123,3 |
| KCl | 58 000 | 0,1 | 5,8 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1,0 | 64,8 |
| $NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$ | 50 000 | 0,2 | 10,0 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 0,1 | 0,274 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 0,1 | 0,143 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 0,1 | 0,184 |

▼**M4**

*Tabelle 3*

**Vitamin-Stammlösung für das M4- und das M7-Medium**

Aus den drei Vitaminlösungen wird eine einzige Vitamin-Stammlösung hergestellt.

| | Menge (mg), die mit entionisiertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt wird | Zur Herstellung des M4- und des M7-Mediums zugesetzte Menge an Vitamin-Stammlösung (ml/l) | Endkonzentrationen der Prüflösungen M4 und M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| Thiaminhydrochlorid | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Cyanocobalamin ($B_{12}$) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Biotin | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

*LITERATUR*

BBA (1995): Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Herausgegeben von M. Streloke und H.Köpp. Berlin 1995.

Elendt B.P. (1990): Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt B.P. and Bias W.-R. (1990): Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

*Anlage 3*

ZUBEREITUNG DES FORMULIERTEN SEDIMENTS

**Zusammensetzung des Sediments**

Das formulierte Sediment sollte die folgende Zusammensetzung haben:

| Bestandteil | Charakterisierung | % des Trockengewichts des Sediments |
|---|---|---|
| Torf | Sphagnum-Torf, so nahe wie möglich bei pH 5,5 bis 6,0, ohne sichtbare Pflanzenreste, fein gemahlen (Partikelgröße ≤ 1 mm) und luftgetrocknet | 4-5 |
| Quarzsand | Korngröße: > 50 % der Partikel sollten Größen zwischen 50 und 200 µm aufweisen | 75-76 |
| Kaolin-Ton | Kaolinit-Gehalt ≥ 30 % | 20 |
| Organischer Kohlenstoff | Eingestellt durch Zugabe von Torf und Sand | 2 (± 0,5) |
| Calciumcarbonat | $CaCO_3$, pulverisiert, chemisch rein | 0,05 - 0,1 |
| Wasser | Leitfähigkeit ≤ 10 µS/cm | 30 - 50 |

**Zubereitung**

Der Torf wird luftgetrocknet und zu feinem Pulver zermahlen. Die erforderliche Menge an Torfpulver wird mit Hilfe eines Hochleistungshomogenisators in entionisiertem Wasser suspendiert und durch Zugabe von $CaCO_3$ auf einen pH-Wert von 5,5 ± 0,5 eingestellt. Diese Suspension wird bei 20 ± 2 °C für mindestens zwei Tage unter sanftem Rühren konditioniert, um den pH-Wert zu stabilisieren und eine Etablierung der mikrobiellen Fauna zu ermöglichen. Der pH-Wert wird erneut bestimmt und sollte bei 6,0 ± 0,5 liegen. Nun werden die übrigen Komponenten (Sand und Kaolin-Ton) sowie entionisiertes Wasser zur Torf-Wasser-Suspension hinzugegeben und zu einem homogenen Sediment vermischt, dessen Wassergehalt 30 bis 50 % des Trockengewichts des Sediments betragen sollte. Der pH-Wert der fertigen Mischung wird erneut gemessen und erforderlichenfalls mit $CaCO_3$ auf 6,5 bis 7,5 eingestellt. Sedimentproben nehmen, um das Trockengewicht und den Gehalt an organischem Kohlenstoff zu bestimmen. Es wird empfohlen, das formulierte Sediment vor dem Einsatz in einem Chironomiden-Toxizitätstest für sieben Tage unter denselben Bedingungen, wie sie im anschließenden Test herrschen, zu konditionieren.

**Lagerung**

Die trockenen Bestandteile für die Zubereitung des künstlichen Sediments können an einem trockenen und kühlen Ort bei Raumtemperatur gelagert werden. Das formulierte (feuchte) Sediment darf vor seiner Verwendung im Prüfversuch nicht gelagert werden. Es ist unmittelbar nach Ablauf der siebentägigen Konditionierung, mit der die Zubereitung abschließt, zu verwenden.

*LITERATUR:*

Kapitel C.8 dieses Anhangs: Toxizität für Regenwürmer.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998): Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼M4

*Anlage 4*

**Chemische Eigenschaften eines geeigneten Verdünnungswassers**

| Substanz | Konzentration |
|---|---|
| Partikel | < 20 mg/l |
| Gesamtgehalt an organischen Kohlenstoffen | < 2 mg/l |
| Nichtionisiertes Ammonium | < 1 µg/l |
| Härte in $CaCO_3$ | < 400 mg/l (*) |
| Restchlor | < 10 µg/l |
| Gesamtgehalt an phosphororganischen Pestiziden | < 50 ng/l |
| Gesamtgehalt an chlororganischen Pestiziden plus polychlorierten Biphenylen | < 50 ng/l |
| Gesamtgehalt an organischem Chlor | < 25 ng/l |

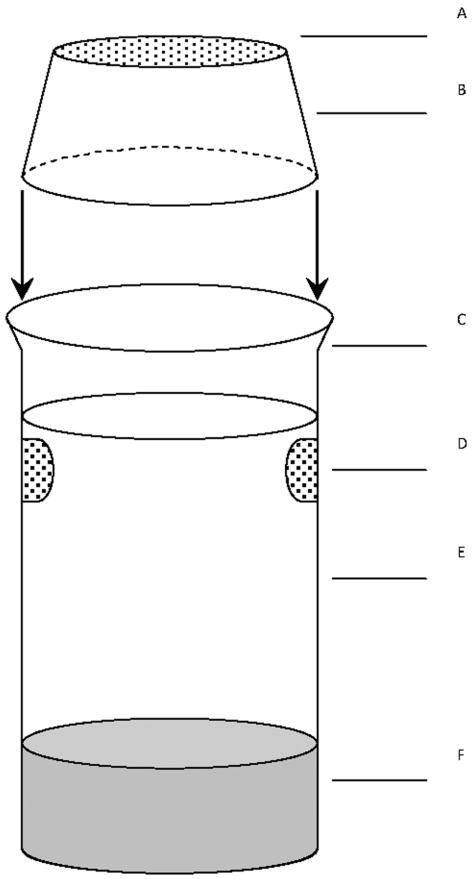
(*) Wird jedoch ein Ionenaustausch zwischen den Härteionen und der Prüfsubstanz vermutet, ist Wasser geringerer Härte zu verwenden (und somit ist in diesem Fall das Elendt-Medium M4 zu vermeiden).

▼**M4**

*Anlage 5*

**Empfehlungen für die Beobachtung des Schlüpfens der Chironomidenlarven**

Die Bechergläser werden ab dem 20. Tag bis zum Versuchsende mit Emergenzfallen abgedeckt. Nachstehend ist ein Beispiel für eine derartige Falle abgebildet:




A: Nylongaze

B: umgedrehte Plastikschalen

C: Becherglas ohne Ausguss

D: abgedeckte Öffnungen für den Wasseraustausch

E: Wasser

F: Sediment

▼M4

## C.29 LEICHTE BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT — BESTIMMUNG VON $CO_2$ IN GESCHLOSSENEN FLASCHEN (HEADSPACE-TEST)

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 310 (2006). Sie beschreibt ein Screening-Verfahren zur Bestimmung der leichten biologischen Abbaubarkeit von chemischen Substanzen und liefert ähnliche Informationen wie die sechs Prüfmethoden (A bis F), die in Kapitel C.4 dieses Anhangs beschrieben sind. Daher kann eine chemische Substanz, die im Rahmen dieser Prüfmethode positive Ergebnisse zeigt, als leicht biologisch abbaubar und somit auch als unter Umweltbedingungen rasch zersetzbar angesehen werden.

2. Die anerkannte Methode zur Bestimmung der $CO_2$-Entwicklung (1), die auf dem ursprünglichen Sturm-Test (2) zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von organischen Substanzen durch Erfassung des durch die mikrobielle Aktivität erzeugten Kohlendioxids basiert, ist in der Regel die erste Wahl für die Prüfung von im Wasser schwer löslichen Substanzen sowie von stark adsorbierenden Substanzen. Sie wird auch für lösliche (aber nicht flüchtige) Substanzen herangezogen, da die Kohlenstoffentwicklung von vielen als der einzige eindeutige Beweis für mikrobielle Aktivität angesehen wird. Eine Abnahme des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) kann durch physikalisch-chemische Prozesse (Adsorption, Verflüchtigung, Ausfällung, Hydrolyse) sowie durch mikrobielle Aktivität und zahlreiche nichtbiologische Reaktionen, die Sauerstoff verbrauchen, erreicht werden. Es ist selten, dass $CO_2$ auf abiotische Weise aus organischen Substanzen entsteht. Beim ursprünglichen und modifizierten Sturm-Test (1)(2) wird $CO_2$ aus der Flüssigphase entfernt und durch *Sparging* (d. h. Durchblasen von behandelter Luft durch das flüssige Medium zur Entfernung des $CO_2$) in die Adsorptionsgefäße geleitet, während bei der Version von Larson (3)(4) das $CO_2$ aus dem Reaktionsgefäß in die Adsorptionsgefäße übergeleitet wird, indem $CO_2$-freie Luft durch den Luftraum (*Headspace*) geblasen und dabei das Prüfgefäß kontinuierlich geschüttelt wird. Nur in der geänderten Version von Larson wird das Reaktionsgefäß geschüttelt; dagegen wird Rühren in der ISO-Norm 9439 (5) und in der ursprünglichen amerikanischen Version (6) ausschließlich für unlösliche Substanzen vorgeschrieben, wobei beide Versionen *Sparging* anstelle des *Headspace*-Austausches vorsehen. In einer anderen offiziellen amerikanischen EPA-Methode (7), die auf der Gledhill-Methode (8) basiert, wird das Reaktionsgefäß geschüttelt und atmosphärisch verschlossen. Das gebildete $CO_2$ wird direkt aus der Gasphase in einem Alkali-Abscheider aufgefangen, wie bei den klassischen Warburg/Barcroft-Respirometer-Kolben.

3. Es hat sich jedoch bei der Anwendung des modifizierten Standard-Sturm-Tests auf eine Reihe von chemischen Substanzen gezeigt, dass anorganischer Kohlenstoff (IC) sich im Medium akkumuliert (9). Der Abbau von 20 mg C/l Anilin ergab eine IC-Konzentration von 8 mg/l. Dies bedeutet, dass die Ansammlung von $CO_2$ im Alkali-Abscheider kein wahrheitsgetreues Bild der $CO_2$-Menge liefert, die zwischenzeitlich während des Abbaus auf mikrobielle Weise erzeugt wird. Folglich wird die Auflage, wonach für die Einstufung einer Prüfsubstanz als „biologisch leicht abbaubar“ > 60 % der theoretisch maximalen Menge an $CO_2$ ($ThCO_2$) innerhalb eines „10-Tage-Fensters“ (der 10-Tage-Abschnitt, der unmittelbar auf das Erreichen von 10 % Abbau folgt) erreicht sein muss, für einige Substanzen nicht erreicht, die bei Zugrundelegung der DOC-Abnahme in dieser Kategorie eingestuft worden wären.

4. Ist der Abbaugrad niedriger als erwartet, so hat möglicherweise eine Akkumulation des IC in der Prüflösung stattgefunden. In diesem Fall kann die biologische Abbaubarkeit nach anderen Verfahren zur Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit bewertet werden.

▼M4

5. Andere Nachteile der Sturm-Methode (umständlich, zeitaufwändig, anfälliger für Versuchsfehler und nicht geeignet für flüchtige Substanzen) waren früher bereits der Anlass dafür, anstelle des Gasdurchflusssystems nach einer anderen Technik mit geschlossenen Gefäßen als der von Gledhill zu suchen (10)(11). Boatman et al (12) haben frühere Methoden überprüft und sich für ein System mit geschlossenem Luftraum entschieden, bei dem $CO_2$ am Ende der Inkubation durch Ansäuerung des Mediums in den *Headspace* freigesetzt wird. Das $CO_2$ wurde mittels Gaschromatografie (GC)/IC-Analyse in automatisch aus dem *Headspace* entnommenen Proben gemessen, wobei der gelöste anorganische Kohlenstoff (DIC) in der Flüssigphase jedoch nicht berücksichtigt wurde. Auch waren die verwendeten Gefäße sehr klein (20 ml) und fassten nicht mehr als 10 ml des Mediums, was sich als problematisch erwies, z. B. wenn zwangsläufig nur sehr kleine Mengen unlöslicher Prüfsubstanz hinzugefügt wurden. Auch kann es sein, dass das inokulierte Medium nicht genügend oder keine Mikroorganismen enthält, durch die die Prüfsubstanzen abgebaut werden konnten.

6. Diese Probleme wurden durch die unabhängigen Studien von Struijs und Stoltenkamp (13) und von Birch und Fletcher (14) überwunden, wobei letztere sich von ihren Erfahrungen mit den in Prüfmethoden für die anaerobe biologische Abbaubarkeit verwendeten Geräten hatten inspirieren lassen (15). Bei der erstgenannten Methode (13) wird das $CO_2$ im *Headspace* nach Ansäuerung und Herstellung eines Gleichgewichtszustands bestimmt, während bei letztgenannter Methode (14) der DIC sowohl in der Gasphase als auch in der Flüssigphase ohne Behandlung bestimmt wird; über 90 % des gebildeten IC befanden sich in der Flüssigphase. Gegenüber dem Sturm-Test hatten beide Methoden den Vorteil, dass das Prüfsystem kompakter und leichter zu handhaben war, flüchtige Substanzen getestet werden können und dem Risiko einer Verzögerung bei der Bestimmung des gebildeten $CO_2$ zuvorgekommen wird.

7. Diese beiden Konzepte wurden in der ISO-Norm für den $CO_2$-*Headspace*-Test (16) miteinander kombiniert, die einem Ringtest unterzogen wurde (17) und die Grundlage für die vorliegende Prüfmethode bildet. Die beiden Konzepte wurden auch in der amerikanischen EPA-Methode (18) angewendet. Es wurden zwei Methoden für die $CO_2$-Bestimmung empfohlen: Bestimmung des $CO_2$ im *Headspace* nach Ansäuerung (13) und Bestimmung des IC in der Flüssigphase nach Zugabe von überschüssigem Alkali. Letztere Methode wurde von Peterson während des CONCAWE-Ringtests (19) dieser modifizierten *Headspace*-Methode eingeführt, um die inhärente biologische Abbaubarkeit zu bestimmen. Die Änderungen, die im Rahmen der Revision 1992 (20) der in Kapitel C.4 dieses Anhangs beschriebenen Prüfmethoden für die „leichte“ biologische Abbaubarkeit vorgenommen wurden, sind in die vorliegende Prüfmethode einbezogen worden, so dass die Bedingungen (Medium, Dauer usw.) im Übrigen die gleichen sind wie bei dem überarbeiteten Sturm-Test (20). Birch und Fletcher (14) haben nachgewiesen, dass die mit dieser *Headspace*-Prüfmethode erzielten Ergebnisse den im OECD-Ringtest (21) der überarbeiteten Prüfmethoden mit denselben Chemikalien erzielten Ergebnisse sehr ähnlich sind.

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

8. Die Prüfsubstanz (in der Regel 20 mg/l Kohlenstoff) wird als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu einem Mineralsalz-Puffermedium gegeben, das mit einer Mischpopulation von Mikroorganismen beimpft wurde. Der Versuch wird in geschlossenen Gefäßen mit einem Luftraum (*Headspace*) durchgeführt, der als Sauerstoffreservoir für den aeroben Abbau dient. Die aus dem vollständigen aeroben biologischen Abbau der Prüfsubstanz resultierende $CO_2$-Entwicklung wird bestimmt, indem der in den Prüfflaschen gebildete überschüssige IC mit dem in den Blindwertgefäßen, die nur das Inokulum enthalten, verglichen wird. Der Abbaugrad wird als Prozentwert der theoretischen maximalen Menge an anorganischem Kohlenstoff (ThIC) ausgedrückt, die wiederum aus der ursprünglich zugegebenen Menge an Prüfsubstanz (als organischer Kohlenstoff) berechnet wird.

9. Die DOC-Abnahme und/oder der Primärabbau der Prüfsubstanz können ebenfalls bestimmt werden (20).

▼M4

ANGABEN ZUR PRÜFSUBSTANZ

10. Der Gehalt an organischem Kohlenstoff (Massenanteil) der Prüfsubstanz muss bekannt sein, sei es aufgrund ihrer chemischen Struktur oder durch Messung, damit der prozentuale Abbau berechnet werden kann. Bei flüchtigen Prüfsubstanzen ist eine gemessene oder berechnete Henry-Konstante für die Bestimmung eines angemessenen Verhältnisses von *Headspace* zu Flüssigkeit hilfreich. Angaben über die Toxizität der Prüfsubstanz gegenüber Mikroorganismen sind wichtig für die Auswahl einer geeigneten Prüfkonzentration und die Auslegung der Ergebnisse bei geringem Abbau: Es wird empfohlen, eine Hemmkontrolle vorzusehen, außer wenn bekannt ist, dass die Prüfsubstanz mikrobielle Aktivitäten nicht hemmt (siehe Nummer 24).

ANWENDUNGSBEREICH DER METHODE

11. Diese Methode ist auf wasserlösliche und wasserunlösliche Substanzen anwendbar, allerdings ist für eine gute Dispersion der Prüfsubstanz zu sorgen. Bei Anwendung des empfohlenen Verhältnisses von *Headspace* zu Flüssigkeit von 1:2 können flüchtige Substanzen mit einer Henry-Konstante von bis zu 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ getestet werden, da der Anteil der Prüfsubstanz im *Headspace* höchstens 1 % beträgt (13). Ein kleineres *Headspace*-Volumen kann für die Testung von Prüfsubstanzen mit höherer Flüchtigkeit verwendet werden, allerdings kann ihre Bioverfügbarkeit begrenzt sein, insbesondere wenn es sich um in Wasser schwer lösliche Substanzen handelt. Es ist jedoch sicherzustellen, dass das Verhältnis von *Headspace* zu Flüssigkeit und die Konzentration der Prüfsubstanz so bemessen sind, dass ein ausreichendes Volumen an Sauerstoff vorhanden ist, um einen vollständigen aeroben biologischen Abbau zu ermöglichen (Eine hohe Konzentration an Prüfsubstanz und ein kleines *Headspace*-Volumen sollten z. B. vermieden werden). Leitlinien hierzu sind in (13)(23) zu finden.

REFERENZSUBSTANZEN

12. Zur Kontrolle des Prüfverfahrens sollte parallel eine Referenzsubstanz getestet werden, deren biologische Abbaubarkeit bekannt ist. Zu diesem Zweck können Anilin, Natriumbenzoat oder Ethylenglykol bei der Testung von wasserlöslichen Substanzen und Octan-1-ol für schwer lösliche Prüfsubstanzen verwendet werden (13). Der biologische Abbau dieser Substanzen muss nach 14 Tagen > 60 % des ThIC erreichen.

REPRODUZIERBARKEIT

13. Der ISO-Ringtest der Prüfmethode (17), der unter den empfohlenen Bedingungen, einschließlich einer Prüfkonzentration von 20 mg/l Kohlenstoff, durchgeführt wurde, brachte folgende Ergebnisse:

| Prüfsubstanz | Mittelwert des prozentualen biologischen Abbaus (28d) | Variationskoeffizient (%) | Anzahl der Laboratorien |
|---|---|---|---|
| Anilin | 90 | 16 | 17 |
| Octan-1-ol | 85 | 12 | 14 |

Bei der Verwendung von Anilin war die Variabilität innerhalb desselben Tests (Reproduzierbarkeit) mit einem Variationskoeffizienten von maximal 5 % bei nahezu allen Testdurchläufen niedrig. In den beiden Fällen, in denen die Reproduzierbarkeit schlechter war, war die größere Variabilität wahrscheinlich der hohen IC-Produktion in den Blindwertansätzen zuzuschreiben. Bei Octan-1-ol war die Reproduzierbarkeit schlechter, wobei die Variabilität jedoch in 79 % der Testdurchläufe weniger als 10 % betrug. Diese größere Variabilität innerhalb desselben Tests könnte auf Dosierfehlern beruhen, da ein kleines Volumen (3 bis 4 µl) Ocant-1-ol in die geschlossenen Prüfflaschen injiziert werden musste. Geringere Prüfsubstanzkonzentrationen würden höhere Variationskoeffizienten ergeben, insbesondere Konzentrationen von weniger als 10 mg/l Kohlenstoff. Dieses Problem lässt sich zum Teil dadurch beheben, dass die Konzentration des gesamten anorganischen Kohlenstoffs (TIC) im Inokulum reduziert wird.

▼M4

14. In einem EU-Ringtest (24) von fünf Tensiden in einer Konzentration von 10 mg/l Kohlenstoff wurden folgende Ergebnisse erzielt:

| Prüfsubstanz | Mittelwert des prozentualen biologischen Abbaus (28d) | Variationskoeffizient (%) | Anzahl der Laboratorien |
|---|---|---|---|
| Tetrapropylen benzolsulfonat | 17 | 45 | 10 |
| Di-iso-Octylsulfosuccinat (anionisch) | 72 | 22 | 9 |
| Hexadecyl-trimethyl (*)- ammoniumchlorid (kationisch) | 75 | 13 | 10 |
| Iso-Nonylphenol-(Ethoxylat)$_9$ (nichtionisch) | 41 | 32 | 10 |
| Cocoamidopropyl-Dimethylhydroxy-Sulfobetain (amphoter) | 60 | 23 | 11 |

(*) $SiO_2$ wurde zur Neutralisierung der Toxizität hinzugefügt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Variabilität in der Regel bei den weniger gut abgebauten Tensiden höher war. Die Variabilität innerhalb desselben Tests betrug in über 90 % der Fälle weniger als 15 % und lag maximal bei 30 bis 40 %.

*Anmerkung*: Die meisten Tenside bestehen nicht nur aus einer Molekülart, sondern sind Mischungen aus Isomeren, Homologen usw., die nach verschiedenen lag-Phasen und mit unterschiedlicher kinetischer Geschwindigkeit abbauen. Dies führt zu „verwischten“, abgeschwächten Kurven, so dass der Grenzwert von 60 % möglicherweise nicht innerhalb des „10-Tage-Fensters“ erreicht wird, selbst wenn jede einzelne Molekülart gesondert getestet den Wert von > 60 % innerhalb von 10 Tagen erreichen würde. Dies ist auch bei anderen komplexen Mischungen zu beobachten.

BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

*Geräte*

15. Übliche Laborausrüstung und folgende Geräte:

a) Glasserumflaschen, mit Butylgummisepten und Aluminiumkrampen verschließbar. Empfohlen wird eine Größe von 125 ml bei einem Flaschenvolumen von ca. 160 ml (In diesem Fall muss das Volumen der einzelnen Flaschen 160 ± 1 ml betragen). Kleinere Gefäße können verwendet werden, wenn die Ergebnisse den Bedingungen unter den Nummern 66 und 67 entsprechen;

b) Kohlenstoffanalysator oder sonstiges Gerät zur Bestimmung des anorganischen Kohlenstoffs (z. B. Gaschromatograph);

▼M4

c) Präzisionsspritzen für Gas- und Flüssigproben;

d) Orbitalschüttler in temperaturkontrollierter Umgebung;

e) Vorrichtung für die Zufuhr von $CO_2$-freier Luft — Hierzu kann Luft über Natronkalkgranulat oder durch eine Gasmischung aus 80 % $N_2$ und 20 % $0_2$ geleitet werden (optional) (siehe Nummer 28);

f) Filtrationsvorrichtung mit Membranfilter (Porenweite zwischen 0,20 μm und 0,45 μm) (optional);

g) Analysator zur Bestimmung des organischen Kohlenstoffs (optional).

*Reagenzien*

16. Nur Reagenzien des Reinheitsgrades „zur Analyse“ verwenden.

*Wasser*

17. Wasser, destilliert oder entionisiert, mit weniger als 1 mg/l an gesamtem organischem Kohlenstoff. Dies entspricht ≤ 5 % des durch die empfohlene Prüfsubstanzdosis bedingten ursprünglichen Gehalts an organischem Kohlenstoff.

*Stammlösungen für das Mineralsalzmedium*

18. Die Stammlösungen und das Mineralsalzmedium sind mit denen der ISO-Norm 14593 (16) und der C.4-Prüfmethoden zur Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit (20) vergleichbar. Höhere Konzentrationen an Ammoniumchlorid (2,0 g/l anstelle von 0,5 g/l) sollten nur in ganz besonderen Ausnahmefällen erforderlich sein, z. B. bei einer Prüfsubstanzkonzentration von > 40 mg/l Kohlenstoff. Stammlösungen sind gekühlt zu lagern und werden nach sechs Monaten oder bei festgestellten Niederschlägen oder mikrobiellem Wachstum früher verworfen. Folgende Stammlösungen zubereiten:

a) Kaliumdihydrogenorthophosphat ($KH_2PO_4$) 8,50 g

Dikaliummonohydrogenorthophosphat ($K_2HPO_4$) 21,75 g

Dinatriummonohydrogenorthophosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) 33,40 g

Ammoniumchlorid ($NH_4Cl$) 0,50 g

In Wasser lösen und auf 1 Liter auffüllen. Der pH-Wert der Lösung sollte bei 7,4 (± 0,2) liegen. Wenn dies nicht der Fall ist, eine neue Lösung herstellen.

b) Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 36,40 g

In Wasser lösen und auf 1 Liter auffüllen.

c) Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 22,50 g

In Wasser lösen und auf 1 Liter auffüllen.

d) Eisen(III)chlorid-Hexahydrat ($FeCl_3 \cdot 6H_20$) 0,25 g

In Wasser lösen und auf 1 Liter auffüllen und einen Tropfen HCl-Konzentrat hinzufügen.

*Zubereitung des mineralischen Mediums*

19. 10 ml Lösung (a) mit 800 ml Wasser (Nummer 17) mischen, je 1 ml der Lösungen b), c) und d) hinzugeben und mit Wasser auf 1 Liter auffüllen (Nummer 17).

*Andere Reagenzien*

20. Konzentrierte Orthophosphorsäure ($H_3PO_4$) (> 85 % Masse pro Volumen).

▼M4

*Natriumhydroxid-Lösung 7M*

21. 280 g Natriumhydroxid (NaOH) in 1 Liter Wasser (Nummer 17) lösen. Die Konzentration an gelöstem anorganischem Kohlenstoff (DIC) bestimmen und diesen Wert bei der Berechnung des Testergebnisses berücksichtigen (siehe Nummern 55 und 61), insbesondere im Hinblick auf das Validitätskriterium unter Nummer 66 b). Eine frische Lösung zubereiten, wenn die DIC-Konzentration zu hoch ist.

*Prüfsubstanz*

22. Bei ausreichend wasserlöslichen Prüfsubstanzen eine Stammlösung in Wasser (Nummer 17) oder im Testmedium (Nummer 19) herstellen. Die Konzentration sollte möglichst 100-mal größer sein als die im Versuch verwendete endgültige Konzentration. Es kann erforderlich sein, den pH-Wert einzustellen. Ein ausreichendes Volumen der Stammlösung zum mineralischen Medium geben, um eine TOC-Konzentration zwischen 2 und 40 mg/l Kohlenstoff, vorzugsweise jedoch 20 mg/l Kohlenstoff zu erhalten. Bei geringeren Konzentrationen kann es sein, dass sich die Genauigkeit verschlechtert. Lösliche und nicht lösliche flüssige Substanzen können direkt mit Hilfe von Präzisionsspritzen in die Gefäße gegeben werden. Für schwer oder nicht lösliche Prüfsubstanzen kann eine besondere Behandlung erforderlich sein (25). Folgende Techniken stehen zur Wahl:

a) Direkteinwaage;

b) Ultraschalldispersion vor Zugabe der Prüfsubstanz;

c) Dispersion mit Hilfe eines Emulgiermittels; vor Zugabe des Mittels ist festzustellen, ob es sich hemmend oder stimulierend auf die mikrobielle Aktivität auswirkt;

d) Adsorption von flüssigen Prüfsubstanzen oder einer mit einem geeigneten Lösungsmittel hergestellten Lösung an ein inertes Medium oder inertes Trägermaterial (z. B. Glasfaserfilter) mit anschließender Verdampfung des Lösungsmittels (sofern eines verwendet wurde) und Direkteinwaage;

e) Zugabe eines bekanntes Volumens einer Lösung der Prüfsubstanz in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel in ein leeres Prüfgefäß mit anschließender Verdampfung des Lösungsmittels.

Bei den für die Techniken c), d) und e) verwendeten Vermittlern und Lösungsmitteln ist zu testen, ob sie sich stimulierend oder hemmend auf die mikrobielle Aktivität auswirken (siehe Nummer 42 b).)

*Referenzsubstanz*

23. Eine Stammlösung der (löslichen) Referenzsubstanz in Wasser (Nummer 17) in einer Konzentration zubereiten, die möglichst 100-mal größer ist als die im Versuch zu verwendende endgültige Konzentration (20 mg/l Kohlenstoff).

*Hemmkontrolle*

24. Es kommt häufig vor, dass unter den Bedingungen, die für die Beurteilung des leichten biologischen Abbaus zugrunde gelegt werden, kein signifikanter Abbau der Prüfsubstanzen festzustellen ist. Eine mögliche Ursache ist, dass sich die Prüfsubstanz in der Konzentration, in der sie im Test aufgetragen wird, hemmend auf das Inokulum auswirkt. Eine Hemmkontrolle kann in den Versuchsaufbau einbezogen werden, um (rückblickend) eine Hemmung als mögliche Ursache oder beitragenden Faktor leichter ausmachen zu können. Die Hemmkontrolle kann auch dazu dienen, derartige Interferenzen auszuschließen und nachzuweisen, dass der nicht stattgefundene oder schwache Abbau ausschließlich auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass die Mikroorganismen die Prüfsubstanz unter den Prüfbedingungen nicht angreifen. Um Informationen über die Toxizität der Prüfsubstanz gegenüber (aeroben) Mikroorganismen zu erhalten, eine Lösung aus Prüfsubstanz und Referenzsubstanz (Nummer 19) im Prüfmedium herstellen, dabei für beide Substanzen jeweils dieselbe Konzentration wie die im Versuch zugefügte Konzentration verwendeten (siehe Nummern 22 und 23).

▼M4

*Inokulum*

25. Das Inokulum kann aus verschiedenen Quellen gewonnen werden: aus Belebtschlamm, aus Kläranlagenablauf (nicht chloriert), aus Oberflächenwasser, aus Böden oder aus mehreren dieser Quellen zugleich (20). Die Abbauaktivität der Quelle sollte mit Hilfe einer Referenzsubstanz überprüft werden. Ungeachtet der Quelle sollten vorexponierte Mikroorganismen nicht eingesetzt werden, wenn das Verfahren als Test für leichte biologische Abbaubarkeit verwendet werden soll.

Warnung: Belebtschlamm, Abwasser und Kläranlagenablauf können pathogene Organismen enthalten und sind daher mit Vorsicht zu handhaben.

26. Das für das Inokulum optimale Volumen ist erfahrungsgemäß das Volumen, das

— ausreicht, um eine genügende Abbauaktivität zu ermöglichen;

— die Referenzsubstanz zum vorgesehenen Prozentgrad abbaut (siehe Nummer 66);

— zwischen $10^2$ und $10^5$ koloniebildende Einheiten je ml Endgemisch ergibt;

— üblicherweise 4 mg/l suspendierte Stoffe aus Belebtschlamm im Endgemisch ergibt (höhere Konzentrationen bis zu 30 mg/l sind möglich, können aber zu einem deutlichen Anstieg der $CO_2$-Produktion in den Blindwerten führen (26));

— eine Menge von weniger als 10 % der ursprünglichen Konzentrationen an organischem Kohlenstoff der zugegebenen Prüfsubstanz liefert;

— in der Regel 1-10 ml Inokulum für 1 Liter Testlösung beträgt.

*Belebtschlamm*

27. Eine Belebtschlammprobe ist dem Belebungsbecken einer Kläranlage oder dem Belüftungsgefäß einer Laborkläranlage, die hauptsächlich kommunale Abwässer behandeln, frisch zu entnehmen. Falls erforderlich, sind grobe Partikel durch ein feinmaschiges Sieb (z. B. mit 1 $mm^2$ Siebmaschengröße) auszusieben; danach ist der Schlamm bis zur Verwendung aerob zu halten.

28. Eine andere Möglichkeit besteht darin, den Schlamm nach Abtrennung grober Partikel absitzen zu lassen oder zu zentrifugieren (z. B. 10 Min. bei 1 100 g). Der Überstand wird verworfen und der Schlamm kann im mineralischen Medium gewaschen werden. Der konzentrierte Schlamm wird in einem mineralischen Medium suspendiert, um eine Konzentration von 3 bis 5 g suspendierte Feststoffe pro Liter zu erhalten. Anschließend wird bis zur Verwendung belüftet.

29. Der Schlamm sollte von einer gut arbeitenden konventionellen Anlage genommen werden. Wenn Schlamm aus einer Abwasserkläranlage verwendet werden muss, der vermutlich Substanzen mit hemmender Wirkung enthält, ist er zu waschen. Dazu lässt man den resuspendierten Schlamm nach gründlichem Durchmischen absitzen oder zentrifugiert ihn, verwirft anschließend den Überstand und suspendiert den gewaschenen Schlamm in einem weiteren Volumen mineralischen Mediums erneut. Diese Schritte sind so lange zu wiederholen, bis der Schlamm als frei von übermäßigem Substrat oder Hemmsubstanz angesehen wird.

30. Nach vollständiger Resuspension oder bei unbehandeltem Schlamm ist unmittelbar vor Gebrauch das Trockengewicht der suspendierten Feststoffe zu bestimmen.

31. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Homogenisierung von Belebtschlamm (3 bis 5 g suspendierte Feststoffe pro Liter). Dazu wird der Schlamm 2 Min. bei mittlerer Geschwindigkeit in einer mechanischen Mischvorrichtung durchmischt. Danach lässt man den durchmischten Schlamm 30 Min., wenn erforderlich länger, absitzen und dekantiert die als Inokulum zu verwendende Flüssigkeit im Verhältnis von 10 mg pro Liter mineralischen Mediums.

▼M4

32. Eine weitere Reduzierung der $CO_2$-Entwicklung in den Blindwertansätzen kann erreicht werden, indem der Schlamm über Nacht mit $CO_2$-freier Luft belüftet wird. Als Inokulumkonzentration in diesem Versuch 4 mg/l Belebtschlammfeststoffe verwenden (13).

*Sekundärabwasserablauf*

33. Alternativ kann das Inokulum aus dem Sekundärablauf einer Kläranlage oder einer Laborkläranlage entnommen werden, in der vor allem kommunale Abwässer behandelt werden. Die Probe aerob halten und am Tag der Probenahme verwenden oder, falls erforderlich, eine Vorkonditionierung vornehmen. Die Ablaufprobe filtrieren, um grobe Partikel zu entfernen, und den pH-Wert messen.

34. Zu Reduzierung des IC-Gehalts das Filtrat mit $CO_2$-freier Luft (Nummer 15-e) 1 Std. lang belüften; dabei den pH-Wert durch Zudosieren von Orthophosphorsäure (Nummer 20) bei 6,5 halten. Danach den pH-Wert mit Natriumhydroxid (Nummer 21) wieder auf den Ausgangswert einstellen, die Probe 1 Std. absitzen lassen und ein geeignetes Volumen aus dem Überstand zur Beimpfung verwenden. Dieses *Sparging*-Verfahren verringert den IC-Gehalt des Inokulums. Wenn z. B. das Maximum des empfohlenen Testvolumens von 100 ml filtrierten Ablaufs je Liter als Inokulum eingesetzt wird, dann liegt die Menge des in den Prüfgefäßen für die Blindkontrolle gebildeten IC im Bereich 0,4 mg/l bis 1,3 mg/l (14), was 2 bis 6,5 % des Kohlenstoffs der Prüfsubstanz bei 20 mg C/l und 4 bis 13 % bei 10 mg C/l entspricht.

*Oberflächengewässer*

35. Aus einem geeigneten Oberflächengewässer eine Probe entnehmen, die unter aeroben Bedingungen zu halten und am Tag der Probenahme zu verwenden ist. Falls erforderlich ist die Probe durch Filtration oder Zentrifugation zu konzentrieren. Das für die einzelnen Prüfgefäße zu verwendende Inokulumvolumen muss die Kriterien von Nummer 26 erfüllen.

*Böden*

36. Aus einem geeigneten Boden in einer Tiefe von bis zu 20 cm unter der Oberfläche eine Probe entnehmen. Steine, pflanzliche Reste und Invertebraten sollten aus der Bodenprobe entfernt werden, bevor diese durch ein 2-mm-Sieb passiert wird (falls die Probe zu feucht ist, um unmittelbar gesiebt zu werden, kann sie zum Teil luftgetrocknet werden, um das Sieben zu erleichtern). Die Probe ist unter aeroben Bedingungen zu halten und am Tag der Probenahme zu verwenden. (Wird die Probe in einem schwarzen, locker verschlossenen Polyethylenbeutel transportiert, so kann sie bis zu einem Monat lang bei 2 bis 4 °C gelagert werden).

*Vorbereitung der Inokula*

37. Die Inokula können an die Versuchsbedingungen, nicht aber an die Prüfsubstanz adaptiert werden. Durch die Vorkonditionierung lässt sich die $CO_2$-Entwicklung im Blindwert reduzieren. Zur Vorkonditionierung wird der Belebtschlamm, nachdem er im Prüfmedium auf 30 mg/l verdünnt wurde, über eine Dauer von fünf bis sieben Tagen bei Prüftemperatur mit feuchter $CO_2$-freier Luft belüftet.

PRÜFVERFAHREN

*Anzahl der Flaschen*

38. Die Anzahl der benötigten Prüfgefäße (Nummer 15-a) hängt von der Häufigkeit der Analysen und der Testdauer ab.

39. Es wird empfohlen, die Flaschen dreifach zu analysieren, und zwar in ausreichenden Zeitabständen, um das 10-Tage-Fenster erkennen zu können. Es werden ebenfalls mindestens fünf Prüfflaschen (Nummer 15-a) der Versuchsreihen a), b) und c) (siehe Nummer 42) am Versuchsende analysiert, um für den Mittelwert des prozentualen biologischen Abbaus Konfidenzintervalle von 95 % berechnen zu können.

▼M4

*Inokulum*

40. Als Inokulum wird Belebtschlamm mit einer Konzentration an trockenen Feststoffen von 4 mg/l verwendet. Unmittelbar vor Gebrauch eine ausreichende Menge Inokulum zubereiten, indem z. B. 2 ml auf geeignete Weise behandelter Belebtschlamm (Nummern 27 bis 32) in einer Konzentration von 2 000 mg/l zu 1 Liter Mineralsalzmedium (Nummer 19) hinzugegeben wird. Bei der Verwendung von Abwasser bis zu 100 ml Abwasser (Nummer 33) zu 900 ml Mineralsalzmedium (Nummer 19) hinzugeben und mit dem Medium auf 1 Liter auffüllen.

*Ansatz der Flaschen*

41. Portionen des Inokulums so auf die Replikatgefäße verteilen, dass das Verhältnis von *Headspace* zu Flüssigkeit 1:2 beträgt (z. B. 107 ml in Flaschen mit einem Fassungsvermögen von 160 ml geben). Es kann auch ein anderes Verhältnis verwendet werden, doch ist dabei die Warnung unter Nummer 11 zu beachten. Unabhängig von der Art des verwendeten Inokulums ist darauf zu achten, dass dieses gründlich gemischt wird, um zu gewährleisten, dass es gleichmäßig auf die Prüfflaschen verteilt ist.

42. Die Flaschenreihen (Nummer 15a) werden wie folgt vorbereitet:

a) Prüfgefäße ($F_T$ bezeichnet) mit der Prüfsubstanz;

b) Prüfgefäße ($F_B$ bezeichnet) für den Blindwert, nur mit Prüfmedium und Inokulum; alle für die Applikation der Prüfsubstanz in die Prüfgefäße verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel, Vermittler oder Glasfaserfilter sind ebenfalls hinzuzufügen;

c) Prüfgefäße ($F_C$ bezeichnet) mit der Referenzsubstanz zur Kontrolle des Verfahrens;

d) falls erforderlich, Prüfgefäße ($F_I$ bezeichnet) zur Prüfung einer möglichen Hemmwirkung der Prüfsubstanz; die Gefäße enthalten die Prüfsubstanz und die Referenzsubstanz in jeweils derselben Konzentration (Nummer 24) wie die Flaschen $F_T$ bzw. $F_C$;

e) Prüfgefäße ($F_S$ bezeichnet) zur Prüfung eines möglichen abiotischen Abbaus; wie unter a) plus 50 mg/l $HgCl_2$ oder auf andere Weise sterilisiert (z. B. durch Autoklavieren).

43. Wasserlösliche Prüfsubstanzen und Referenzsubstanzen werden als wässrige Lösungen (Nummern 22, 23 und 24) hinzugefügt, um eine Konzentration von 10 bis 20 mg C/l zu erhalten.

44. Nicht wasserlösliche Prüfsubstanzen und nicht wasserlösliche Referenzsubstanzen werden je nach Art der Prüfsubstanz auf verschiedene Weise in die Flaschen gegeben (siehe Nummer 22a-e), und zwar abhängig von der Methode zur Behandlung der Prüfsubstanz entweder vor oder nach der Zugabe des Inokulums. Wird eines der unter Nummer 22a-e beschriebenen Verfahren angewendet, so sind die Flaschen $F_B$ für den Blindwert (Nummer 42b) genauso zu behandeln, nur dass sie weder die Prüfsubstanz noch die Referenzsubstanz enthalten.

45. Flüchtige Prüfsubstanzen mit Hilfe einer Mikrospritze in die verschlossenen Gefäße (Nummer 47) injizieren. Die Dosis berechnet sich aus dem injizierten Volumen und der Dichte der Prüfsubstanz.

46. Die Prüfgefäße erforderlichenfalls mit Wasser auffüllen, bis in allen Gefäßen dasselbe Flüssigkeitsvolumen erreicht ist. Sicherstellen, dass das Verhältnis *Headspace* zu Flüssigkeit (in der Regel 1:2) und die Konzentration der Prüfsubstanz so bemessen sind, dass ein ausreichendes Volumen an Sauerstoff im *Headspace* vorhanden ist, um einen vollständigen biologischen Abbau zu ermöglichen.

▼M4

47. Alle Gefäße dann dicht verschließen, z. B. mit Butylgummisepten und Aluminiumkrampen. Flüchtige Prüfsubstanzen sind in dieser Phase hinzuzufügen (Nummer 45). Wenn die Abnahme der DOC-Konzentration in der Prüflösung bestimmt und die ursprüngliche IC-Konzentration zum Zeitpunkt Null (sterile Kontrollen, Nummer 42e) oder sonstige Parameter bestimmt werden sollen, wird eine entsprechende Probe aus dem Prüfgefäß entnommen. Das Prüfgefäß wird dann samt Inhalt verworfen.

48. Die verschlossenen Flaschen auf einen Orbitalschüttler stellen (Nummer 15d); dabei darauf achten, dass die Schüttelgeschwindigkeit ausreicht, um eine gute Durchmischung der Flascheninhalte zu erreichen (z. B. 150 bis 200 rpm); im Dunkeln bei 20 °C ± 1 °C inkubieren.

*Probenahme*

49. Das Probenahmeschema richtet sich nach der lag-Phase und der kinetischen Geschwindigkeit des biologischen Abbaus der Prüfsubstanz. Die Flaschen werden am Tag der Probenahme für Analysen entnommen. Dies ist mindestens einmal in der Woche erforderlich, kann aber auch öfters (z. B. zweimal pro Woche) erforderlich sein, um eine vollständige Abbaukurve zu erhalten. Die benötigte Anzahl Replikatgefäße der Versuchsreihen $F_T$, $F_B$ und $F_C$ und, falls erforderlich, $F_I$ und $F_S$ vom Laborschüttler nehmen (siehe Nummer 42). Der Test dauert üblicherweise 28 Tage. Er kann vorzeitig beendet werden, wenn die Abbaukurve zeigt, dass die Plateau-Phase vor dem 28. Tag erreicht wurde. Proben aus den für den 28 Tag des Test für Analysen bestimmten Flaschen entnehmen und die Ergebnisse zur Berechnung der Konfidenzgrenzen oder des Variationskoeffizienten des prozentualen biologischen Abbaus verwenden. Die für die Hemmkontrollen und für die Kontrolle des abiotischen Abbau bestimmten Flaschen brauchen nicht so häufig beprobt zu werden wie die anderen Flaschen; Probenahmen am 1. und am 28. Tag reichen aus.

*Analyse des anorganischen Kohlenstoffs (IC)*

50. Das in den Flaschen gebildete $CO_2$ durch Messung der Zunahme der Konzentration an anorganischem Kohlenstoff (IC) während der Inkubation bestimmen. Zur Bestimmung des während des Tests gebildeten IC werden die beiden nachstehend beschriebenen Verfahren empfohlen. Da die Verfahren geringfügig unterschiedliche Ergebnisse liefern können, darf in einem Testlauf nur eines davon verwendet werden.

51. Methode a) wird empfohlen, falls damit zu rechnen ist, dass das Medium Reste z. B. von Galsfilterpapier und/oder nicht löslicher Prüfsubstanz enthält. Für diese Analyse kann ein Gaschromatograph verwendet werden, falls kein Kohlenstoffanalysator zur Verfügung steht. Es ist wichtig, dass die Flaschen (fast) Prüftemperatur haben, wenn das Gas im *Headspace* analysiert wird. Methode b) ist möglicherweise einfacher für Labors, die zur IC-Bestimmung Kohlenstoffanalysatoren verwenden. Es ist wichtig, dass die für die Umsetzung von $CO_2$ zu Carbonat verwendete Natriumhydroxidlösung (Nummer 21) entweder frisch zubereitet wird oder ihr IC-Gehalt bekannt ist, damit dieser Wert bei der Berechnung der Testergebnisse berücksichtigt werden kann (siehe Nummer 66-b.)

*Verfahren a): Ansäuerung auf pH < 3*

52. Vor jeder Versuchsreihe wird der Kohlenstoffanalysator mit einem geeigneten Standard (z. B. 1 % w/w $CO_2$ in $N_2$) kalibriert. Konzentrierte Orthophosphorsäure (Nummer 20) (z. B. 1 ml je 107 ml Prüfmedium hinzufügen) wird durch das Septum jedes Prüfgefäßes injiziert, um den pH-Wert des Mediums auf < 3 zu senken. Die Flaschen zurück auf den Laborschüttler stellen. Nach 1 Std. Schütteln bei Prüftemperatur die Flaschen wieder vom Laborschüttler herunternehmen, Gasportionen (z. B. 1 ml) aus dem *Headspace* der einzelnen Flaschen entnehmen und in den IC-Analysator injizieren. Die gemessenen IC-Konzentrationen werden in mg C/l notiert.

▼M4

53. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, dass nach Ansäuerung auf pH < 3 und Einstellung des Gleichgewichts bei einer Temperatur von 20 °C die Gleichgewichtskonstante für die Verteilung des $CO_2$ zwischen der flüssigen und der gasförmigen Phase in den Prüfgefäßen bei 1,0 liegt, wenn nach Konzentration gemessen wird (13). Dies ist für das Prüfsystem mindestens einmal wie folgt zu überprüfen:

Flaschen mit 5 und 10 mg/l anorganischem Kohlenstoff ansetzen; hierzu eine Lösung von wasserfreiem Natriumcarbonat ($Na_2CO_3$) in $CO_2$-freies Wasser geben, das wie folgt hergestellt wurde: Ansäuern von Wasser auf pH 6,5 mit konzentrierter Orthophosphorsäure (Nummer 20), Begasen über Nacht mit $CO_2$-freier Luft und Neutralisierung des pH mit Alkali. Sicherstellen, dass das Verhältnis *Headspace*-Volumen zu Flüssigkeitsvolumen dem der Testansätze (z. B. 1:2) entspricht. Ansäuern und Einstellen des Gleichgewichts wie unter Nummer 52 beschrieben; IC-Konzentrationen im *Headspace* und in der Flüssigphase bestimmen. Prüfen, ob beide Konzentrationen innerhalb des Versuchfehlers denselben Wert liefern. Wenn nicht, sollte der Experimentator seine Verfahren überprüfen. Diese Kontrolle der IC-Verteilung zwischen flüssiger und gasförmiger Phase braucht nicht bei jedem Test durchgeführt werden; sie könnte auch während des Kalibrierens erfolgen.

54. Wenn die DOC-Abnahme zu bestimmen ist (nur bei wasserlöslichen Prüfsubstanzen), sollten die Proben aus der Flüssigphase separater Flaschen (ohne Ansäuerung) entnommen, membranfiltriert und in den DOC-Analysator injiziert werden. Diese Flaschen können erforderlichenfalls auch für andere Analysen zur Bestimmung des Primärabbaus verwendet werden.

*Verfahren b): Umsetzung von $CO_2$ zu Carbonat*

55. Vor jeder Versuchsreihe wird der Kohlenstoffanalysator mit einem geeigneten Standard (z. B. eine Lösung von Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$) in $CO_2$-freiem Wasser (siehe Nummer 53) in Konzentrationen von 0 mg/l bis 20 mg/l) kalibriert. Dann Natriumhydroxid-Lösung (7M, Nummer 21) (z. B. 1 ml zu 107 ml Medium) durch das Septum in jede für die Probenahme bestimmte Flasche injizieren und die Flaschen 1 Std. bei Prüftemperatur schütteln. Für alle an einem bestimmten Tag verworfenen Flaschen wird dieselbe NaOH-Lösung verwendet, allerdings nicht unbedingt bei allen Probenahmen, die im Laufe des Versuchs durchgeführt werden. Werden absolute Werte des IC-Gehalts in den Blindwertansätzen für jede Probenahme benötigt, so ist der IC-Gehalt der NaOH-Lösung bei jeder Verwendung der Lösung zu bestimmen. Die Gefäße vom Laborschüttler nehmen und den Inhalt absetzen lassen. Aus der Flüssigphase der einzelnen Prüfgefäße mit Hilfe einer Spritze ein geeignetes Volumen (z. B. 50 µl bis 1 000 µl) entnehmen. Die Proben in den IC-Analysator injizieren und die IC-Konzentrationen aufzeichnen. Darauf achten, dass der eingesetzte Analysator für die bei diesem Verfahren anfallenden alkalischen Proben entsprechend ausgerüstet ist.

56. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Tatsache, dass nach Zugabe von Alkali und Schütteln die Konzentration an IC im *Headspace* vernachlässigbar klein ist. Dies ist für das Prüfsystem mindestens einmal zu überprüfen. Hierzu IC-Standards verwenden, Alkali zugeben, stabilisieren und sodann die IC-Konzentration sowohl im *Headspace* als auch in den Flüssigphasen bestimmen (siehe Nummer 53). Die Konzentration im *Headspace* sollte nahe an Null liegen. Es ist nicht erforderlich, diese praktisch vollständige $CO_2$-Adsorption bei jedem Versuch zu überprüfen.

57. Wenn die DOC-Abnahme zu bestimmen ist (nur bei wasserlöslichen Prüfsubstanzen), sollten die Proben aus der Flüssigphase separater Flaschen (ohne Alkali-Zusatz) entnommen, membranfiltriert und in den DOC-Analysator injiziert werden. Diese Flaschen können erforderlichenfalls auch für anderen Analysen zur Bestimmung des Primärabbaus verwendet werden.

▼M4

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Berechnung der Ergebnisse**

58. Es wird angenommen, dass bei vollständiger Mineralisierung der Prüfsubstanz zu $CO_2$ die theoretische Menge an anorganischem Kohlenstoff (ThIC) nach Abzug des Blindwerts der Menge an gesamtem organischem Kohlenstoff (TOC) entspricht, die zu Beginn des Tests in die Prüfgefäße gegeben wurde:

$$ThIC = TOC$$

Der gesamte (mg) anorganische Kohlenstoff (TIC) in den Prüfgefäßen ist:

$$TIC = (\text{mg C in der Flüssigphase} + \text{mg C im } \textit{Headspace}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Gleichung [1]}$$

Dabei sind:

$V_L$ = das Volumen der Flüssigkeit im Prüfgefäß (in Liter);

$C_L$ = die IC-Konzentration in der Flüssigphase in Milligramm Kohlenstoff je Liter Flüssigkeit (mg/l);

$V_H$ = das Volumen des *Headspaces* (in Liter);

$C_H$ = die IC-Konzentration im *Headspace* in Milligramm Kohlenstoff je Liter Gas (mg/l).

Die Berechnung des TIC für die beiden Analyseverfahren, die bei diesem Test verwendet werden, wird unter den Nummern 60 und 61 beschrieben. Der prozentuale biologische Abbau (*% D*) wird in beiden Fällen mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{Gleichung [2]}$$

Dabei sind:

$TIC_t$ = der TIC im Prüfgefäß zur Zeit t in Milligramm (mg);

$TIC_b$ = der mittlere TIC im Blindwert zur Zeit t in Milligramm (mg);

TOC = der TOC, der am Testbeginn in das Prüfgefäß gegeben wurde, in Milligramm (mg).

Der Abbaugrad (% D) der Prüfsubstanz ($F_T$), der Referenzsubstanz ($F_C$) und, sofern dies vorgesehen ist, der Hemmkontrolle ($F_I$) wird aus dem jeweiligen produzierten TIC für jeden Probenahmezeitpunkt berechnet.

59. Wenn während des Versuchs der TIC-Gehalt in den sterilen Kontrollen ($F_S$) deutlich angestiegen ist, kann darauf geschlossen werden, dass ein abiotischer Abbau der Prüfsubstanz stattgefunden hat, was bei der Berechnung von D in Gleichung [2] zu berücksichtigen ist.

**Ansäuerung auf pH < 3**

60. Nach Ansäuerung auf pH < 3 und Einstellung des Gleichgewichts kommt es zu einem Ausgleich zwischen der TIC-Konzentration in der Flüssigphase und der TIC-Konzentration in der Gasphase. Daher muss in diesem Fall nur die IC-Konzentration in der Gasphase bestimmt werden. Somit ist nach Gleichung [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, wobei $V_B$ das Volumen der Serumflasche ist.

**Umsetzung von $CO_2$ zu Carbonat**

61. Bei diesem Verfahren werden die Berechnungen wie in Gleichung [1] beschrieben durchgeführt; der vernachlässigbar kleine IC-Gehalt in der Gasphase wird jedoch ignoriert, so dass $V_H \times C_H = 0$, und $TIC = V_L \times C_L$ ist.

▼M4

**Angabe der Ergebnisse**

62. Eine Abbaukurve durch Auftragen der prozentualen Abbaugrade (D) gegen die Inkubationszeit erstellen und, wenn möglich, lag-Phase, Abbauphase, 10-Tage-Fenster und Plateau-Phase (die Phase, in der der maximale Abbaugrad erreicht ist und die Abbaukurve abnimmt) kennzeichnen. Wenn in den parallelen $F_T$–Prüfgefäßen vergleichbare Ergebnisse (< 20 % Differenz) erzielt wurden, die Abbaukurve mit den Mittelwerten erstellen (siehe Anlage 2, Schaubild 1); andernfalls Abbaukurven für jedes Prüfgefäß erstellen. Den Mittelwert des prozentualen Abbaus in der Plateau-Phase bestimmen oder den höchsten Abbauwert verwenden (z. B. wenn die Abbaukurve in der Plateau-Phase abnimmt), wobei jedoch in letzterem Fall zu ermitteln ist, dass es sich dabei nicht um einen Ausreißer handelt. Diesen maximalen biologischen Abbauwert als „Abbaugrad der Prüfsubstanz" im Prüfbericht angeben. Wenn die Anzahl der Prüfgefäße nicht ausreichte, um eine Plateau-Phase zu erstellen, werden die gemessenen Daten des letzten Prüftags verwendet und daraus ein Mittelwert gebildet. Mit letzterem Wert, der den Durchschnitt aus fünf Replikaten darstellt, wird die Genauigkeit angegeben, mit der der prozentuale Abbau ermittelt wurde. Im Prüfbericht ist ebenfalls der am Ende des 10-Tage-Fensters erzielte Wert anzugeben.

63. Auf dieselbe Weise Abbaukurven für die Referenzsubstanz $F_C$ und, sofern angesetzt, Kurven der abiotischen Eliminationskontrolle $F_S$ und der Hemmkontrolle $F_I$ erstellen.

64. Die Mengen an TIC, die in den Blindkontrollen ($F_B$) und, sofern im Versuch enthalten, in den Gefäßen $F_S$ (abiotische Kontrolle) gebildet wurden, angeben.

65. D für die $F_I$-Gefäße auf der Grundlage des erwarteten theoretischen IC-Ertrags, der nur aus der Referenzsubstanz der Mischung stammt, berechnen. Ist am 28. Tag $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, so kann angenommen werden, dass die Aktivität des Inokulums durch die Prüfsubstanz gehemmt wurde, was ein Grund für die unter den Prüfbedingungen erzielten niedrigen $D_{FT}$–Werte sein kann. In diesem Fall kann der Versuch mit einer niedrigeren Prüfkonzentration wiederholt werden, wobei der DIC im Inokulum und der TIC in den Blindkontrollen möglichst reduziert werden sollte, da sich andernfalls durch die niedrigere Konzentration die Genauigkeit des Verfahrens verschlechtert. Alternativ kann ein anderes Inokulum verwendet werden. Wenn in den Gefäßen $F_S$ (abiotische Kontrolle) eine deutliche TIC-Zunahme (> 10 %) festgestellt wird, ist dies ein Hinweis auf mögliche abiotische Abbauprozesse.

**Gültigkeit der Ergebnisse**

66. Der Test ist gültig, wenn

a) der mittlere prozentuale Abbaugrad der Referenzsubstanz in den Prüfgefäßen $F_C$ am 14. Tag der Inkubation > 60 % ist; und

b) die mittlere Menge an produziertem TIC in den Blindwertansätzen $F_B$ am Ende des Tests > 3 mg/l Kohlenstoff beträgt.

Werden diese Grenzwerte nicht erreicht, so sollte der Versuch mit einem Inokulum aus einer anderen Quelle wiederholt werden und/oder die angewandten Verfahren sollten überarbeitet werden. Bereitet z. B. die starke IC-Produktion in den Blindwertansätzen Schwierigkeiten, so ist das unter den Nummern 27 bis 32 beschriebene Verfahren anzuwenden.

(1) Der prozentuale Abbau in den Gefäßen $F_C$ mit der Referenzsubstanz.
(2) Der prozentuale Abbau in den Gefäßen $F_I$.

▼M4

67. Erreicht die Prüfsubstanz nicht 60 % des ThIC und wurde nachgewiesen, dass sie keine Hemmwirkung (Nummer 65) hat, so kann der Versuch mit einem höher konzentrierten Inokulum (bis zu 30 mg/l Belebtschlamm und 100 ml Ablauf/l) oder mit Inokuli aus anderen Quellen wiederholt werden; dies gilt insbesondere, wenn der Abbaugrad 20 bis 60 % beträgt.

**Auswertung der Ergebnisse**

68. Erreicht eine Prüfsubstanz bei diesem Versuch innerhalb des 10-Tage-Fensters einen Abbaugrad von > 60 % des ThIC, so ist dies ein Nachweis dafür, dass sie unter aeroben Bedingungen leicht abbaubar ist.

69. Wurde der Grenzwert von 60 % des ThIC nicht erreicht, so wird der pH-Wert des Mediums in den Flaschen gemessen, die nicht angesäuert oder alkalisiert wurden; ein Wert von weniger als 6,5 könnte darauf hinweisen, dass eine Nitrifikation stattgefunden hat. In diesem Fall den Versuch mit einer höher konzentrierten Pufferlösung wiederholen.

**Prüfbericht**

70. Eine Tabelle mit dem prozentualen Abbau (D) jeder Prüfsubstanz ($F_T$), Referenzkontrolle ($F_C$) und, sofern diese durchgeführt wurde, Hemmkontrolle ($F_I$) für jeden Probenahmetag erstellen. Werden vergleichbare Ergebnisse für die Replikatgefäße erzielt, so wird der durchschnittliche prozentuale Abbau (D) als Funktion der Zeit in einer Kurve dargestellt. Die Menge an TIC in den Blindkontrollen ($F_B$) und in den sterilen Kontrollen ($F_S$) sowie den DOC und/oder sonstige Analyten und ihren prozentualen Abbau angeben.

71. Den mittleren Abbaugrad (prozentualen Abbau) D während der Plateau-Phase oder den maximalen Abbaugrad (wenn die Abbaukurve in der Abbauphase abnimmt) bestimmen und als „Abbaugrad der Prüfsubstanz“ angeben. In letzterem Fall ist sicherzustellen, dass es sich bei dem Maximalwert nicht um einen Ausreißer handelt.

72. Der Prüfbericht muss folgende Angaben enthalten:

*Prüfsubstanz:*

— gebräuchliche Bezeichnung, chemische Bezeichnung, CAS-Nummer, Strukturformel und relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;

— Reinheit (Verunreinigungen) der Prüfsubstanz.

*Prüfbedingungen:*

— Hinweis auf diese Prüfmethode;

— Beschreibung des verwendeten Prüfsystems (z. B. Volumen des Prüfgefäßes, Verhältnis *Headspace* zu Flüssigphase, Rührmethode usw.);

— Applikation der Prüf- und Referenzsubstanz auf das Prüfsystem: verwendete Prüfkonzentration und Anteil an Kohlenstoff, der jeder Prüfflasche hinzugegeben wurde; etwaige Verwendung von Lösungsmitteln;

— Angaben zum Inokulum, evtl. Vorbehandlung und Vorkonditionierung;

— Inkubationstemperatur;

— Validierung des Prinzips der IC-Analyse;

— wesentliche Merkmale des verwendeten Kohlenstoffanalysators (und anderer verwendeter Analysemethoden);

— Anzahl der Replikate.

*Ergebnisse:*

— Rohdaten und berechnete Werte der biologischen Abbaubarkeit in Tabellenform;

▼M4

— die Kurve des prozentualen Abbaus, aufgetragen gegen die Zeit, für Prüf- und Referenzsubstanz; Angabe von lag-Phase, Abbauphase, 10-Tage-Fenster und Steigung;

— prozentualer Abbau auf dem Plateau, zum Versuchsende und nach dem 10-Tage-Fenster;

— Angabe von Gründen, falls die Prüfergebnisse verworfen werden;

— weitere Faktoren, die für das Prüfverfahren von Bedeutung waren;

— Diskussion der Ergebnisse.

*LITERATUR:*


1. Kapitel C.4 dieses Anhangs, Biologische Abbaubarkeit — Bestimmung der „leichten“ biologischen Abbaubarkeit: $CO_2$-Entwicklungstest (Methode C.4-C).

2. Sturm R.N. (1973): Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A.,Oil Chem Soc. 50: 159-167.

3. Larson R.J. (1979): Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

4. Larson R.J., Hansmann M.A. and Bookland E.A. (1996): Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

5. ISO 9439 (1990; überarbeitet 1999): (Sturm). Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der vollständigen aeroben biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe im wäßrigen Medium — Verfahren mit Kohlenstoffdioxid-Messung.

6. US EPA (1996): Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

7. US EPA (1996): Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

8. Gledhill W.E. (1975): Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

9. Weytjens D., Van Ginneken I. and Painter H.A. (1994): The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

10. Ennis D.M. and Kramer A. (1975): A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

11. Ennis D.M., Kramer A., Jameson C.W., Mazzoccki P.H. and Bailey P.H. (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

12. Boatman R.J., Cunningham S.L. and Ziegler D.A. (1986): A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

13. Struijs J. and Stoltenkamp J. (1990): Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

14. Birch R.R. and Fletcher R.J. (1991): The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

15. Birch R.R., Biver C., Campagna R., Gledhill W.E., Pagga U., Steber J., Reust H., and Bontinck W.J. (1989): Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

16. ISO 14593, (1999) Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen im wässrigen Medium — Verfahren mittels Bestimmung des anorganischen Kohlenstoffs in geschlossenen Flaschen ($C0_2$-*Headspace*-Test).

17. Battersby N.S. (1997): The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

18. US EPA (1996): Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

19. Battersby N.S., Ciccognani D., Evans M.R., King D., Painter H.A., Peterson D.R. and Starkey M. (1999). An „inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

20. Kapitel C.4 dieses Anhangs, Biologische Abbaubarkeit — Bestimmung der „leichten" biologischen Abbaubarkeit.

21. OECD (1988): OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Bericht des Vorsitzenden (M. Hashimoto; MITI) und Abschlussbericht (M. Kitano und M. Takatsuki; CITI). Paris.

22. Kapitel C.11 dieses Anhangs, Biologische Abbaubarkeit — Belebtschlamm: Prüfung der Atmungshemmung.

23. Struijs J., Stoltenkamp-Wouterse M.J. and Dekkers A.L.M. (1995): A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

24. EU (1999): Ring-test of the ISO Headspace $CO_2$ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Bericht EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

25. ISO 10634 (1996) Wasserbeschaffenheit — Anleitung für die Vorbereitung und Behandlung von in Wasser schwer löslichen organischen Verbindungen für die nachfolgende Bestimmung ihrer biologischen Abbaubarkeit in einem wäßrigen Medium.

▼M4

*Anlage 1*

ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN

**IC:** anorganischer Kohlenstoff.

**$ThCO_2$:** theoretisches Kohlendioxid (mg) — Kohlendioxidmenge, die sich rechnerisch aus dem bekannten oder gemessenen Kohlenstoffgehalt der Prüfsubstanz bei vollständiger Mineralisation ergibt; auch angegeben als mg Kohlendioxidentwicklung pro mg Prüfsubstanz.

**DOC:** gelöster organischer Kohlenstoff — Menge an organischem Kohlenstoff, die in der Lösung vorliegt oder einen Filter mit 0,45 µm Porengröße passiert bzw. nach 15 Minuten Zentrifugieren bei 40 000 $m/s^{-2}$ (± 4 000 g) im Überstand verbleibt.

**DIC:** gelöster anorganischer Kohlenstoff

**ThIC:** Theoretische Menge an anorganischem Kohlenstoff

**TIC:** Gesamter anorganischer Kohlenstoff

**Biologisch leicht abbaubar:** ein willkürlich festgelegter Begriff für eine Kategorie von chemischen Substanzen, die bestimmte Screening-Tests auf vollständige biologische Abbaubarkeit durchlaufen haben; diese Tests sind so stringent, dass angenommen wird, dass diese Substanzen im aquatischen Milieu unter aeroben Bedingungen schnell und vollständig biologisch abgebaut werden.

**10-Tage-Fenster:** der 10-Tage-Abschnitt, der unmittelbar auf das Erreichen von 10 % Abbau folgt.

**Inhärente biologische Abbaubarkeit:** Begriff für eine Kategorie von Substanzen, deren biologische Abbaubarkeit (primär oder vollständig) eindeutig in einem beliebigen Test auf biologische Abbaubarkeit nachgewiesen worden ist.

**Vollständiger aerober biologischer Abbau:** Abbaugrad der Prüfsubstanz, der nach vollständiger Zerlegung der Substanz durch Mikroorganismen zur Bildung von Kohlendioxid, Wasser, Mineralsalzen und neuen mikrobiellen Zellbestandteilen (Biomasse) führt.

**Mineralisation:** vollständiger Abbau einer organischen Verbindung zu $CO_2$ und $H_2O$ unter aeroben Bedingungen und zu $CH_4$, $CO_2$ und $H_2O$ unter anaeroben Bedingungen.

**Lag-Phase:** Zeitspanne zwischen dem Beginn eines Tests und dem Zeitpunkt, an dem die Akklimatisation und/oder Adaptation der abbauenden Mikroorganismen erreicht ist und der biologische Abbau einer Prüfsubstanz oder eines rein organischen Materials einen nachweisbaren Umfang angenommen hat (z. B. 10 % des maximalen theoretischen biologischen Abbaus bzw. je nach Genauigkeit des Messverfahrens auch weniger).

**Abbauphase:** Zeitspanne zwischen dem Ende der lag-Phase und dem Erreichen von 90 % des maximalen Abbaugrades.

**Plateau-Phase:** die Phase, in der der maximale Abbaugrad erreicht ist und die Abbaukurve abnimmt.

**Prüfsubstanz:** Jede Substanz oder jedes Gemisch, die/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

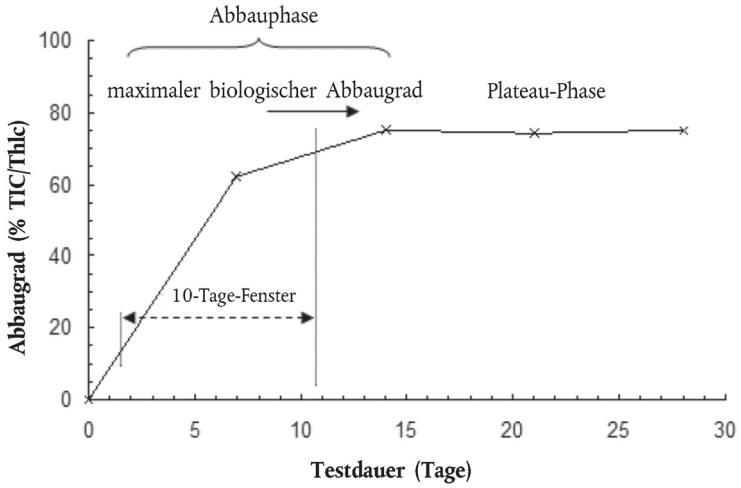
▼M4

*Anlage 2*

**Beispiel einer Abbaukurve**

*Abbildung 1*

**Bioabbau von Octan-1-ol im $CO_2$-*Headspace*-Test**




Glossar

Abbaugrad

Abbauphase

maximaler biologischer Abbaugrad

Plateau-Phase

10-Tage-Fenster

Testdauer (Tage)

▼M4

C. 30 **BIOAKKUMULATION IN TERRESTRISCHEN OLIGOCHAETEN**

EINLEITUNG

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 317 (2010). Zur Untersuchung des Verbleibs von Schadstoffen in der Umwelt liegen die Methode zur Bestimmung der „Biokonzentration: Durchfluss-Fischtest“ (Kapitel C.13 dieses Anhangs (49)) und die Methode zur Bestimmung der „Bioakkumulation in sedimentbewohnenden benthischen Oligochaeten“ (53) vor, die 1996 bzw. 2008 veröffentlicht wurden. Jedoch sind Rückschlüsse aus Daten über die aquatische Bioakkumulation auf die Reaktionen von Bodenorganismen wie Regenwürmern schwierig, wenn nicht gar unmöglich. Modellberechnungen auf der Grundlage der Lipophilie einer Prüfsubstanz, z. B. (14) und (37), werden derzeit zur Beurteilung der Bioakkumulation von chemischen Substanzen im Boden, wie z. B. im technischen Leitfaden der EU (Technical Guidance Document) (19), verwendet. Auf die Notwendigkeit einer kompartimentspezifischen Prüfmethode wurde bereits eingegangen, z. B. (55). Eine solche Methode ist vor allem für die Abschätzung der Sekundärvergiftung (*secondary poisoning*) in der terrestrischen Nahrungskette von Bedeutung (4). Mehrere nationale Prüfmethoden befassen sich mit der Bioakkumulation in anderen Organismen als Fischen, z. B. (2) und (72). So wurde eine Methode zur Bestimmung der Bioakkumulation aus kontaminierten Böden in Regenwürmern (*Eisenia fetida*, Savigny) und Topfwürmern von der *American Society for Testing and Materials* entwickelt (3). Eine international anerkannte Methode zur Bestimmung der Bioakkumulation in dotiertem Boden wird die Risikoanalyse für Chemikalien in terrestrischen Ökosystemen verbessern, z. B. (25) und (29).

2. Bodenfressende Invertebraten sind bodengebundenen chemischen Substanzen ausgesetzt. Unter diesen Tieren spielen terrestrische Oligochaeten eine wichtige Rolle für die Bodenstruktur und die Bodenfunktionen (15) (20). Terrestrische Oligochaeten leben im Boden und zum Teil an der Bodenoberfläche (insbesondere in der Streuschicht); ihrer Biomasse nach sind sie häufig die am stärksten vertretene Art (54). Durch Bioturbation des Bodens und als Beutetiere können diese Tiere einen erheblichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von chemischen Substanzen für andere Organismen wie Invertebraten (z. B. Raubmilben und Käfer; z. B. (64)) oder räuberische Vertebraten (z. B. Füchse und Möwen) (18) (62) haben. In Anlage 5 sind einige Arten von terrestrischen Oligochaeten beschrieben, die derzeit in ökotoxikologischen Untersuchungen verwendet werden.

3. Die ASTM-Richtlinie „Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus*“ (3) enthält zahlreiche wesentliche und nützliche Angaben für die Durchführung der vorliegenden Prüfmethode zur Bestimmung der Bioakkumulation im Boden. Weitere Dokumente, auf die in dieser Prüfmethode verwiesen wird, sind Kapitel C.13 dieses Anhangs „Biokonzentration: Durchfluss-Fischtest“ (49) und die OECD-Prüfrichtlinie (TG) 315 „Bioakkumulation in sedimentbewohnenden benthischen Oligochaeten“ (53). Praktische Erfahrungen mit der Untersuchung der Bioakkumulation im Boden und Veröffentlichungen aus der Literatur z. B. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79) sind ebenfalls wichtige Informationsquellen für diese Prüfmethode.

4. Diese Prüfmethode wird am geeignetsten für stabile, neutrale organische Substanzen eingesetzt, die Tendenz haben, am Boden zu adsorbieren. Sie kann auch für die Testung der Bioakkumulation stabiler metallorganischer Verbindungen, die an den Boden gebunden sind, herangezogen werden. Ebenso eignet sie sich für Metalle und sonstige Spurenelemente.

VORAUSSETZUNGEN

5. Untersuchungen zur Bestimmung der Bioakkumulation einer chemischen Substanz in terrestrischen Oligochaeten wurden mit Schwermetallen (siehe z. B. (63)) und persistenten, organischen Stoffen mit log $K_{ow}$–Werten zwischen 3,0 und 6,0 durchgeführt, z. B. (40). Solche Tests können auch verwendet werden für

— chemische Substanzen mit einem log $K_{ow}$-Wert von > 6,0 (superhydrophobe chemischen Substanzen);

▼M4

— chemische Substanzen, die zu einer Kategorie von organischen Chemikalien gehören, von denen bekannt ist, dass sie ein Potenzial zur Bioakkumulation in lebenden Organismen haben, z. B. oberflächenaktive Stoffe oder Stoffe mit hohem Adsorptionsvermögen;

— chemische Substanzen mit Struktureigenschaften, die auf ein Bioakkumulationspotenzial hinweisen, z. B. Analoga von chemischen Substanzen mit bekanntem Bioakkumulationspotenzial, und

— Metalle.

6. Vor Beginn der Studie müssen bestimmte Informationen zur Prüfsubstanz wie Common name, chemische Bezeichnung (vorzugsweise IUPAC-Name), Strukturformel, CAS-Nummer, Reinheitsgrad, Sicherheitshinweise, angemessene Lagerungsbedingungen und Analysemethoden vorliegen. Darüber hinaus sollten folgende Angaben bekannt sein:

a) Wasserlöslichkeit;

b) Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, $K_{ow}$;

c) Boden-Wasser-Verteilungskoeffizient, ausgedrückt als $K_{oc}$;

d) Dampfdruck;

e) Abbaubarkeit (z. B. im Boden, Wasser);

f) bekannte Metaboliten.

7. Es können sowohl radioaktiv markierte als auch nicht radioaktiv markierte Prüfsubstanzen verwendet werden. Zur Erleichterung der Analyse wird jedoch die Verwendung von radioaktiv markierten Prüfsubstanzen empfohlen. Diese Wahl wird von den Nachweisgrenzen oder der Notwendigkeit abhängen, Ausgangssubstanzen und Metaboliten zu messen. Wird eine radioaktiv markierte Prüfsubstanz verwendet und werden die gesamten radioaktiven Rückstände bestimmt, so ist es wichtig, dass die radioaktiv markierten Rückstände sowohl im Boden als auch in den Testorganismen nach dem prozentualen Anteil der Ausgangsprüfsubstanz und der markierten Nichtausgangssubstanz gekennzeichnet sind, z. B. in Proben, die im *steady state* oder am Ende der Aufnahmephase genommen wurden, so dass ein Bioakkumulationsfaktor (BAF) für die Ausgangsprüfsubstanz und für die betreffenden Bodenmetaboliten (siehe Nummer 50) berechnet werden kann. Möglicherweise muss die hier beschriebene Methode angepasst werden, z. B. um über eine ausreichende Biomasse für die Messung von nicht radioaktiv markierten organischen Prüfsubstanzen oder Metallen zu verfügen. Werden die gesamten radioaktiven Rückstände (durch Flüssigszintillationszählung nach Extrahieren, Verbrennung oder Gewebeauflösung) bestimmt, so basiert der Bioakkumulationsfaktor auf der Ausgangsprüfsubstanz und den Metaboliten. Die Berechnung des BAF sollte sich vorzugsweise auf die Konzentration der Ausgangsprüfsubstanz in den Organismen und auf die gesamten radioaktiven Rückstände stützen. Anschließend wird der nach dem Lipidgehalt der Würmer und dem Gehalt des Bodens an organischem Kohlenstoff normalisierte Biota-Boden-Akkumulationsfaktor (BSAF) anhand des BAF berechnet, um die Ergebnisse aus verschiedenen Bioakkumulationstests vergleichen zu können.

8. Die Toxizität der Prüfsubstanz gegenüber der Testspezies sollte bekannt sein, z. B. eine Effektkonzentration ($EC_x$) oder letale Konzentration ($LC_x$) für die Dauer der Aufnahmephase (z. B. (19)). Die ausgewählte Konzentration der Prüfsubstanz sollte möglichst ca. 1 % ihres akuten asymptotischen $LC_{50}$-Wertes entsprechen und mindestens zehnmal höher sein als die durch das angewandte analytische Verfahren vorgegebene Nachweisgrenze im Boden. Soweit verfügbar sollten bevorzugt Toxizitätswerte aus Langzeitstudien über subletale Endpunkte (51) (52) herangezogen werden. Sind solche Daten nicht verfügbar, kann ein akuter Toxizitätstest nützliche Informationen liefern (siehe z. B. (23)).

▼M4

9. Eine geeignete Analysemethode von bekannter Zuverlässigkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit sollte für die Quantifizierung der Prüfsubstanz in den Testlösungen, im Boden und im biologischen Material verfügbar sein ebenso wie Einzelheiten zur Probenvorbereitung und -aufbewahrung und Sicherheitsdatenblätter. Auch die analytischen Nachweisgrenzen der Prüfsubstanz im Boden und Wurmgewebe sollten bekannt sein. Wenn eine $^{14}C$-markierte Prüfsubstanz verwendet wird, sollten die spezifische Radioaktivität (d. h. Bq mol-1) und der prozentuale Anteil der mit Verunreinigungen einhergehenden Radioaktivität bekannt sein. Zur Erleichterung der Analyse sollte die spezifische Radioaktivität der Prüfsubstanz hoch genug sein; auch sollten die Prüfkonzentrationen keine toxischen Effekte verursachen.

10. Der Versuch kann mit Kunsterde oder mit natürlichem Boden durchgeführt werden. Die Merkmale des verwendeten Bodens, z. B. Herkunft des Bodens oder seiner Bestandteile, pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff, Korngrößenverteilung (Anteil an Sand, Schluff und Lehm) und Wasserhaltekapazität (WHC) sollten vor Testbeginn bekannt sein (3) (48).

PRINZIP DER PRÜFMETHODE

11. Zu den charakteristischen Parametern der Bioakkumulation einer Prüfsubstanz gehören der Bioakkumulationsfaktor (BAF), die Aufnahmekonstante ($k_s$) und die Eliminationskonstante ($k_e$). Definitionen dieser Parameter sind in Anlage 1 enthalten.

12. Der Test besteht aus zwei Phasen: der Aufnahme-/Expositionsphase und der Eliminations-/Post-Expositionsphase. Während der Aufnahmephase werden Replikatgruppen von Würmern gegenüber dem mit der Prüfsubstanz dotierten Boden exponiert. Neben diesen Testtieren werden Gruppen von Kontrollwürmern unter identischen Bedingungen, jedoch ohne Prüfsubstanz gehalten. Das Trockengewicht und der Lipidgehalt der Prüforganismen werden bestimmt. Hierzu können Würmer der Kontrollgruppe verwendet werden. Analytische Hintergrundwerte (Blindwerte) können durch die Analyse von Proben der Kontrollwürmer und -böden ermittelt werden. Für die Eliminationsphase werden die Würmer in einen Boden ohne Prüfsubstanz umgesetzt. Eine Eliminationsphase ist immer erforderlich, es sei denn, während der Expositionsphase wurden nur vernachlässigbare Mengen Prüfsubstanz aufgenommen. Sie liefert Informationen über die Geschwindigkeit, mit der die Prüfsubstanz durch die Testorganismen ausgeschieden wird (z. B. (27)). Wurde während der Aufnahmephase kein *steady state* erreicht, so sollte sich die Bestimmung der kinetischen Parameter — kinetischer Bioakkumulationsfaktor BAFk, Aufnahme- und Eliminationskonstante(n) — vorzugsweise auf die gleichzeitige Anpassung der Ergebnisse der Aufnahmephase und der Eliminationsphase stützen. Die Konzentration der Prüfsubstanz in/an den Würmern wird während der beiden Phasen durchgehend überwacht.

13. Während der Aufnahmephase werden über einen Zeitraum von 14 Tagen (Enchytraeen) bzw. 21 Tagen (Regenwürmer) Messungen vorgenommen, bis der *steady state* erreicht ist (11) (12) (67). Der *steady state* tritt ein, wenn die Kurve der gegen die Zeit aufgetragenen Konzentration im Wurm parallel zur Zeitachse verläuft und wenn drei aufeinander folgende Konzentrationsanalysen, die an Proben durchgeführt werden, die im Abstand von mindestens zwei Tagen genommen wurden, auf Basis von statistischen Vergleichen (z. B. Varianzanalyse, Regressionsanalyse) um nicht mehr als ± 20 % voneinander abweichen.

14. In der Eliminationsphase werden die Testorganismen in Gefäße umgesetzt, die das gleiche Substrat aber keine Prüfsubstanz enthalten. Während der Eliminationsphase werden über einen Zeitraum von 14 Tagen (Enchytraeen) bzw. 21 Tagen (Regenwürmer) Messungen genommen, es sei denn, bei einer früheren analytischen Messung wurde eine 90 %ige Abnahme der Prüfsubstanzrückstände in den Würmern festgestellt. Die Konzentration der Prüfsubstanz in den Würmern am Ende der Eliminationsphase wird

▼M4

als nicht eliminierte Rückstände im Bericht verzeichnet. Der *steady-state*-Bioakkumulationsfaktor ($BAF_{ss}$) wird möglichst auf zweierlei Weise berechnet: zum einen als Verhältnis der Konzentration in den Würmern ($C_a$) zur Konzentration im Boden ($C_s$) bei sichtbarem *steady state* und zum anderen als ein kinetischer Bioakkumulationsfaktor, $BAF_K$, d. h. als Verhältnis der Aufnahmekonstante im Boden ($k_s$) zur Eliminationskonstanten ($k_e$) (Definitionen siehe in Anlage 1), wobei von einer Kinetik 1. Ordnung ausgegangen wird (Berechnungen siehe in Anlage 2). Ist eine Kinetik 1. Ordnung eindeutig nicht anwendbar, so sind andere Modellgleichungen zu verwenden.

15. Die Aufnahmekonstante, die Eliminationskonstante (oder Konstanten, wenn andere Modelle verwendet werden), der kinetische Bioakkumulationsfaktor ($BAF_K$) und, wenn möglich, die Konfidenzgrenzen eines jeden dieser Parameter werden anhand computergestützter Modellgleichungen berechnet (Anleitungen siehe Anlage 2). Die Anpassungsgüte eines Modells lässt sich z. B. anhand des Korrelationskoeffizienten oder Bestimmungskoeffizienten (Koeffizienten nahe an 1 deuten auf eine gute Anpassung hin) oder anhand der Chi-Quadrat-Verteilung feststellen. Auch kann die Größe des Standardfehlers oder die Konfidenzgrenze um die geschätzten Parameter einen Hinweis auf die Anpassungsgüte des Modells geben.

16. Zur Verringerung der Variabilität der Testergebnisse für Prüfsubstanzen mit hoher Lipophilie sollten die Bioakkumulationsfaktoren im Verhältnis zum Lipidgehalt und zum Gehalt an organischem Kohlenstoff (kg organischer Kohlenstoff im Boden (OC) kg-1 Lipidgehalt der Würmer) ausgedrückt werden. Dieses Konzept stützt sich auf die Tatsache, dass bei bestimmten Chemikalienklassen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Bioakkumulationspotenzial und der Lipophilie besteht, wie dies für Fische eindeutig festgestellt wurde (47). Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Lipidgehalt der Fische und der Bioakkumulation solcher Substanzen. Für benthische Organismen wurden ähnliche Korrelationen festgestellt, z. B. (30) (44). Auch für terrestrische Oligochaeten wurde diese Korrelation nachgewiesen, z. B. (5) (6) (7) (14). Wenn genügen Wurmgewebe zur Verfügung steht, kann der Lipidgehalt der Testtiere mit demselben biologischen Material bestimmt werden, das für die Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration verwendet wurde. Als Alternative können Kontrolltiere zur Bestimmung des Lipidgehalts verwendet werden.

GÜLTIGKEIT DES TESTS

17. Der Test ist gültig, wenn sowohl die Kontrollgruppen als auch die Testgruppen folgende Kriterien erfüllen:

— Am Ende des Tests beträgt die Gesamtmortalität während der Aufnahme- und der Eliminationsphase höchstens 10 % (Regenwürmer) oder 20 % (Enchytraeen) der Gesamtanzahl der eingesetzten Würmer.

— Für *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* beträgt der mittlere Masseverlust am Ende der Aufnahmephase und am Ende der Eliminationsphase nicht mehr als 20 % des anfänglichen Frischgewichts zu Beginn jeder Phase.

BESCHREIBUNG DER METHODE

**Testspezies**

18. Für Bioakkumulationstests werden mehrere Arten von terrestrischen Oligochaeten empfohlen. In Anlage 5 sind die am häufigsten verwendeten Arten beschrieben: *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* (Lumbricidae) sowie *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* und *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae).

▼M4

**Apparatur**

19. Die Verwendung von Materialien, die sich auflösen können, die Prüfsubstanz absorbieren oder andere chemischen Substanzen auslaugen bzw. schädigende Auswirkungen auf die Testtiere haben können, sollte für alle verwendeten Teile sorgfältigst vermieden werden. Es können rechteckige oder zylindrische Standardbehälter aus chemisch inertem Material, die ein dem Besatz (Anzahl der Testwürmer) entsprechendes Fassungsvermögen haben, verwendet werden. Geräte, die mit dem Prüfmedium in Berührung kommen, können aus rostfreiem Stahl, Kunststoff oder Glas sein. Die Gefäße sind so abzudecken, dass die Tiere nicht entweichen können, aber für eine ausreichende Luftzufuhr gesorgt ist. Bei Substanzen mit hohen Adsorptionskoeffizienten, wie z. B. synthetischen Pyrethroiden, kann die Verwendung von silanisiertem Glas nötig sein. In solchen Fällen muss die Apparatur/Anlage nach der Benutzung entsorgt werden (49). Das Entweichen radioaktiv markierter Prüfsubstanzen und flüchtiger Substanzen ist zu vermeiden. Hierzu Abscheider (z. B. Gaswaschflaschen aus Glas) mit geeigneten Adsorbersubstanzen verwenden, um etwaige Rückstände, die aus den Prüfgefäßen verdampfen könnten, aufzufangen.

**Boden**

20. Die Qualität des Prüfbodens sollte so beschaffen sein, dass die Prüforganismen während der Akklimatisierungs- und Testphasen überleben und sich möglichst vermehren können, ohne ein abnormales Aussehen oder Verhalten zu zeigen. Die Würmer sollten sich in den Boden eingraben.

21. Als Substrat für die Versuche wird die in Kapitel C.8 dieses Anhangs (48) beschriebene Kunsterde empfohlen. Anlage 4 enthält eine Beschreibung der Zubereitung dieser Kunsterde und Empfehlungen für ihre Lagerung: Luftgetrockneter künstlicher Boden kann bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert werden.

22. Natürliche Böden von nicht unkontaminierten Standorten können jedoch auch als Prüf- und/oder Anzuchtsubstrat dienen. Zur Charakterisierung von natürlichen Böden sind zumindest Herkunft (Sammelstelle), pH-Wert, Gehalt an organischem Kohlenstoff, Korngrößenverteilung (Anteil an Sand, Schluff und Lehm), maximale Wasserhaltekapazität ($WHC_{max}$) und prozentualer Wassergehalt anzugeben (3). Eine vor Gebrauch durchgeführte Analyse des Bodens oder seiner Bestandteile auf Mikroschadstoffe dürfte nützliche Informationen liefern. Wird Feldboden von landwirtschaftlichen Nutzflächen verwendet, so darf der Boden vor der Probenahme mindestens ein Jahr lang nicht mit Pflanzenschutzmitteln behandelt oder mit Dung von behandelten Tieren und sechs Monate lang nicht mit organischen Düngemitteln gedüngt worden sein (50). Verfahren für die Handhabung von natürlichen Böden vor ihrer Verwendung in ökotoxikologischen Labortests mit Oligochaeten sind in (3) beschrieben. Natürliche Böden sollten im Labor so kurz wie möglich gelagert werden.

**Applikation der Prüfsubstanz**

23. Die Prüfsubstanz wird in den Boden eingemischt. Dabei sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der jeweiligen Substanz zu berücksichtigen. Wasserlösliche Prüfsubstanzen sind vollständig in Wasser zu lösen, bevor sie mit dem Boden vermischt werden. Als Dotierungsverfahren für im Wasser schwer lösliche Prüfsubstanzen wird empfohlen, einen oder mehrere Bestandteile des (künstlichen) Bodens mit der Prüfsubstanz zu beschichten. So kann z. B. der Quarzsand (oder ein Teil davon) mit einer Lösung der Prüfsubstanz in einem geeigneten organischen Lösungsmittel durchtränkt werden; das Lösungsmittel wird anschließend durch Trocknen abgedampft. Die beschichtete Quarzsandfraktion wird sodann mit dem befeuchteten Boden vermischt. Wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens ist, dass kein Lösungsmittel in den Boden gelangt. Bei natürlichem Boden kann die

▼M4

Prüfsubstanz, wie bei der Kunsterde beschrieben, durch Dotieren eines luftgetrockneten Teils des Bodens oder durch Einrühren der Prüfsubstanz in den feuchten Boden mit anschließendem Abdampfen im Falle der Verwendung eines Lösungsmittels hinzugefügt werden. Im Allgemeinen ist soweit wie möglich zu vermeiden, dass feuchter Boden mit den Lösungsmitteln in Berührung kommt. Folgendes ist zu bedenken (3):

— Wird ein anderes Lösungsmittel als Wasser verwendet, so sollte dieses mit Wasser mischbar sein und/oder vollständig eliminiert werden können (z. B. durch Abdampfen), so dass nur die Prüfsubstanz im Boden zurückbleibt.

— Wird eine Kontrolle mit Lösungsmittel verwendet, so sind keine Negativkontrollen erforderlich. Die Lösungsmittelkontrolle sollte die höchste Konzentration des in den Boden gegebenen Lösungsmittels enthalten, und das verwendete Lösungsmittel sollte aus derselben Partie stammen, die für die Zubereitung der Stammlösung verwendet wurde. Hauptkriterien für die Wahl des geeigneten Lösungsvermittlers sollten die Toxizität und Flüchtigkeit des Lösungsmittels und die Löslichkeit der Prüfsubstanz in dem gewählten Lösungsmittel sein.

24. Ist die Prüfsubstanz in Wasser und in organischen Lösungsmitteln nur schwer löslich, können mit Hilfe eines Mörsers pro Prüfgefäß 2,0 bis 2,5 g fein gemahlener Quarzsand mit der Menge Prüfsubstanz vermischt werden, die erforderlich ist, um die gewünschte Prüfkonzentration zu erhalten. Diese Mischung aus Quarzsand und Prüfsubstanz wird zum angefeuchteten Boden hinzugegeben und mit einer entsprechenden Menge entionisierten Wassers gründlich gemischt, um den gewünschten Feuchtegehalt zu erhalten. Die endgültige Mischung wird auf die Prüfgefäße verteilt. Das Verfahren wird für jede Prüfkonzentration wiederholt, und zusätzlich wird eine geeignete Kontrollgruppe mit 2,0 bis 2,5 g fein gemahlenem Quarzsand pro Prüfgefäß angesetzt.

25. Die Konzentration der Prüfsubstanz im Boden ist nach dem Dotieren zu bestimmen. Bevor die Testorganismen eingesetzt werden, ist die homogene Verteilung der Prüfsubstanz im Boden zu überprüfen. Das Dotierungsverfahren und die Gründe für die Wahl des Verfahrens werden im Protokoll erfasst (24).

26. Die Einstellung des Gleichgewichts zwischen Boden und Porenwasserphase sollte idealerweise noch vor dem Einsetzen der Organismen stattfinden; hierzu wird ein Zeitraum von 4 Tagen bei 20 °C empfohlen. Für viele im Wasser schwer lösliche organische Substanzen kann es Tage oder Monate dauern, bis zwischen den adsorbierten und gelösten Fraktionen ein echtes Gleichgewicht erreicht ist. Je nach Zweck der Studie, z. B. wenn die Umweltbedingungen simuliert werden sollen, kann der dotierte Boden über längere Zeit „gealtert“ werden (z. B. 3 Wochen bei 20 °C für Metalle) (22).

**Anzucht der Testorganismen**

27. Die Würmer sind vorzugsweise in dauerhafter Laborkultur zu halten. Leitlinien für die Anzucht von *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* sowie von Enchytraeen-Arten unter Laborbedingungen sind in Anlage 5 enthalten (siehe auch (48) (51) (52)).

28. Die im Test verwendeten Würmer sollten frei von sichtbaren Erkrankungen, Abnormalitäten und Parasiten sein.

PRÜFVERFAHREN

29. Die Testorganismen werden während der Aufnahmephase gegenüber der Prüfsubstanz exponiert: Die Aufnahmephase sollte 14 Tage (Enchytraeen) oder 21 Tage (Regenwürmer) dauern, bis nachgewiesen wird, dass ein *steady state* erreicht ist.

▼M4

30. Für die Eliminationsphase werden die Würmer in einen prüfsubstanzfreien Boden umgesetzt. Die erste Probe sollte 4 bis 24 Std. nach Beginn der Eliminationsphase genommen werden. Anlage 3 enthält Beispiele von Probenahmeplänen für eine Aufnahmephase und eine Eliminationsphase von jeweils 21 Tagen.

**Testorganismen**

31. Bei vielen Arten der terrestrischen Enchytraeen ist das Einzelgewicht sehr niedrig (z. B. 5 bis 10 mg Feuchtgewicht je Individuum *Enchytraeus albidus* und weniger für *Enchytraeus crypticus* und *Enchytraeus luxuriosus*). Um Gewichtsbestimmungen und chemische Analysen vorzunehmen, kann es erforderlich sein, die Würmer der Replikatgefäße zu poolen (d. h. alle Würmer eines Replikatgefäßes werden verwendet, um ein analytisches Messergebnis für das Gewebe zu erhalten). 20 einzelne Enchytraeen werden in jedes Replikatgefäß gegeben, und es werden mindestens drei Replikate verwendet. Bei Prüfsubstanzen mit einer hohen analytischen Nachweisgrenze sind möglicherweise mehr Würmer erforderlich. Für Testspezies mit höherem Einzelgewicht (*Eisenia fetida* und *Eisenia andrei*) können Replikatgefäße mit nur einem Individuum verwendet werden.

32. Die jeweils für einen Versuch verwendeten Würmer sollten ein ähnliches Gewicht haben (z. B. *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* sollten jeweils 250 bis 600 mg wiegen). Enchytraeen (z. B. *Enchytraeus albidus*) sollten ca. 1 cm lang sein. Alle für einen bestimmten Versuch verwendeten Würmer sollten aus derselben Quelle stammen und adulte Tiere mit einem Clitellum sein (siehe Anlage 5). Da sich Gewicht und Alter der Tiere auf die BAF-Werte auswirken können (z. B. aufgrund des unterschiedlichen Lipidgehalts und/oder des Vorhandenseins von Eiern), sollten diese Parameter sorgfältig aufgezeichnet und bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Darüber hinaus kann es während der Exposition zur Ablage von Kokons kommen, was sich auch auf die BAF-Werte auswirken wird. Es wird empfohlen, eine Teilprobe der Testwürmer vor dem Test zu wiegen, um das mittlere Feucht- und Trockengewicht zu schätzen.

33. Um die Abnahme der Prüfsubstanzkonzentration im Boden während der Aufnahmephase möglichst gering zu halten, ist ein hohes Boden-Wurm-Verhältnis vorzusehen. Für *Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* wird eine Mindestmenge von 50 g Trockengewicht (TG) Boden je Wurm und für Enchytraeen eine Mindestmenge von 10 bis 20 g (TG) Boden je Prüfgefäß empfohlen. Die Bodenschicht in den Prüfgefäßen sollte 2 bis 3 cm (Enchytraeen) bzw. 4 bis 5 cm (Regenwürmer) dick sein.

34. Die für einen Versuch benötigten Würmer werden aus der Kultur entnommen (z. B. Enchytraeen mit einer Juwelierpinzette). Adulte Tiere werden zur Akklimatisierung in einen unbehandelten Prüfboden umgesetzt und gefüttert (siehe Nummer 36). Weichen die Prüfbedingungen von den Anzuchtbedingungen ab, dürfte eine Akklimatisierungsphase von 24 bis 72 Std. ausreichen, damit die Würmer sich an die Prüfbedingungen gewöhnen können. Nach der Akklimatisierung werden die Regenwürmer zum Spülen in Glasschalen (z. B. Petrischalen) mit sauberem Wasser umgesetzt und anschließend gewogen, bevor sie in den Prüfboden gegeben werden. Vor dem Wiegen ist das an den Würmern anhaftende Wasser durch leichtes Abtupfen am Rand der Schale oder durch vorsichtiges Trockentupfen mit einem leicht angefeuchteten Papiertuch zu entfernen.

35. Das Eingrabungsverhalten der Testorganismen ist zu beobachten und aufzuzeichnen. Bei Tests mit Regenwürmern graben sich die Tiere (Kontroll- und Testgruppe) in der Regel innerhalb von ein paar Stunden in den Boden ein; dies sollte spätestens 24 Std. nach dem Einsetzen der Würmer in die Prüfgefäße überprüft werden. Graben sich die Regenwürmer nicht in den

▼M4

Boden ein (z. B. über 10 % während mehr als der Hälfte der Aufnahmephase), so deutet dies darauf hin, dass die Prüfbedingungen nicht angemessen oder die Testorganismen nicht gesund sind. In diesem Fall muss der Test gestoppt und wiederholt werden. Enchytraeen leben hauptsächlich im Porenwasser des Bodens, und häufig kommt ihr Integument nur zum Teil mit dem umgebenden Substrat in Kontakt; es wird davon ausgegangen, dass grabende und nichtgrabende Enchytraeen in gleichem Maße exponiert sind, und ein Nichteingraben der Enchytraeen erfordert nicht unbedingt eine Wiederholung des Tests.

**Fütterung**

36. Wenn ein Boden mit niedrigem Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff verwendet wird, dann sollte gefüttert werden. Bei der Verwendung von Kunsterde wird ein wöchentlicher Fütterrhythmus empfohlen (d. h. die Würmer werden einmal pro Woche gefüttert). Für Regenwürmer werden wöchentlich 7 mg getrockneter Dung pro g Boden (TG) und für Enchytraeen wöchentlich 2 bis 2,5 mg gemahlene Haferflocken pro g Boden (TG) empfohlen (11). Die erste Futterration sollte mit dem Boden unmittelbar vor dem Einsetzen der Testorganismen vermischt werden. Es sollte möglichst dieselbe Art Futter wie für die Aufzucht (siehe Anlage 5) verwendet werden.

**Licht und Temperatur**

37. Die Tests sind bei einem geregelten Licht-Dunkel-Zyklus von 16 zu 8 Std., bei einer Lichtstärke von vorzugsweise 400 bis 800 lx im Bereich der Prüfgefäße (3) durchzuführen. Die Prüftemperatur sollte während des gesamten Test 20 ± 2 °C betragen.

**Prüfkonzentrationen**

38. Es wird eine einzige Konzentration verwendet. Situationen, in denen zusätzliche Konzentration(en) erforderlich ist/sind, müssen begründet werden. Liegt die Toxizität ($EC_x$) der Prüfsubstanz nahe an der analytischen Nachweisgrenze, wird empfohlen, radioaktiv markierte Prüfsubstanzen mit hoher spezifischer Radioaktivität zu verwenden. Für Metalle sollte die Konzentration über den Hintergrundwerten in Gewebe und Boden liegen.

**Replikate**

39. Für die kinetischen Messungen (Aufnahme- und Eliminationsphase) sind pro Messpunkt mindestens drei behandelte Replikatgefäße vorzusehen. Die Gesamtzahl der vorbereiteten Replikate muss ausreichen, um alle Messpunkte während der Aufnahme- und Eliminationsphase abzudecken.

40. Für die biologischen Beobachtungen und Messungen (z. B. Verhältnis Trocken- und Feuchtgewicht, Lipidgehalt) und für die Analyse der Hintergrundkonzentrationen in den Würmern und im Boden sind mindestens 12 Replikatgefäße einer Negativkontrolle (jeweils vier Probenahmen zu Beginn und am Ende der Aufnahmephase und vier Probenahmen am Ende der Eliminationsphase) bereitzustellen, wenn kein anderes Lösungsmittel als Wasser verwendet wird. Wurde für die Applikation der Prüfsubstanz ein Lösungsvermittler verwendet, muss neben den behandelten Replikaten eine Lösungsmittelkontrolle (jeweils vier Replikatgefäße sind zu Beginn und am Ende der Aufnahmephase sowie vier am Ende der Eliminationsphase zu beproben) durchgeführt werden, für die mit Ausnahme der Prüfsubstanz alle Bestandteile zu verwenden sind. In diesem Fall können auch vier zusätzliche Replikatgefäße einer Negativkontrolle (kein Lösungsmittel) für eine fakultative Probenahme am Ende der Aufnahmephase vorgesehen werden. Diese Replikate können biologisch mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen werden, um Informationen über einen möglichen Einfluss des Lösungsmittels auf den Testorganismus zu erhalten. Es wird empfohlen, eine ausreichende Anzahl an Replikatgefäßen (z. B. 8) als zusätzliche Reserve für Test- und Kontrollgruppen anzusetzen.

▼M4

**Häufigkeit der Bodenqualitätsmessungen**

41. Zu Beginn und am Ende der Aufnahmephase und der Eliminationsphase werden der pH-Wert und der Feuchtegehalt des Bodens sowie (kontinuierlich) die Temperatur in der Prüfkammer bestimmt. Einmal pro Woche sollte der Feuchtegehalt des Bodens durch Wiegen der Prüfgefäße und Vergleich ihres Gewichts zum Zeitpunkt der Kontrolle mit ihrem Gewicht zu Testbeginn überprüft werden. Wasserverluste sollten durch Zugabe von entionisiertem Wasser ausgeglichen werden.

**Probenahme und Analyse der Wurm- und Bodenproben**

42. Anlage 3 enthält ein Beispiel eines Probenahmeplans für die Testung der Bioakkumulation mit Regenwürmern und Enchytraeen.

43. Vor dem Einsetzen der Würmer sowie während der Aufnahmephase und der Eliminationsphase wird den Prüfgefäßen Boden zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration entnommen. Während des Tests werden die Konzentrationen der Prüfsubstanz in den Würmern und im Boden bestimmt. In der Regel werden die Gesamtkonzentrationen im Boden gemessen. Es können auch die Konzentrationen im Porenwasser bestimmt werden; in diesem Fall sind vor Beginn der Studie eine Begründung für diesen Entschluss und geeignete Methoden anzugeben, die ebenfalls in den Bericht aufgenommen werden.

44. Während der Aufnahmephase und der Eliminationsphase werden jeweils mindestens sechs Mal Proben entnommen. Ist eine Prüfsubstanz nachweislich stabil, so kann die Zahl der Bodenproben reduziert werden. Es wird empfohlen, zu Beginn und am Ende der Aufnahmephase mindestens drei Replikate zu analysieren. Weicht die am Ende der Aufnahmephase bestimmte Konzentration im Boden um mehr als 30 % von der Ausgangskonzentration ab, so sollten die zu anderen Zeitpunkten genommenen Bodenproben ebenfalls analysiert werden.

45. Die Würmer eines bestimmten Replikatgefäßes werden an jedem Messzeitpunkt aus dem Boden entnommen (z. B. indem der Boden des Replikats auf eine flache Schale verteilt wird und die Würmer mit einer abgerundeten Juwelierpinzette ausgelesen werden) und anschließend kurz in einer flachen Schale aus Glas oder Stahl mit Wasser gespült. Anhaftendes Wasser entfernen (siehe Nummer 34). Die Würmer vorsichtig in ein vorgewogenes Gefäß geben und sofort samt Darminhalt wiegen.

46. Die Regenwürmer (*Eisenia* sp.) sollten dann über Nach ihren Darm entleeren, z. B. auf einem angefeuchteten Filterpapier in einer abgedeckten Petrischale (siehe Nummer 34). Nach der Darmentleerung ist das Gewicht der Würmer zu bestimmen, um die eventuelle Abnahme der Biomasse während des Tests zu beurteilen (siehe Validitätskriterien unter Nummer 17). Wiegen und Gewebsanalyse der Enchytraeen erfolgen ohne vorherige Darmentleerung, da dies aus technischer Sicht angesichts der geringen Größe dieser Würmer schwierig ist. Nachdem das Endgewicht bestimmt wurde, werden die Würmer anhand der am besten geeigneten Methode sofort abgetötet (z. B. mit Flüssigstickstoff oder durch Einfrieren bei Temperaturen unter –18 °C).

47. Während der Eliminationsphase ersetzen die Würmer kontaminierten Darminhalt durch sauberen Boden. Dies bedeutet, dass bei unmittelbar vor der Eliminationsphase entnommenen Proben von Würmern, die ihren Darm nicht entleert haben (in diesem Fall Enchytraeen), der Darm verunreinigten Boden enthält. Bei aquatischen Oligochaeten wird davon ausgegangen, dass nach den ersten 4 bis 24 Std. der Eliminationsphase der Großteil des verunreinigten Darminhalts durch sauberes Sediment ersetzt wurde, z. B. (46). In Studien über die Akkumulation von radioaktiv markiertem Cadmium und Zink wurden vergleichbare Feststellungen für Regenwürmer gemeldet (78). Bei Enchytraeen mit Darminhalt kann die Konzentration dieser ersten Probe der Eliminationsphase als die Konzentration im Gewebe nach Darmentleerung angesehen werden. Um der Verdünnung der Prüfsubstanzkonzentration durch unkontaminierten Boden während der Eliminationsphase Rechnung zu tragen, kann das Gewicht des Darminhalts auf Basis des Verhältnisses Nassgewicht/Aschegewicht des Wurms oder des Verhältnisses Trockengewicht/Aschegewicht des Wurms geschätzt werden.

▼M4

48. Die Analyse der Boden- und Wurmproben sollte vorzugsweise direkt nach der Probenahme (d. h. innerhalb von 1 bis 2 Tagen) erfolgen, um einen Abbau oder sonstige Verluste zu vermeiden; es wird empfohlen, die ungefähren Aufnahme- und Eliminationsraten zu ermitteln, während der Versuch fortgesetzt wird. Verzögert sich die Analyse, so sind die Proben auf geeignete Weise zu lagern, z. B. durch Tiefgefrieren (≤ –18 °C).

49. Es sollte überprüft werden, ob die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der chemischen Analyse sowie die Wiederfindung der Prüfsubstanz aus Boden- und Wurmproben für die betreffende Methode geeignet sind; die Effizienz der Extraktion, die Nachweisgrenze („limit of detection; LOD“) und die Quantifizierungsgrenze („limit of quantification; LOQ“) sollten im Bericht erfasst werden. Auch ist zu kontrollieren, ob die Prüfsubstanz in den Kontrollgefäßen nicht in Konzentrationen feststellbar ist, die über der Hintergrundkonzentration liegen. Wenn die Konzentration der Prüfsubstanz im Testorganismus Ca für die Kontrollwürmer > 0 ist, sollte dies bei der Berechnung der kinetischen Parameter berücksichtigt werden (siehe Anlage 2). Alle Proben sollten während des Tests stets so behandelt werden, dass Verunreinigungen und Verluste (z. B. infolge von Adsorption der Prüfsubstanz durch das Probenahmegerät) auf ein Mindestmaß beschränkt werden.

50. Werden radioaktiv markierte Prüfsubstanzen verwendet, so können Ausgangssubstanz und Metaboliten analysiert werden. Eine Quantifizierung der Ausgangsprüfsubstanz und der Metaboliten im *steady state* oder am Ende der Aufnahmephase liefert wichtige Informationen. Die Proben sollten dann „gereinigt“ werden, damit die Ausgangsprüfsubstanz separat quantifiziert werden kann. Wenn einzelne Metaboliten mehr als 10 % der gesamten Radioaktivität in den analysierten Proben ausmachen, sollten diese Metaboliten identifiziert werden.

51. Die Gesamtwiederfindungsrate und die Wiederfindung der Prüfsubstanz in Würmern, Boden und gegebenenfalls Abscheidern mit Adsorbersubstanzen, die eingesetzt wurden, um verdampfende Prüfsubstanz aufzufangen, müssen registriert und im Protokoll erfasst werden.

52. Für Enchytraeen, die kleiner sind als Regenwürmer, ist es zulässig, die beprobten Individuen aus einem bestimmten Prüfgefäß zu poolen. Verringert sich durch das Pooling die Zahl der Replikate, so wird hierdurch die Zahl der statistischen Verfahren eingeschränkt, die auf die Daten anwendbar sind. Wird auf ein spezielles statistisches Verfahren bzw. eine bestimmte statistische Aussagekraft Wert gelegt, so muss der Test unter Berücksichtigung des Pooling, des Verfahrens und der gewünschten Aussagekraft eine angemessene Anzahl an Replikatgefäßen umfassen.

53. Der BAF sollte sowohl im Verhältnis zum gesamten Trockengewicht als auch, falls erforderlich (bei hochlipophilen Substanzen) im Verhältnis zum Lipidgehalt ausgedrückt werden. Zur Bestimmung des Lipidgehalts sollten geeignete Methoden verwendet werden (zu diesem Zweck sollten einige bestehende Methoden — z. B. (31) (58) — angepasst werden). Bei diesen Methoden wird ein Chloroform/Methanol-Extraktionsverfahren eingesetzt. Um die Verwendung von gechlorten Lösungsmitteln zu vermeiden, sollte jedoch eine angepasste Version der Methode von Bligh and Dyer (9), wie in (17) beschrieben, verwendet werden. Da die verschiedenen Methoden möglicherweise zu unterschiedlichen Werten führen, ist es wichtig, Einzelheiten über die verwendete Methode anzugeben. Wenn möglich, d. h. wenn genügend Wurmgewebe verfügbar ist, sollte die Lipidanalyse idealerweise an derselben Probe oder demselben Extrakt vorgenommen werden, das für die Analyse der Prüfsubstanz verwendet wurde, da die Lipide häufig erst aus dem Extrakt entfernt werden müssen, bevor dieses chromatografisch analysiert werden kann (49). Als Alternative können die Kontrolltiere verwendet werden, um den Lipidgehalt zu bestimmen, der dann herangezogen werden kann, um die BAF-Werte zu normalisieren. Mit letztgenanntem Konzept lässt sich die Verunreinigung der Geräte durch die Prüfsubstanz reduzieren.

▼M4

DATEN UND BERICHTERSTATTUNG

**Auswertung der Ergebnisse**

54. Die Aufnahmekurve der Prüfsubstanz ergibt sich, indem ihre Konzentration in/auf den Würmern in der Aufnahmephase gegen die Zeit auf einer arithmetischen Skala aufgetragen wird. Wenn die Kurve ein Plateau oder den *steady state* (siehe Definitionen in Anlage 1) erreicht hat, wird der *steady-state*-Bioakkumulationsfaktor $BAF_{ss}$ wie folgt errechnet:

$$\frac{C_a \text{ bei steady state oder am Ende der Aufnahmephase (Durchschnitt)}}{C_s \text{ bei steady state oder am Ende der Aufnahmephase (Durchschnitt)}}$$

Dabei sind:

$C_a$ = die Konzentration der Prüfsubstanz im Testorganismus

$C_s$ = die Konzentration der Prüfsubstanz im Boden

55. Wird kein *steady state* erreicht, sollte der auf den Konstanten basierende $BAF_K$ anstelle des $BAF_{ss}$ wie nachstehend beschrieben bestimmt werden:

— Bestimmung des Akkumulationsfaktors ($BAF_K$) als Quotient $k_s/k_e$.

— Aufnahme- und Eliminationskonstante möglichst gleichzeitig berechnen (siehe Gleichung 11 in Anlage 2)

— Die Eliminationskonstante ($k_e$) wird in der Regel aus der Eliminationskurve abgeleitet (d. h. einer graphischen Darstellung der Prüfsubstanzkonzentration in den Würmern während der Eliminationsphase). Die Aufnahmekonstante $k_s$ wird dann anhand des gegebenen Wertes $k_e$ und einem $C_a$-Wert berechnet, der sich aus der Aufnahmekurve ableitet. Siehe Beschreibung dieser Methoden in Anlage 2. Die bevorzugte Methode zur Berechnung des $BAF_K$ und der Konstanten $k_s$ und $k_e$ ist eine computergestützte nichtlineare Parameterschätzung. Wenn die Ausscheidungskurve offensichtlich nicht erster Ordnung ist, sollten komplexere Modelle herangezogen werden.

**Prüfbericht**

56. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

*Prüfsubstanz:*

— Etwaige verfügbare Angaben zur akuten oder chronischen Toxizität (z. B. $EC_x$, $LC_x$, NOEC) der Prüfsubstanz gegenüber bodenbewohnenden Oligochaeten;

— Reinheit, physikalischer Zustand und gegebenenfalls physikalisch-chemische Eigenschaften, z. B. log $K_{ow}$, Wasserlöslichkeit;

— chemische Kenndaten; Herkunft der Prüfsubstanz, Bezeichnung und Konzentration der verwendeten Lösungsmittel;

— bei radioaktiv markierten Prüfsubstanzen: die genaue Position des markierten Atoms (der Atome), die spezifische Radioaktivität und die radiochemische Reinheit.

*Testspezies:*

— wissenschaftlicher Name, Stamm, Bezugsquelle, eventuelle Vorbehandlungen, Akklimatisation, Alter, Größenbereich usw.

▼M4

*Prüfbedingungen:*

— angewandtes Prüfverfahren;

— Art und Eigenschaften der verwendeten Beleuchtung und Photoperiode(n);

— Versuchsaufbau (z. B. Anzahl und Größe der Prüfgefäße, Bodenmasse und Füllhöhe der Bodenschicht, Anzahl der Replikate, Anzahl der Würmer pro Replikat, Anzahl der Prüfkonzentrationen, Dauer der Aufnahme- und Eliminationsphase, Häufigkeit der Probenahmen);

— Begründung für die Wahl des Materials der Prüfgefäße;

— Methode für die Vorbereitung des Prüfgegenstands und Applikationsmethode sowie Begründung der Wahl einer bestimmten Methode;

— die nominellen Prüfkonzentrationen, der Durchschnitt der gemessenen Werte sowie deren Standardabweichungen in den Prüfgefäßen sowie das Verfahren, durch das diese Werte ermittelt wurden;

— Quelle der Bestandteile des künstliches Bodens oder — wenn ein natürliches Medium verwendet wird — Herkunft des Bodens, Beschreibung etwaiger Vorbehandlungen, Ergebnisse der Kontrollen (Überlebensrate, Entwicklung der Biomasse, Reproduktion), Bodenmerkmale (pH-Wert, Gesamtgehalt an organischem Kohlenstoff, Korngrößenverteilung (Anteil an Sand, Schluff und Lehm), $WHC_{max}$, Wassergehalt zu Beginn und am Ende des Versuchs und sonstige vorgenommene Messungen);

— Angaben zur Behandlung der Boden- und Wurmproben, einschließlich aller Einzelheiten über Vorbereitung, Lagerung, Dotierungsverfahren, Extraktion, und zu Analyseverfahren (und -genauigkeit) in Bezug auf die Prüfsubstanz in Würmern und Boden sowie zum Lipidgehalt (falls gemessen) und Wiederauffindungsraten des Prüfgegenstands.

*Ergebnisse:*

— Mortalität der Kontrollwürmer und der Würmer in den einzelnen Prüfgefäßen sowie jegliches beobachtetes anormales Verhalten (z. B. Vermeidung des Bodens, fehlende Reproduktion bei einem Bioakkumulationstest mit Enchytraeen);

— Verhältnis zwischen Trockengewicht und Frischgewicht im Boden und in den Testorganismen (nützlich für die Normalisierung);

— das Feuchtgewicht der Würmer bei jeder Probenahme; für Regenwürmer das Feuchtgewicht zu Beginn des Versuchs und bei jeder Probenahme vor und nach der Darmentleerung;

— der Lipidgehalt der Testorganismen (falls in der Prüfung ermittelt);

— Kurven der Aufnahme- und Eliminationskinetiken der Prüfsubstanz in den Würmern und die Zeit bis zur Einstellung des *steady state*;

— $C_a$ und $C_s$ (gegebenenfalls mit Standardabweichung und Abweichungsbereich) für alle Probenahmen (wobei $C_a$ in g $kg^{-1}$ Feucht- und Trockengewicht des Ganzkörpers und $C_s$ in g $kg^{-1}$ Feucht- und Trockengewicht des Bodens ausgedrückt wird). Wird der Biota-Boden-Akkumulationsfaktor (BSAF) benötigt (z. B. für den Vergleich der Ergebnisse von zwei oder mehreren Tests, die mit Tieren mit unterschiedlichem Lipidgehalt durchgeführt wurden), so können $C_a$ zusätzlich als g $kg^{-1}$ Lipidgehalt des Organismus und $C_s$ als g $kg^{-1}$ organischer Kohlenstoff (OC) des Bodens ausgedrückt werden;

— BAF (ausgedrückt in kg Boden·$kg^{-1}$ Wurm), Boden-Aufnahmekonstante $k_s$ (ausgedrückt in g Boden $kg^{-1}$ Wurm $d^{-1}$) und Eliminationskonstante $k_e$ (ausgedrückt in $d^{-1}$); BSAF (ausgedrückt in kg Boden organischer Kohlenstoff $kg^{-1}$ Lipidgehalt des Wurms) kann zusätzlich angegeben werden;

▼M4

— falls gemessen: Gehalt an Ausgangssubstanz, Metaboliten und gebundenen Rückständen (d. h. Gehalt an Prüfsubstanz, die sich nicht mit gewöhnlichen Extraktionsmethoden extrahieren lässt) im Boden und in den Testtieren;

— Methoden zur statistischen Datenanalyse.

*Auswertung der Ergebnisse:*

— Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Validitätskriterien gemäß in Nummer 17;

— unerwartete oder ungewöhnliche Ergebnisse, z. B. unvollständige Elimination der Prüfsubstanz durch die Testtiere.

*LITERATUR:*


1. Amorim M. (2000): Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Master thesis, Universidade de Coimbra.

2. ASTM (2000): Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

3. ASTM International (2004): Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 ff.

4. Beek B., Boehling S., Bruckmann U., Franke C., Joehncke U., Studinger G. (2000): The assessment of bioaccumulation. In: Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

5. Belfroid A., Sikkenk M., Seinen W., Van Gestel C., Hermens J. (1994): The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem., 13: 93-99.

6. Belfroid A., Van Wezel A., Sikkenk M., Van Gestel C., Seinen W. & Hermens J. (1993): The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety, 25: 154-165.

7. Belfroid A., Meiling J., Drenth H., Hermens J., Seinen W., Van Gestel C. (1995): Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

8. Bell A.W. (1958): The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

9. Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

10. Bouche M. (1972): Lombriciens de France. Écologie et Systématique. INRA, Annales de Zoologie-Écologie animale, Paris, 671 p.

11. Bruns E., Egeler Ph., Moser T., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001a): Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Bericht an das Umweltbundesamt Berlin, FuE-Nr.: 298 64 416.

12. Bruns E., Egeler Ph., Römbke J., Scheffczyk A., Spörlein P. (2001b): Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

13. Conder J.M. and Lanno R.P. (2003): Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4


14. Connell D.W. and Markwell R.D. (1990): Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

15. Didden W.A.M. (1993): Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

16. Didden W.A.M. (2003): Oligochaeta. In: Bioindicators and Biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., Niederlande, S. 555-576.

17. De Boer J., Smedes F., Wells D., Allan A. (1999): Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU-Programm für Normung, Mess- und Prüfverfahren.

18. Dietrich D.R., Schmid P., Zweifel U., Schlatter C., Jenni-Eiermann S., Bachmann H., Bühler U., Zbinden N. (1995): Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

19. Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Chemikalienagentur, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission; ABl. L 396 vom 30.12.2006, S. 1.

20. Edwards C.A. and Bohlen P.J. (1996): Biology and Ecology of Earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, S. 426 ff.

21. OECD (2008), „Bioakkumulation in sedimentbewohnenden benthischen Oligochaeten“, Prüfrichtlinie Nr. 315, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

22. Egeler Ph., Gilberg D., Scheffczyk A., Moser Th. and Römbke J. (2009): Validierung einer Methode zur Messung der Bioakkumulation in terrestrischen Organismen mittels eines internationalen Ringtests. Bericht an das Umweltbundesamt Dessau-Rosslau, FuE-Nr.: 204 67 458: S. 149 ff. Abrufbar unter folgender Adresse: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

23. Elmegaard N. and Jagers op Akkerhuis G.A.J.M. (2000): Safety factors in pesticide risk assessment. Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technischer Bericht 325: S. 57 ff.

24. Environment Canada (1995): Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

25. EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

26. Franke C. (1996): How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

27. Franke C., Studinger G., Berger G., Böhling S., Bruckmann U., Cohors-Fresenborg D., Jöhncke U. (1994): The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

28. Füll C. (1996): Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 ff.

▼M4


29. Füll C., Schulte C., Kula C. (2003): Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF — Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

30. Gabric A.J., Connell D.W., Bell P.R.F. (1990): A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

31. Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A., Parrish C.C. (1985): Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

32. Hawker D.W. and Connell D.W. (1988): Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

33. Hund-Rinke K. and Wiechering H. (2000): Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

34. Hund-Rinke K., Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

35. ISO 11268-2 (1998) Bodenbeschaffenheit — Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*). Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung.

36. Jaenike J. (1982): „*Eisenia foetida*“ is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

37. Jager T. (1998): Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

38. Jager T., Sanchez P.A., Muijs B., van der Welde E., Posthuma L (2000): Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

39. Jager T., Baerselman R., Dijkman E., De Groot A.C., Hogendoorn E.A., DeJong A., Kruitbosch J.A.W., Peijnenburg W.J.G.M. (2003a): Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

40. Jager T., Fleuren R.L.J., Hoogendoorn E., de Korte G. (2003b): Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

41. Janssen M.P.M., Bruins A., De Vries T.H., Van Straalen N.M. (1991): Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

42. Kasprzak K. (1982): Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

43. Khalil A.M. (1990): Aufnahme und Metabolismus von $^{14}$C-Hexachlorbenzol und $^{14}$C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation Universität München, S. 137 ff.

44. Landrum P.F. (1989): Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

45. Marinussen M.P.J.C., Van der Zee S.E.A.T.M., De Haan F.A. (1997): Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

46. Mount D.R., Dawson T.D., Burkhard L.P. (1999): Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼M4


47. Nendza M. (1991): QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log $K_{ow}$/log BCF correlations. In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

48. Kapitel C.8 dieses Anhangs; Toxizität für Regenwürmer.

49. Kapitel C.13 dieses Anhangs; Biokonzentration: Durchfluss-Fischtest.

50. Kapitel C.21 dieses Anhangs; Bodenmikroorganismen: Stickstofftransformationstest.

51. OECD (2004a), Reproduktionstest mit Enchytraeen, Prüfrichtlinie Nr. 220, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

52. OECD (2004b) Reproduktionstest mit Regenwürmern (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*), Prüfrichtlinie Nr. 222, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

53. OECD (2008), „Bioakkumulation in sedimentbewohnenden benthischen Oligochaeten“, Prüfrichtlinie Nr. 315, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.

54. Petersen H. and Luxton M. (1982): A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

55. Phillips D.J.H. (1993): Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

56. Pflugmacher J. (1992): Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

57. Posthuma L., Weltje L., Anton-Sanchez F.A. (1996): Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

58. Randall R.C., Lee II H., Ozretich R.J., Lake J.L., Pruell R.J. (1991): Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

59. Römbke J., Egele, P., Füll C. (1998): Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

60. Römbke J. and Moser Th. (1999): Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: S. 373 ff.

61. Römbke J., Riepert F., Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

62. Romijn C.A.F.M., Luttik R., Van De Meent D., Slooff W.,Canton J.H. (1993): Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

63. Sample B.E., Suter D.W., Beauchamp J.J., Efroymson R.A. (1999): Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

64. Schlosser H-J. and Riepert F. (1992): Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

65. Schmelz R. and Collado R. (1999): *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

66. Sims R.W. and Gerard B.M. (1985): Earthworms, In: Kermack, D.M. & Barnes, R.S.K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

67. Sousa J.P., Loureiro S., Pieper S., Frost M., Kratz W., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. (2000): Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

68. Spacie A. and Hamelink J.L. (1982): Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

69. Stephenson G.L., Kaushik A., Kaushik N.K., Solomon K.R., Steele T., Scroggins R.P. (1998): Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

70. Sterenborg I., Vork N.A., Verkade S.K., Van Gestel C.A.M., Van Straalen N.M. (2003): Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

71. UBA (Umweltbundesamt) (1991): Bioakkumulation — Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

72. US EPA (2000): Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

73. Van Brummelen T.C. and Van Straalen N.M. (1996): Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

74. Van Gestel C.A.M. (1992): The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review. In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker H., Edwards P.J., Greig-Smith P.W. & Heimbach F.). Intercept Press, Andover (GB).

75. Van Gestel C.A.M. and Ma W.-C. (1990): An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

76. Van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. (2005): Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

77. Venter J.M. and Reinecke A.J. (1988): The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

78. Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., Wolterbeek H.T., van Straalen N.M., van Gestel C.A.M. (2005): Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

79. Widianarko B. and Van Straalen N.M. (1996): Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

*Anlage 1*

DEFINITIONEN

**Bioakkumulation** ist die Konzentrationszunahme (Anreicherung) der Prüfsubstanz in oder an einem Organismus gegenüber der Prüfsubstanzkonzentration im umgebenden Medium. Bioakkumulation setzt sich aus Biokonzentrations- und Biomagnifikationsvorgängen (siehe unten) zusammen.

**Biokonzentration** ist die Konzentrationszunahme (Anreicherung) der Prüfsubstanz in oder an einem Organismus gegenüber der Prüfsubstanzkonzentration im umgebenden Medium, die ausschließlich aus der Aufnahme der Substanz aus dem umgebenden Medium (z. B. über die Körperoberfläche und durch die ingestive Aufnahme des Bodens) resultiert.

**Biomagnifikation** ist die Konzentrationszunahme (Anreicherung) der Prüfsubstanz in oder an einem Organismus, die hauptsächlich aus der Aufnahme der Prüfsubstanz über kontaminiertes Futter oder kontaminierte Beute resultiert, bezogen auf die Prüfsubstanzkonzentration im Futter bzw. in der Beute. Biomagnifikation kann zum Transfer oder zur Bioakkumulation der Prüfsubstanz in Nahrungsketten oder -netzen führen.

Die **Elimination** einer Prüfsubstanz ist die Ausscheidung der angereicherten Prüfsubstanz aus dem Prüforganismus durch aktive oder passive Prozesse, die unabhängig von An- oder Abwesenheit der Prüfsubstanz im umgebenden Medium erfolgt.

Der **Bioakkumulationsfaktor** (BAF) zu jedem beliebigen Zeitpunkt während der Aufnahmephase dieses Bioakkumulationstests ist der Quotient aus der Konzentration der Prüfsubstanz in/an dem Prüforganismus ($C_a$ in g $kg^{-1}$ Trockengewicht Wurm) und der Konzentration der Prüfsubstanz im umgebenden Medium ($C_s$ in g $kg^{-1}$ Trockengewicht Boden); der BAF wird in kg Boden·$kg^{-1}$ Wurm ausgedrückt.

Der ***steady-state*-Bioakkumulationsfaktor** ($BAF_{ss}$), der den BAF im *steady state* bezeichnet, ändert sich über einen längeren Zeitraum nicht wesentlich; die Konzentration der Prüfsubstanz im umgebenden Medium ($C_s$ ausgedrückt als g $kg^{-1}$ Trockengewicht des Bodens) ist während dieser Zeit konstant.

**Bioakkumulationsfaktoren**, die sich direkt anhand des Verhältnisses der Substrat-Aufnahmekonstanten zur Eliminationskonstanten ($k_s$ und $k_e$, siehe unten) berechnen lassen, werden als kinetischer Bioakkumulationsfaktor ($BAF_K$) bezeichnet.

Der **Biota-Boden-Akkumulationsfaktor** (BSAF) ist der Quotient aus der auf den Lipidgehalt normierten Prüfsubstanzkonzentration in/an dem Testorganismus ($C_a$ in g $kg^{-1}$ Lipidgehalt des Organismus) und der auf den organischen Kohlenstoffgehalt normierten Prüfsubstanzkonzentration im Boden im *steady state* ($C_s$ in g $kg^{-1}$ organischen Kohlenstoff des Bodens); der BSAF wird in kg organischer Kohlenstoff·$kg^{-1}$ Lipid ausgedrückt.

Ein **Plateau** oder ***steady state*** ist definiert als das Gleichgewicht zwischen den während der Aufnahmephase simultan auftretenden Aufnahme- und Eliminationsvorgängen. Der *steady state* in der grafischen Darstellung des gegen die Zeit aufgetragenen BAF ist erreicht, wenn die Kurve parallel zur Zeitachse verläuft und wenn drei aufeinander folgende BAF-Analysen, die an Proben durchgeführt werden, die im Abstand von mindestens zwei Tagen genommen wurden, um nicht mehr als ± 20 % voneinander abweichen, bzw. wenn es keine statistisch bedeutenden Unterschiede zwischen den drei Probenahmephasen gibt. Für Prüfsubstanzen, die nur langsam aufgenommen werden, ist ein zeitlicher Abstand zwischen den Probenahmen von sieben Tagen geeigneter (49).

Der **Koeffizient für die Verteilung organischer Kohlenstoff/Wasser** ($K_{oc}$) bezeichnet das Verhältnis der Gleichgewichtskonzentration Substanz im/am organischen Kohlenstoffanteil im Boden zu derjenigen im Wasser.

Der **Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient** ($K_{ow}$) bezeichnet das Verhältnis zwischen der Konzentration einer Substanz in n-Oktanol und ihrer Konzentration in Wasser im Gleichgewicht, auch als $P_{ow}$-Wert ausgedrückt. Der Logarithmus von $K_{ow}$ (log $K_{ow}$) gilt als Maß für das Potenzial einer Substanz, von aquatischen Organismen angereichert zu werden.

▼M4

Die **Aufnahme- oder Expositionsphase** ist der Zeitraum, in dem die Prüforganismen der Prüfsubstanz ausgesetzt sind.

Die **Substrat-Aufnahmekonstante** ($k_s$) ist der numerische Wert, der die Geschwindigkeitsrate der Zunahme der Prüfsubstanzkonzentration im/am Testorganismus bei Anreicherung der Substanz aus dem Boden definiert. $k_s$ wird in g Boden $kg^{-1}$ Wurm $d^{-1}$ ausgedrückt.

Die **Eliminationsphase** ist der Zeitraum, in dem nach Umsetzung der Testorganismen von kontaminiertem Medium in prüfsubstanzfreies Medium die Ausscheidung (oder der Nettoverlust) der Prüfsubstanz durch die Testorganismen beobachtet wird.

Die **Eliminationskonstante** ($k_e$) ist der numerische Wert, der die Geschwindigkeit der Konzentrationsabnahme der Prüfsubstanz in/an dem Testorganismus nach Umsetzung der Testorganismen aus einem mit Prüfsubstanz belasteten Medium in prüfsubstanzfreies Medium definiert; $k_e$ wird in $Tag^{-1}$ ($d^{-1}$) angegeben.

**Prüfsubstanz:** jede Substanz oder jedes Gemisch, die/das mit dieser Prüfmethode getestet wird.

▼M4

*Anlage 2*

**Berechnung der Aufnahme- und Eliminationsparameter**

Hauptendpunkt eines Bioakkumulationstests ist der Bioakkumulationsfaktor (BAF). Zur Berechnung des gemessenen BAF bildet man den Quotienten aus der Konzentration der Prüfsubstanz im Testorganismus ($C_a$) und der Konzentration im Substrat ($C_s$) im *steady state*. Wurde der *steady state* während der Aufnahmephase nicht erreicht, so wird anhand der Konstanten der kinetische Bioakkumulationsfaktor ($BAF_K$) anstelle des *steady-state*-Bioakkumulationsfaktors BAFss berechnet.

Für die Berechnung des kinetischen Bioakkumulationsfaktors ($BAF_K$), der Substrat-Aufnahmekonstanten ($k_s$) und der Eliminationskonstanten ($k_e$) werden in der Regel computergestützte, nichtlineare Verfahren zur Parameterschätzung eingesetzt, z. B. basierend auf den in (68) beschriebenen Modellen. Diese Programme bestimmen die Werte $BAF_K$, $k_s$ und $k_e$ basierend auf einem gegebenen Satz von über die Zeit ermittelten Konzentrationsdaten und den Modellgleichungen:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Gleichung 1]}$$

oder

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[Gleichung 2]}$$

Dabei sind:

$C_a$ = Konzentration der chemischen Substanz in den Würmern [g kg-1 Feucht- oder Trockengewicht]

$k_s$ = Aufnahmekonstante im Gewebe [g Boden kg-1 Wurm d-1]

$C_s$ = Konzentration der chemischen Substanz im Boden [g kg-1 Feucht- oder Trockengewicht]

$k_e$ = Eliminationskonstante [d-1]

$t_c$ = Zeit am Ende der Aufnahmephase.

Wenn die Hintergrundkonzentration in den nichtexponierten Würmern z. B. am Tag 0 deutlich von Null abweicht (was z. B. bei Metallen der Fall sein kann), so wird diese Hintergrundkonzentration ($C_{a,0}$) in den Gleichungen wie folgt berücksichtigt:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Gleichung 3]}$$

und

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[Gleichung 4]}$$

Wird im Verlauf der Aufnahmephase eine deutliche Abnahme der Prüfsubstanzkonzentration im Boden beobachtet, so können folgende Modellgleichungen verwendet werden (z. B. (67) (79)):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[Gleichung 5]}$$

▼M4

Dabei sind:

$C_s$ = Konzentration der Substanz im Boden [g kg-1 Feucht- oder Trockengewicht]

$k_0$ = Boden-Abbaukonstante [d-1]

$C_0$ = anfängliche Konzentration der chemischen Substanz im Boden [gkg-1 Feucht- oder Trockengewicht]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Gleichung 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[Gleichung 7]}$$

Dabei sind:

$C_a$ = Konzentration der chemischen Substanz in Würmern [g kg-1 Feucht- oder Trockengewicht]

$k_s$ = Aufnahmekonstante im Gewebe [g soil kg-1 of worm d-1]

$k_0$ = Boden-Abbaukonstante [d-1]

$k_e$ = Eliminationskonstante [d-1]

$t_c$ = Zeit am Ende der Aufnahmephase.

Wird ein *steady state* während der Aufnahmephase erreicht (d. h. $t = \infty$), kann Gleichung 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Gleichung 1]}$$

umgeformt werden zu

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

oder

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[Gleichung 8]}$$

Damit stellt $k_s/k_e$ x $C_s$ eine Annäherung an die Konzentration der Prüfsubstanz im Wurmgewebe im *steady state* ($C_{a,ss}$) dar.

Der Biota-Boden-Akkumulationsfaktor (BSAF) lässt sich wie folgt berechnen:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[Gleichung 9]}$$

wobei $f_{oc}$ die Fraktion des organischen Kohlenstoffs im Boden und $f_{lip}$ die Fraktion des Lipidgehalts der Würmer ist, beide vorzugsweise an Proben, die aus dem Versuch stammen, und jeweils nach Trocken- oder Feuchtgewicht bestimmt.

Zur Modellierung der Eliminationskinetik/Eliminationsverläufe können die Daten aus der Eliminationsphase herangezogen und die folgende Modellgleichung und ein computergestütztes, nichtlineares Verfahren zur Parameterschätzung angewendet werden. Weisen die gegen die Zeit aufgetragenen Messwerte auf eine konstante exponentielle Abnahme der Prüfsubstanzkonzentration in den Tieren hin, so lässt sich der Eliminationsverlauf mit einem Ein-Kompartiment-Modell (Gleichung 9) beschreiben.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[Gleichung 10]}$$

▼**M4**

Die Elimination kann zuweilen biphasisch verlaufen, mit einer raschen Abnahme von $C_a$ in den Anfangsphasen und einem langsameren Verlust an Prüfsubstanz in den letzten Phasen der Elimination, z. B. (27) (68). Erklären lassen sich die beiden Phasen mit der Annahme, dass es im Organismus zwei verschiedene Kompartimente gibt, aus denen die Prüfsubstanz mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten eliminiert wird. Für diese Fälle wird auf die einschlägige Literatur verwiesen, z. B. (38) (39) (40) (78).

Anhand der obigen Modellgleichungen können die Kinetikparameter ($k_s$ und $k_e$) auch in einem Durchlauf berechnet werden, indem die Kinetikmodellgleichung 1. Ordnung auf alle Daten aus der Aufnahme- und der Eliminationsphase gleichzeitig angewendet wird. Für die Beschreibung einer Methode, die eine solche kombinierte Berechnung der Aufnahme- und Eliminationskonstanten ermöglicht, wird auf (41), (73) und (70) verwiesen.

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{[Gleichung 11]}$$

*Anmerkung:* Bei gleichzeitiger Schätzung der Aufnahme- und Eliminationsparameter anhand der kombinierten Aufnahme- und Eliminationsdaten ist„m“ in Gleichung 11 ein Deskriptor, mit dem das Computerprogramm die Teilterme der Gleichung den Datensätzen der jeweiligen Phase zuordnen und die Schätzung korrekt durchführen kann (m = 1 für die Aufnahmephase; m = 2 für die Eliminationsphase).

Diese Modellgleichungen sind jedoch mit Vorsicht anzuwenden, insbesondere wenn sich während des Versuchs die Bioverfügbarkeit der Prüfsubstanz ändert oder (biologischer) Abbau stattfindet (siehe z. B. (79)).

▼M4

*Anlage 3*

PROBENAHMEPLAN FÜR DIE TESTUNG DER BIOAKKUMULATION IM BODEN —BEISPIELE

**Regenwurmtest**

a) Aufnahmephase mit 8 Messpunkten für die Kinetikberechnung

| Tag | Arbeitsschritte |
|---|---|
| – 6 | Konditionieren des zubereiteten Bodens für 48 Std.; |
| – 4 | Dotieren der Bodenfraktion mit der Lösung der Prüfsubstanz, Abdampfen von Lösungsmitteln; Mischen der Bodenbestandteile; Befüllen der Prüfgefäße mit dem Boden; Equilibrieren bei Prüfbedingungen für 4 Tage (3 Wochen bei metalldotierten Böden); |
| – 3 bis – 1 | Entnahme der Testorganismen aus der Anzuchtkultur zwecks Akklimatisierung; Zubereitung und Befeuchtung der Bodenbestandteile; |
| 0 | Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Entnahme von Bodenproben aus den behandelten Prüfgefäßen und den Kontrollgefäßen mit Lösungsmittel zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration; Zugabe der Futterration; Wiegen und Verteilen der Würmer auf die Prüfgefäße nach dem Zufallsprinzip; Reservieren einer ausreichenden Anzahl von Teilproben von Würmern zur Bestimmung von analytischen Hintergrundwerten, Feucht- und Trockengewicht sowie Lipidgehalt; Wiegen sämtlicher Prüfgefäße zur Kontrolle der Bodenfeuchte; Kontrolle der Luftzufuhr bei Verwendung eines geschlossenen Prüfsystems; |
| 1 | Kontrolle der Luftzufuhr, Aufzeichnung von Wurmverhalten und Temperatur; Entnahme von Boden- und Wurmproben zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration; |
| 2 | wie Tag 1; |
| 3 | Kontrolle von Luftzufuhr, Wurmverhalten und Temperatur; |
| 4 | wie Tag 1; |
| 5-6 | wie Tag 3; |
| 7 | wie Tag 1; Zugabe der Futterration; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße und Ausgleichen der Verdunstungsverluste; |
| 8-9 | wie Tag 3; |
| 10 | wie Tag 1; |
| 11-13 | wie Tag 3; |
| 14 | wie Tag 1; Zugabe der Futterration; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße und Ausgleichen der Verdunstungsverluste; |
| 15-16 | wie Tag 3; |
| 17 | wie Tag 1; |
| 18-20 | wie Tag 3; |

▼**M4**

| Tag | Arbeitsschritte |
|---|---|
| 21 | wie Tag 1; Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße; Ende der Aufnahmephase; Umsetzen der Würmer aus den verbleibenden exponierten Replikaten in Gefäße mit sauberem Boden für die Eliminationsphase (ohne Entleerung des Darminhalts); Entnahme von Boden- und Wurmproben aus den Kontrollgefäßen mit Lösungsmittel. |
| | Die Arbeitsschritte vor der Exponierung (Equilibrierungsphase) sind unter Berücksichtigung der Eigenschaften der Prüfsubstanz zu programmieren. |
| | Die für Tag 3 beschriebenen Arbeitsschritte sind täglich durchzuführen (mindestens an den Arbeitstagen). |

b) Eliminationsphase

| Tag | Arbeitsschritte |
|---|---|
| – 6 | Zubereitung und Befeuchtung der Bodenbestandteile; Konditionieren des zubereiteten Bodens für 48 Std.; |
| – 4 | Mischen der Bodenbestandteile; Befüllen der Prüfgefäße mit dem Boden; Inkubation bei Prüfbedingungen für 4 Tage; |
| 0 (Ende der Aufnahmephase) | Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Wiegen und Verteilen der Würmer auf die Prüfgefäße nach dem Zufallsprinzip; Zugabe der Futterration; Umsetzen der Würmer aus den verbleibenden exponierten Replikaten in Gefäße mit sauberem Boden; Entnahme von Boden- und Wurmproben nach 4 bis 6 Std. zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration; |
| 1 | Kontrolle der Luftzufuhr, Aufzeichnung von Wurmverhalten und Temperatur; Entnahme von Boden- und Wurmproben zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration; |
| 2 | wie Tag 1; |
| 3 | Kontrolle von Luftzufuhr, Wurmverhalten und Temperatur; |
| 4 | wie Tag 1; |
| 5-6 | wie Tag 3; |
| 7 | wie Tag 1; Zugabe der Futterration; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße und Ausgleichen der Verdunstungsverluste; |
| 8-9 | wie Tag 3; |
| 10 | wie Tag 1; |
| 11-13 | wie Tag 3; |
| 14 | wie Tag 1; Zugabe der Futterration; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße und Ausgleichen der Verdunstungsverluste; |
| 15-16 | wie Tag 3; |
| 17 | wie Tag 1; |

▼M4

| Tag | Arbeitsschritte |
|---|---|
| 18-20 | wie Tag 3; |
| 21 | wie Tag 1; Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße; Entnahme von Boden- und Wurmproben aus den Kontrollgefäßen mit Lösungsmittel. |
| | Der Boden wird vor Beginn der Eliminationsphase auf dieselbe Weise zubereitet wie vor der Aufnahmephase. |
| | Die für Tag 3 beschriebenen Arbeitsschritte sind täglich durchzuführen (mindestens an den Arbeitstagen). |

**Enchyträentest**

a) AUfnahmephase mit 8 Messpunkten für die Kinetikberechnung

| Tag | Arbeitsschritte |
|---|---|
| – 6 | Konditionieren des zubereiteten Bodens für 48 h; |
| – 4 | Dotieren der Bodenfraktion mit der Lösung der Prüfsubstanz, Abdampfen von Lösungsmitteln; Mischen der Bodenbestandteile; Befüllen der Prüfgefäße mit dem Boden; Equiliben bei Prüfbedingungen für 4 Tage (3 Wochen bei metalldotierten Böden); |
| – 3 bis – 1 | Entnahme der Testorganismen aus der Anzuchtkultur zwecks Akklimatisierung; Zubereitung und Befeuchtung der Bodenbestandteile; |
| 0 | Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Entnahme von Bodenproben aus den behandelten Prüfgefäßen und den Kontrollgefäßen mit Lösungsmittel zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration; Zugabe der Futterration in den Boden; Wiegen und Verteilen der Würmer auf die Prüfgefäße nach dem Zufallsprinzip; Reservieren einer ausreichenden Anzahl von Teilproben von Würmern zur Bestimmung von analytischen Hintergrundwerten, Feucht- und Trockengewicht sowie Lipidgehalt; Wiegen sämtlicher Prüfgefäße zur Kontrolle der Bodenfeuchte; Kontrolle der Luftzufuhr bei Verwendung eines geschlossenen Prüfsystems; |
| 1 | Kontrolle von Luftzufuhr, Wurmverhalten und Temperatur; Entnahme von Boden- und Wurmproben zur Bestimmung der Prüfsubstanzkonzentration; |
| 2 | wie Tag 1; |
| 3 | Kontrolle von Luftzufuhr, Wurmverhalten und Temperatur; |
| 4 | wie Tag 1; |
| 5-6 | wie Tag 3; |
| 7 | wie Tag 1; Zugabe der Futterration in den Boden; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße und Ausgleichen der Verdunstungsverluste; |
| 9 | wie Tag 1; |
| 10 | wie Tag 3; |

▼**M4**

| Tag | Arbeitsschritte |
|---|---|
| 11 | wie Tag 1; |
| 12-13 | wie Tag 3; |
| 14 | wie Tag 1; Zugabe der Futterration in den Boden; Bestimmung von Temperatur und pH-Wert des Bodens; Kontrolle der Bodenfeuchte durch Rückwägung der Prüfgefäße; Ende der Aufnahmephase; Umsetzen der Würmer aus den verbleibenden exponierten Replikaten in Gefäße mit sauberem Boden für die Eliminationsphase (ohne Entleerung des Darminhalts); Entnahme von Boden- und Wurmproben aus den Kontrollgefäßen mit Lösungsmittel. |
| | Die Arbeitsschritte vor der Exponierung (Equilibrierungsphase) sind unter Berücksichtigung der Eigenschaften der Prüfsubstanz zu programmieren. |
| | Die für Tag 3 beschriebenen Arbeitsschritte sind täglich durchzuführen (mindestens an den Arbeitstagen). |

▼M4

*Anlage 4*

**Kunsterde — Empfehlungen für die Zubereitung und Lagerung**

Da natürlicher Boden aus einer bestimmten Quelle möglicherweise nicht das ganze Jahr über verfügbar ist und vorhandene Bodenorganismen sowie Mikroschadstoffe den Test beeinflussen können, wird für diesen Test künstliches Substrat, die Kunsterde gemäß Kapitel C.8 dieses Anhangs (Toxizität für Regenwürmer) (48), empfohlen. In dieser Kunsterde können mehrere Testspezies überleben, heranwachsen und sich vermehren, und eine maximale Standardisierung sowie Vergleichbarkeit der Test- und Kulturbedingungen sowohl laborintern als auch zwischen verschiedenen Labors sind gewährleistet.

Bodenbestanteile

| | | |
|---|---|---|
| Torf: | 10 % | Sphagnum-Torf, gemäß OECD-Richtlinie Nr. 207 (48); |
| Quarzsand: | 70 % | Industriequarzsand (luftgetrocknet); Korngröße: > 50 % der Partikel sollten Größen zwischen 50 und 200 μm aufweisen, aber alle Partikel sollten nicht größer als 2 mm sein; |
| Kaolin-Ton: | 20 % | Kaolinitgehalt: ≥ 30 %; |
| Calciumcarbonat: | ≤ 1 % | $CaCO_3$, pulverisiert, chemisch rein. |

Es ist ebenfalls möglich, den Gehalt der Kunsterde an organischem Kohlenstoff zu reduzieren, z. B. indem der Torfgehalt auf 4 bis 5 % bezogen auf das Trockengewicht des Bodens verringert und der Sandanteil entsprechend erhöht wird. Durch eine solche Reduzierung des Gehalts an organischem Kohlenstoff kann die Bindung der Prüfsubstanz an den Boden (organischen Kohlenstoff) verringert werden und die Bioverfügbarkeit der Prüfsubstanz für die Würmer zunehmen (74). Es wurde nachgewiesen, dass *Enchytraeus albidus* und *Eisenia fetida* den Validitätskriterien hinsichtlich der Vermehrung bei Versuchen mit Feldböden mit geringerem Gehalt an organischem Kohlenstoff (z. B. 2,7 % (33), (61)) genügen, und es ist auch erwiesen, dass diese Ergebnisse auch mit Kunsterde mit 5 %igem Torfgehalt erzielt werden können.

**Zubereitung**

Die trockenen Bodenbestandteile werden ca. eine Woche vor Prüfbeginn gründlich durchmischt (z. B. in einem großen Labormischer). Diese Mischung sollte mindestens 48 Std. vor Auftragen der Prüfsubstanz zur Einstellung/Stabilisierung des Säuregehalts mit entionisiertem Wasser befeuchtet werden. Der pH-Wert wird bestimmt, indem man den Boden im Verhältnis 1:5 mit 1 M KCl-Lösung mischt. Den pH-Wert des Bodens gegebenenfalls durch Zugabe einer ausreichenden Menge von $CaCO_3$ auf 6,0 ± 0,5 einstellen oder eine neue Bodenpartie zubereiten.

Die maximale Wasserhaltekapazität (WHC) der Kunsterde wird nach der ISO-Norm 11268-2 bestimmt (35). Mindesten zwei Tage vor Testbeginn die trockene Kunsterde mit genug entionisiertem oder rekonsituiertem Wasser befeuchten, bis ungefähr 50 % des endgültigen Wassergehalts, der 40 bis 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität (WHC) betragen sollte, erreicht sind. Zu Testbeginn wird der angefeuchtete Boden in so viele Portionen, wie Prüfkonzentrationen und Kontrollen für den Test benötigt werden, aufgeteilt und der Feuchtegehalt wird mit der Lösung der Prüfsubstanz und/oder entionisiertem oder rekonstituiertem Wasser auf 40 bis 60 % des $WHC_{max}$ eingestellt. Der Feuchtegehalt wird zu Beginn und am Ende des Tests (bei 105 °C) bestimmt. Er sollte optimal auf die Bedürfnisse der Spezies abgestimmt sein. (Der Feuchtegehalt kann auch überprüft werden, indem der Boden vorsichtig zusammengedrückt wird, bis kleine Wassertropfen zwischen den Finger auftauchen).

▼M4

**Lagerung**

Die trockenen Bestandteile der Kunsterde können bis zu ihrem Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert werden. Der vorbereitete, angefeuchtete Boden kann bis zu drei Tage vor dem Dotieren an einem kühlen Ort gelagert werden. Verdunstungsverluste sind möglichst gering zu halten. Der Boden ist unmittelbar nach dem Auftragen der Prüfsubstanz zu gebrauchen, außer es liegen Informationen darüber vor, dass der betreffende Boden gelagert werden kann, ohne dass hierdurch die Toxizität und Bioverfügbarkeit der Prüfsubstanz beeinflusst werden. In diesem Fall können Proben des dotierten Bodens bis zur Analyse unter den für die betreffende Prüfsubstanz empfohlenen Bedingungen gelagert werden.

▼M4

*Anlage 5*

**Als Testspezies für die Bestimmung der Bioakkumulation aus dem Boden empfohlene Arten terrestrischer Oligochaeten**

**Regenwürmer**

Die empfohlene Testspezies *Eisenia fetida* (Savigny 1826) gehört zur Familie der Regenwürmer (Lumbricidae). Seit 1972 wird sie in zwei Unterarten (*Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* aufgeteilt (10)). Laut Jaenike (36) handelt es sich jedoch um zwei gesonderte Arten. *Eisenia fetida* ist leicht an den glänzenden gelben Streifen zwischen den Segmenten erkennbar, während *Eisenia andrei* eine einheitlich dunkelrote Färbung aufweist. Die ursprüngliche Heimat dieser Arten liegt wahrscheinlich in der Gegend des Schwarzen Meers; inzwischen sind sie weltweit verbreitet und kommen vor allem in anthropogen beeinflussten Habitaten wie Komposthaufen vor. Beide lassen sich sowohl für Ökotoxikologietests als auch für Bioakkumulationstests verwenden.

*Eisenia fetida* und *Eisenia andrei* sind im Handel erhältlich, z. B. als Fischköder. Ihr Reproduktionszyklus ist im Vergleich zu anderen Lumbriciden relativ kurz. Bei Raumtemperatur erreichen sie nach ca. 2-3 Monaten Geschlechtsreife. Ihr Temperaturoptimum liegt bei ca. 20-24 °C. Sie bevorzugen ein relativ feuchtes Substrat mit neutralem pH und hohem Gehalt an organischem Material. Da diese Arten seit ca. 25 Jahren weitgehend in standardisierten Ökotoxikologietests verwendet werden, ist das Verfahren für ihre Anzucht wohlbekannt (48) (77).

Beide Arten können in vielfältigen tierischen Exkrementen angezogen werden. In der ISO-Norm (35) wird als Anzuchtsmedium eine 50:50-Mischung von Pferde- oder Rinderdung und Torf empfohlen. Das Medium sollte einen pH-Wert von etwa 6 bis 7 (eingestellt mit Calciumcarbonat) sowie eine niedrige Ionenleitfähigkeit (weniger als 6 mS/cm oder weniger als 0,5 % Salzkonzentration) haben und sollte nicht übermäßig mit Ammonium oder tierischem Urin verunreinigt sein. Es kann auch handelsübliche zusatzfreie Gartenerde, OECD-Kunsterde (48) oder eine Mischung aus beiden zu gleichen Teilen verwendet werden. Das Substrat sollte feucht, jedoch nicht zu nass sein. Zur Anzucht eignen sich Kästen mit einem Fassungsvermögen von 10 Liter bis 50 Liter.

Zur Gewinnung von Würmern gleichen Alters und gleicher Größe (Masse) ist es am besten, die Kultur mit Kokons zu beginnen. Hierzu werden adulte Würmer zur Kokonablage in einen Anzuchtkasten mit frischem Substrat gesetzt. Die praktische Erfahrung hat gezeigt, dass eine Besatzdichte von ca. 100 adulten Würmern pro kg Substrat (Feuchtgewicht) gute Reproduktionsraten ergibt. Nach 28 Tagen werden die adulten Tiere entfernt. Die aus diesen Kokons geschlüpften Würmer werden nach Erreichen der Geschlechtsreife nach mindestens zwei Monaten, spätestens jedoch nach 12 Monaten für Tests verwendet.

Die Würmer der oben beschriebenen Arten können als gesund betrachtet werden, wenn sie sich durch das Substrat bewegen, nicht versuchen, das Substrat zu verlassen und sich regelmäßig reproduzieren. Substratmangel wird durch eine sehr langsame Bewegung der Würmer angezeigt und dadurch, dass sie ein gelbes hinteres Ende (im Fall von *Eisenia fetida*) aufweisen. In diesem Fall ist/sind die Bereitstellung von frischem Substrat und/oder die Reduzierung der Besatzdichte je Kasten zu empfehlen.

**Zusätzlich ausgewähltes Referenzmaterial**

Gerard B.M. (1964): Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O. (1953): Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J., Egeler P., Füll C. (1997): Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S. (1977): Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell J.E. (1955): Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims R.W. and Gerard B.M. (1985): A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin A.D. (1984): The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology — from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

**Enchytraeen**

Als Testspezies wird *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (Weißer Topfwurm) empfohlen. Mit einer Länge von bis zu 15 mm ist *Enchytraeus albidus* einer der größten Vertreter der zu den Ringelwürmern gehörenden Oligochaetenfamilie Enchytraeidae und ist ubiquitär (8) verbreitet. *Enchytraeus albidus* ist in marinen, limnischen und terrestrischen Habitaten zu finden, hauptsächlich in faulendem organischem Material (Seetang, Kompost), aber, wenn auch seltener, ebenso in Wiesen (42). Diese breite ökologische Toleranz und einige morphologische Variationen weisen darauf hin, dass es möglicherweise mehrere Unterarten dieser Art gibt.

*Enchytraeus albidus* ist im Handel erhältlich, z. B. als Fischfutter. Es ist zu prüfen, ob andere, für gewöhnlich kleinere Arten in der Kultur präsent sind (60). Ist dies der Fall, sind alle Würmer in einer Petrischale mit Wasser zu waschen. Große adulte Exemplare von *Enchytraeus albidus* werden dann (mittels Stereomikroskop) für eine neue Kultur aussortiert. Alle anderen Würmer werden verworfen. Der Reproduktionszyklus ist kurz, da die Tiere ihre Geschlechtsreife zwischen 33 Tagen (bei 18 °C) und 74 Tagen (bei 12 °C) erreichen. Für die Versuche sollten ausschließlich Wurmkulturen verwendet werden, die mindestens fünf Wochen lang (eine Generation) problemlos im Labor gehalten wurden.

Andere Arten der Gattung *Enchytraeus* sind ebenfalls geeignet, insbesondere *Enchytraeus luxuriosus*. Diese in (65) neu beschriebene Art ist ein echter Bodenbewohner. Werden andere *Enchytraeus*-Arten verwendet, so sind diese eindeutig zu identifizieren und die Gründe für die Wahl der Art zu protokollieren.

Die Art *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) gehört zur selben Gruppe wie *Enchytraeus luxuriosus*. Ihr Vorkommen im Freiland konnte nicht sicher nachgewiesen werden, da die Art bisher nur im Zusammenhang mit Wurmzuchten und Komposthaufen beschrieben wurde (Römbke 2003). Ihre ursprünglichen ökologischen Ansprüche sind daher nicht bekannt. Jüngste Laborstudien mit Freilandböden haben jedoch bestätigt, dass sich diese Art durch eine breite Toleranz gegenüber Bodeneigenschaften wie pH-Wert ud Bodentextur auszeichnet (Jänsch et al. 2005). In jüngster Zeit wird die Art wegen der Einfachheit ihrer Zucht und Testung häufig für ökotoxikologische Studien verwendet (z. B. Kuperman et al. 2003). Die Tiere sind jedoch klein (3-12 mm; im Durchschnitt 7 mm) (Westheide & Müller 1996) und daher nicht so leicht handhabbar wie *Enchytraeus albidus*. Bei Verwendung dieser Art anstelle von *Enchytraeus albidus* können, müssen aber nicht unbedingt kleinere Prüfgefäße eingesetzt werden. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass sich diese Art mit einer Generationszeit von weniger als 20 Tagen bei 20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999) sehr schnell und bei höheren Temperaturen sogar noch schneller vermehrt.

Enchytraeen der Art *Enchytraeus albidus* (sowie andere *Enchytraeus*-Arten können in großen Kunststoffschalen (z. B. 30 × 60 ×10 cm bzw. 20 × 12 × 8 cm für Kulturen kleinerer Wurmarten) gezüchtet werden, die mit einer Mischung aus Kunsterde und im Handel erhältlicher zusatzfreier Gartenerde gefüllt sind. Kompostmaterial ist zu vermeiden, da dieses toxische Substanzen wie Schwermetalle enthalten kann. Vor Gebrauch sollte das Zuchtsubstrat durch dreimaliges Tiefgefrieren defauniert werden. Reine Kunsterde kann ebenfalls verwendet werden, doch könnte die Reproduktionsgeschwindigkeit geringer sein als bei der Verwendung von Mischsubstraten. Der pH-Wert des Substrats sollte bei 6,0 ± 0,5 liegen. Die Zucht erfolgt in einem Inkubator bei 15 ± 2 °C im Dauerdunkel. In jedem Fall sind Temperaturen von über 23 °C zu vermeiden. Der künstliche/natürliche Boden sollte feucht, jedoch nicht nass sein. Bei leichtem Zusammendrücken des Bodens (Faustprobe) sollten nur kleine Wassertropfen austreten. Auf jeden Fall ist die Sauerstoffversorgung sicherzustellen (z. B. muss bei Verwendung eines Deckels dieser so perforiert sein, dass ein ausreichender Luftaustausch gewährleistet ist). Die Anzuchterde sollte einmal wöchentlich durch vorsichtiges Mischen belüftet werden.

▼M4

Die Würmer sollten mindestens einmal wöchentlich ad libitum mit Haferflocken gefüttert werden, die in eine Vertiefung auf der Bodenoberfläche gegeben und mit Erde abgedeckt werden. Bleiben von der letzten Fütterung Futterreste im Behälter, so ist die Futterzugabe entsprechend anzupassen. Bei Pilzbesatz auf den Futterresten sind diese durch eine neue Menge Haferflocken zu ersetzen. Zur Stimulierung der Reproduktion kann den Haferflocken alle zwei Wochen mit Vitaminen angereichertes Proteinpulver zugesetzt werden. Nach drei Monaten werden die Tiere in eine frisch angesetzte Kultur oder Zuchtsubstrat umgesetzt. Die Haferflocken sind in geschlossenen Gefäßen zu lagern und sollten vor Gebrauch autoklaviert oder erhitzt werden, um den Befall mit Mehlmotten (z. B. *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) oder Raubmilben (z. B. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina) zu vermeiden. Das desinfizierte Futter wird gemahlen, so dass es sich leicht auf die Bodenoberfläche streuen lässt. Als weitere Futterquellen kommen Bäckerhefe oder TetraMin®-Fischfutter in Betracht.

In der Regel sind die Anzuchtbedingungen ausreichend, wenn die Würmer nicht versuchen, das Substrat zu verlassen, sich schnell durch den Boden bewegen, eine glänzende Hautoberfläche ohne anhaftende Bodenpartikel aufweisen und weißlich gefärbt sind und wenn Würmer verschiedener Altersgruppen vorhanden sind. Die Würmer können als gesund betrachtet werden, wenn sie sich regelmäßig reproduzieren.

**Zusätzlich ausgewähltes Referenzmaterial**

Achazi R.K., Fröhlich E., Henneken M., Pilz C. (1999): The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S., Amorim M.J.B., Römbke J. (2005): Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman R.G., Checkai R.T., Simini M., Phillips C.T., Kolakowski J.E., Kurnas C.W., Sunahara G.I. (2003): Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J. (2003): Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W. and Graefe U. (1992): Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W. and Müller M.C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.