

Basisvalidierung genormter Verfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Validierungsdokument

Verfahren: DIN 38415-T6

- A** **Allgemeine Angaben**
- A.1** **Anwendungsbereich**
- A.1.1** **Erfasste Parameter**
- A.1.2** **Arbeitsbereich**
- A.1.2.1** **Geprüfte Matrices**
- A.1.2.2** **Geprüfter und kalibrierter Konzentrationsbereich**
- A.1.2.3** **Selektivität / Spezifität**
- A.1.2.4** **Mögliche Erweiterungen des Verfahrens**
- A.2** **Störungen**
- A.2.1** **Störungen, die die Selektivität / Richtigkeit / Präzision des Verfahrens beeinflussen**
- A.3** **Chemikalien / Geräte**
- A.3.1** **Blindwerte / Blindwertschwankungen**
- A.3.2** **Spezielle Reinigungsverfahren**
- A.3.3** **Haltbarkeit von Chemikalien, Lösungen, Standards**
- A.3.4** **Stabilität der Geräteparameter**

- A.3.5 Auftretende Kontaminationen / Hinweise zur Vermeidung**
- A.3.6 Chromatographische Verfahren**
- A.3.7 Verfügbarkeit von Standardreferenzmaterialien mit Herstellernachweis**
- A.4 Proben / Probenaufbereitung**
- A.4.1 Hinweise zur Probenahme**
- A.4.2 Probenstabilität / Probenkonservierung**
- A.4.3 „clean up“ (Anreicherungsmaterialien, Extraktionsmittel u.a.)**
- A.5 Kalibrierung**
- A.5.1 Art der Kalibrierung**
- A.5.2 Verwendete Referenz-, / Kontroll- / Kalibriersubstanzen**
- A.5.3 Kalibrierter Konzentrationsbereich**
- A.5.4 Präzision bei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus**
- A.6 Untersuchungen zur Richtigkeit**
- A.6.1 verwendetes Referenzmaterial**
- A.6.2 Blindwerte**
- A.6.3 Abweichung vom Sollwert bei unterschiedlichen Konzentrationen**
- A.7 Untersuchungen zur Wiederfindung**
- A.7.1 Eingesetzte Matrices**
- A.7.2 Höhe und Schwankung der Wiederfindung**

- A.8 Probleme bei der Probenuntersuchung / Testdurchführung**
- A.8.1 Störungen**
- A.8.2 Besondere Durchführungsschwierigkeiten**
- A.9 Verfahrenskenndaten zur Kontrolle der Richtigkeit, Präzision, Robustheit (Ringversuche)**
- A.9.1 analysierte Parameter**
- A.9.2 verwendete Referenzmaterialien**
- A.9.3 untersuchte Matrices**
- A.9.4 untersuchte Konzentrationsniveaus**
- A.9.5 Zahl der teilnehmenden Labors**
- A.9.6 Ausreißerquote**
- A.9.7 Wiederholvariationskoeffizient**
- A.9.8 Vergleichsvariationskoeffizient**
- A.9.9 Nachweis und Bestimmungsgrenze**
- A.9.10 Vergleich mit Ergebnissen anderer Verfahren**

B Zusätzliche Validierungskriterien für biologische Testverfahren

B.1 Biologische Testverfahren

B.1.1 Herkunft und Bezugsmöglichkeiten

Stamm "Westaquarium". Bezugsmöglichkeiten: Umweltbundesamt, FG III 3.6; Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, siehe Anlage 1

B.1.2 Vorbehandlung, Akklimatisation, Adaption

Keine Vorbehandlung, übliche Adaption (Quarantäne) an die laborspezifischen Hälterungsbedingungen (1 bis 2 Wochen)

B.1.3 Aufbewahrung, Haltung, Zucht

Geschlechtsdifferenzierung

Bei artgemäßer Haltung ist die Juvenilphase des Zebraärbings ca. 12-16 Wochen nach der Eireifung abgeschlossen (wobei in jeder Kohorte ein geringer Anteil an „Frühentwicklern“ und „Spätentwicklern“ biologische Normalität abbildet). Bei adulten Zebraärbingen (maximale Körpergröße ca. 4,5 cm) sind morphologische und verhaltensbiologische Geschlechtsunterschiede mehr oder weniger deutlich ausgeprägt. Die im statistischen Mittel geringfügig kleineren Männchen weisen bei gleichem Zeichnungsmuster wie die Weibchen an den Körperseiten auf stahlblauer Grundfärbung goldglänzende Längsbinden auf. Die deutlich gemusterte Afterflosse ist relativ größer als bei den Weibchen. Die Längsbinden der insgesamt blasser gefärbten Weibchen sind eher silbrig bis gelblich gefärbt. Laichbereite Weibchen sind auf den ersten Blick an ihrer aufgetriebenen Ventralpartie zu erkennen: sichtbarer Ausdruck der hohen Eizahlen, die der Zebraärbing als r-Strategie vor jeder Eiablage produziert.

Unterschiedliche Verhaltensweisen der Geschlechter sind naturgemäß bei der Fortpflanzung zu beobachten, insbesondere bei der Balz und beim Abblanchvorgang. Unter Laborbedingungen bedarf es bestimmter optischer Schlüsselreize (z.B. Wasserpflanzen bzw. geeigneter Glasattrappen), die diese geschlechtsspezifischen Verhaltensmuster auslösen. Bei der Balz wird ein Weibchen unter Umständen von mehreren Männchen mit hoher Geschwindigkeit verfolgt und an den Boden des Aquariums bzw. an geeignete Substrate gedrängt. Das jeweils erfolgreiche Männchen umschlingelt bei direktem Körperkontakt sein Weibchen, das bei Ausführung einer ähnlichen Schängelbewegung schließlich die Eier ausstößt. Dieses charakteristische Balz- und Abblanchverhalten unterliegt einer eindeutigen Tagesperiodik; es ist vorwiegend in der ersten Stunde nach Einschaltung der Beleuchtung zu beobachten. Nach Abschluss der morgendlichen Balz neigen vor allem die männlichen Tiere des Schwarmfisches Zebraärbing zur Bildung ausgeprägter Schwimmschulen.

Bei äußerer Stress-Einwirkung bzw. bei nicht artgemäßer Haltung bilden sich die morphologischen und verhaltensbiologischen Geschlechtsunterschiede weniger prägnant aus. Solche Tiere sind nicht zur Produktion vitaler Eier für die Durchführung des Fischei-Tests nach vorliegender Norm geeignet.

Eigewinnung

Die Elterntiere werden in Aquarien gehältert, in denen ausreichend Schwimmraum zur Verfügung steht (Richtwert: 1 l / Fisch).

Für die Haltung der Zebraärbinge zur Eiproduktion kann chlorfreies Trinkwasser verwendet werden. Die Sauerstoffsättigung sollte mindestens 80%, die Temperatur $26 \pm 1^\circ\text{C}$ betragen.

Eine problemlose Eiproduktion über längere Zeiträume kann durch Fütterung mit handelsüblichem Zierfischtrockenfutter sichergestellt werden, die möglichst zweimal täglich erfolgen sollte. Darüber hinaus hat sich eine Zusatzfütterung mit Lebendfutter (z. B. *Artemia salina* - Nauplien) bewährt. Sie ist aber nicht zwingend notwendig.

Eine Überschussfütterung ist zu vermeiden.

Die Eier von *Artemia salina* können über den Aquarienhandel bezogen werden. Die Bebrütungsbedingungen sind den Herstellerangaben zu entnehmen. Vor der Verfütterung werden die Nauplien zweimal mit Leitungswasser gespült (Entfernen des Salzes) und anschließend im Beckenwasser verteilt.

Voraussetzung für eine kontinuierliche Eiproduktion der Elterntiere ist ein ganzjährig fest eingestellter Hell-Dunkel-Rhythmus. Erfahrungen verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von z. B. 16/8 oder 12/12 Stunden eine synchronisierte Eiablage innerhalb 1 Stunde nach Einschalten der Beleuchtung erfolgt.

Zur Zucht sollen Elterntiere verwendet werden, die keine äußerlich erkennbaren Krankheiten aufweisen (a) und zwischen drei und zwölf Monaten alt sind (b).

Zu a:

Die Elterntiere sollen möglichst aus einheitlichem genetischen Material stammen (zentrale Versorgung), einen einwandfreien Gesundheitsstatus aufweisen (Parasiten, Tuberkulose), nicht medikamentös (vor)behandelt sein und frei von äußerlich erkennbaren (Skelett-)Deformationen sein.

Zu b:

Grundsätzlich liefern Elterntiere bis zu einem Alter von mindestens 2 ½ Jahren brauchbare Eier. Die Erfahrungen verschiedener Arbeitsgruppen haben jedoch gezeigt, dass optimale Befruchtungsraten und geringe Sterblichkeiten in den Kontrollen am ehesten in einem Alter von drei bis zwölf Monaten erreicht werden. (Derartige Verhältnisse für jeweils spezifische Zeiträume innerhalb der Lebensabschnitte von Fischen in Abhängigkeit von den Arten gelten grundsätzlich und sind durch die Arbeiten im Rahmen der Durchführung von Early Life Stage Tests bekannt.)

Das Ablachen der Eier kann sowohl in großen Hälterungsbecken mit einem Besatz von 200 oder mehr Fischen als auch in kleineren Aquarien mit definierten Besatzzahlen erfolgen. In diesem Fall hat sich ein Verhältnis von 2:1 (Männchen: Weibchen) als Gruppenzusammensetzung bewährt (gute Erfahrungen liegen mit Besatzdichten von 8 Männchen und 4 Weibchen in einem 20 l Aquarium vor).

Adulte Zebrabärblinge sind starke Laichräuber, die die abgelegten Eier in der Regel sofort fressen. Aus diesem Grund werden Laichschalen eingesetzt, die mit einem Edelstahlgitter abgedeckt sind. Als Anreiz und Auslöser für das Ablachen sind Licht und Pflanzen (taktile Reiz) notwendig. Der Lichtreiz ist durch den eingestellten Hell-Dunkel-Rhythmus gewährleistet, der taktile Reiz kann durch Pflanzen Attrappen aus Kunststoff oder Glas, die auf dem Edelstahlgitter befestigt sind, simuliert werden.

Grundsätzlich sind zwei Zeitpunkte für das Einsetzen der Laichschalen möglich:

1. Am Abend vor dem Ablachen; in diesem Fall sollten die Schalen so spät wie möglich eingesetzt werden, um eine Verschmutzung der Laichschale und der Eier durch Kot- und Futterreste so gering wie möglich zu halten.
2. Morgens, unmittelbar vor oder nach dem Einschalten des Lichtes (Vorteil: keine Verschmutzung, sicher definiertes Alter der Eier).

Balz und Eiablage finden innerhalb von etwa 30 Minuten nach Beleuchtungsbeginn statt.

Ca. 30 min nach Einschalten des Lichtes und vor der Fütterung werden die Laichschalen entnommen.

Die transparenten Eier können im Schräglicht über einer schwarzen Unterlage leicht identifiziert werden. Die Befruchtungsraten sollen mehr als 50 % betragen.

In der Regel können täglich zwischen 80 und 100 Eier pro Weibchen erhalten werden. Bleibt die Eiablage über mehrere Tage aus, oder werden nur wenige Eier abgelaicht und ist dies nicht ursächlich mit einer unregelmäßigen Fütterung in Zusammenhang zu bringen, sollten folgende Maßnahmen zur Überprüfung und Beseitigung durchgeführt werden:

1. Einsetzen der Laichschalen auch am Wochenende,
2. Austausch der Männchen (nur sinnvoll bei den o. g. geringen Besatzdichten),
3. Austausch des gesamten Laichfischbestandes (nur sinnvoll bei den o. g. geringen Besatzdichten).

B.1.4 Nahrung, Futterqualität

Siehe B 1.3

B.1.5 Qualitätskriterien der Testorganismen

Siehe B 1.3

B.1.6 Zeitintervall, in denen ein Einsatz möglich ist

Alter der Zuchttiere zwischen 3 und 12 Monaten.

B.2 Proben und Probenahme

B.2.1 Probenahme

Die Hinweise in DIN EN ISO 5667-16 sind zu beachten.

B.2.2 Probenkonservierung

Die Hinweise in DIN EN ISO 5667-16 sind zu beachten.

B.3 Kalibrierung

B.3.1 Auswahl und Einsatz geeigneter Referenz- und Kontrollsubstanzen, um die Empfindlichkeit der Organismen zu kennen

Im Verlauf der Normungsarbeiten wurde eine Reihe von Substanzen auf ihre Eignung als Referenzchemikalien für das Testsystem überprüft. Dabei wurde unter anderem auf die von der Tierschutzakademie im Rahmen der Prüfung des Fischzellinientests erstellte Chemikalienliste Bezug genommen: Kaliumdichromat, 2,4-Dinitrophenol, Natrium-Dodecylsulfat, Benzoesäure, Kupfersulfat, 3,4-Dichloranilin, Natriumchlorid, Natriumsulfat.

Natriumchlorid und Natriumsulfat wurden untersucht, um Basisdaten für die Ermittlung der Salzfehlerkorrektur ("Salzfaktor") im praktischen Vollzug der Einleiterüberwachung zu ermitteln. Die Ergebnisse des Arbeitskreises sind in Anhang 2 aufgeführt.

Kaliumdichromat wurde in der Anfangsphase der Untersuchungen überprüft, von einer Verwendung als Referenzsubstanz aus zwei Gründen jedoch abgesehen: Die Konzentrations-Wirkungskurve verläuft sehr flach und Kaliumdichromat ist kanzerogenverdächtig.

Ergebnisse zu Natrium-Dodecylsulfat, Benzoesäure und Kupfersulfat sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Alle drei Verbindungen wurden als Referenzsubstanz ausgeschlossen. Kupfersulfat auf Grund der unterschiedlichen Löslichkeit und/oder Bioverfügbarkeit bei geringfügig variierender Zusammensetzung des Testmediums; Benzoesäure wegen seiner extrem stark pH-abhängigen Wirkung und Natrium-Dodecylsulfat aus Gründen der Substanzspezifität (Natriumalkyl(C₈-C₂₀)-sulfate sind in der Regel Gemische mit unterschiedlichen C-Kettenlängen. Die aquatische Toxizität erhöht sich in der Regel mit zunehmender C-Kettenlänge). 2,4-Dinitrophenol bereitet Schwierigkeiten bei der Einwaage und Herstellung der Stammlösung.

Die Referenzsubstanz sollte leicht handhabbar, weitgehend ungefährlich und als Stammlösung längere Zeit lagerfähig sein. Zu allen überprüften Substanzen liegen Vergleichsdaten aus dem Arbeitskreis vor. Nach ausführlichen Diskussionen erfolgte die Festlegung auf 3,4-Dichloranilin als Referenzsubstanz.

Ergebnisse zur Überprüfung möglicher Referenzsubstanzen (EC₅₀, 48 h)

Labor	CuSO ₄ EC ₅₀ [mg/L]	Benzoessäure EC ₅₀ [mg/L]	Na-Dodecyl- Sulfat EC ₅₀ [mg/L]	2,4 DNP EC ₅₀ [mg/L]
UBA	0,71 / 0,70	1021 / 981 / 23	5,17 / 4,48	0,1 – 1,0
StUA Hagen	0,52	17,1	4,52	-
UFZ Leipzig	0,17	15,6	5,27	-
TU-Berlin	0,27 / 0,22	-	5,05	0,9 / 0,9
TU-Dresden	0,32	28,3	5,77	-
Uni Heidelberg	0,28 – 0,34	26,4	3,75 – 5,08	1,4 / 1,27 / 1,34
ECT	0,58 / 0,52	-	-	0,78
Bayer AG	0,7	> 100	3,5 / 5,5	ca. 3
BASF	1,35 / 0,67 / 1,5	-	3,7 / 6,5 / 6,8	-
Bay. LfW	1,34 / 1,15	> 100	5,91 / 6,86	-

Als Gültigkeitskriterium für den Fischei-Test ist festgelegt, dass die Positivkontrolle (3,7 mg 3,4-DCA / L) eine Sterblichkeit von mehr als 10% verursachen muss. In der Regel liegt die Mortalität zwischen 10 % und 90 %. Im Verlauf der umfangreichen Zahl von Versuchen traten vereinzelt Mortalitäten von 100 % in der Positivkontrolle auf. Auch in einem solchen Fall ist der Test gültig. Die Diskussion innerhalb des AK hat im Einzelfall ergeben, dass derartige Befunde als Hinweise auf veränderte Randbedingungen im jeweiligen Untersuchungslabor angesehen werden können (z. B. Verlegung neuer Cu-Wasserleitungen, Ansatz der Stammlösung usw.). Es erscheint daher empfehlenswert, in solchen Fällen das Testsystem und die Randbedingungen im Labor zu überprüfen.

Zusätzliche Informationen zur 3,4-DCA-Analytik und Stabilität von Stammlösungen finden sich im Forschungsbericht von F. Strüder, B. von Danwitz und M. Scholze (1998). Forschungsvorhaben Az. 070 TX 06.

B.3.2 Verwendung von Referenz- und Kontrollsubstanzen in Ökotoxizitätstests Verdünnungsreihen - ökotoxikologischer Methodenansatz Hinweis auf simulierte Hemmkurven

entfällt

- B.3.3 Verwendung von Referenz- und Kontrollsubstanzen in Abbautests**
- B.3.4 Messung und Berücksichtigung von Blindwerten, um Effekte der Testumgebung ohne das Testgut auf die Testorganismen zu erfassen**
- Die Festlegung der Zahl und der Einsatzort für Kontroll-Eier erfolgte auf Basis der Untersuchungsergebnisse und Diskussionen innerhalb des AK 7.6.
- Begonnen wurde mit einer vollständig belegten Kontrollplatte (die verwendeten Mikrotiterplatten verfügen über 24 Vertiefungen). Aus den Erfahrungen mit dem Einsatz von Mikrotiterplatten, z. B. bei Zellinientests, wurde die dort übliche interne Plattenkontrolle (4 Vertiefungen pro Platte) beibehalten. Sie soll sicherstellen, dass Materialfehler der Platte, die bei den o. a. Zelltests gelegentlich auftraten, keine Effekte verursachen.
- Im Laufe der Verfahrensnormung wurde die Replikanzahl pro Verdünnungsstufe von 20 auf 10 reduziert, so dass nunmehr zwei Konzentrationen pro Platte geprüft werden können. Die Belegung der ersten vier Vertiefungen als interne Kontrolle wurde beibehalten.
- Hinsichtlich der Gültigkeitskriterien für einen Test ist ein totes Ei in der externen Kontrolle zulässig.
- Die internen Plattenkontrollen wurden nicht in die Gültigkeitskriterien aufgenommen. Sterblichkeiten in der internen Kontrolle sind als Hinweis auf ungeeignete Platten zu bewerten. Bisher wurden Sterblichkeiten in den internen Kontrollen nur in ganz seltenen Fällen festgestellt. Bei Sterblichkeiten > 1 bei den internen Kontrollen einer Platte wird diese Platte vollständig von der Bewertung ausgeschlossen. Je nachdem, welche Platte aus der Untersuchungsserie betroffen ist, ist vom Testverantwortlichen zu entscheiden, ob dies Auswirkungen auf die Auswertbarkeit des vollständigen Testansatzes hat.
- Für den Fall, dass ein Ei in der internen Kontrolle tot ist, sollte eine Plausibilitätsprüfung vorgenommen und dokumentiert werden. Im Zweifelsfall sollte auch eine solche Platte von der Auswertung ausgeschlossen werden.
- B.3.5 Vergleich der Messwerte, die mit Referenz- und Kontrollsubstanzen und Blindwerten in Ringversuchen erhalten wurden, um eine Aussage zur Reproduzierbarkeit der Methode machen zu können.**
- Siehe Verfahrenskenndaten, Punkt B.6 und Ringtestergebnisse in Anlage 1
- B.4 Analytik und Informationen über Testsubstanzen**
- B.4.1 Eignung und Reproduzierbarkeit der vorgesehenen Analytik als Messparameter in Abbautests**
- entfällt
- B.4.2 Hinweise, ob und welche Angaben über die Testsubstanzen bei der späteren Anwendung der Testmethode vorliegen sollten**
- Die Hinweise in DIN EN ISO 5667-16 sind zu beachten.
- B.5 Testansätze und Testdurchführung**
- Eidifferenzierung und Eientwicklung:

Für die Durchführung des Versuchs werden befruchtete Eier des Zebrahärlings (*Danio rerio*) benötigt. Es ist also notwendig, zwischen befruchteten und unbefruchteten Eiern sicher unterscheiden zu können. Das Ei des Zebrahärlings hat einen Durchmesser von ca. 0.6 mm und wird durch das Chorion, die Eihülle, nach außen begrenzt. Das Chorion ist transparent und umgibt den Perivitellinraum, in dem sich der Dotter (vegetativer Bereich) und die dem Dotter animal aufsitzende Keimscheibe befinden. Ein frisch befruchtetes Ei, bei dem noch keine Zellteilung durchlaufen wurde, wird als Zygote bezeichnet. Die ersten fünf Teilungen verlaufen vertikal. Die Teilungsfurchen erscheinen nahe dem animalen Pol und erweitern sich schnell in Richtung des vegetativen Pols. Die Teilungsfurche zieht sich nur durch die Keimscheibe und nicht durch die Dotterregion des Eis. Die ersten 6 Teilungen sind meroblastisch, das heißt, die Keimscheibe wird nur unvollständig durchtrennt. Die einzelnen Zellen können in diesem Stadium noch durch Cytoplasmabrücken miteinander verbunden sein. Die ersten Teilungen verlaufen annähernd synchron in Intervallen von etwa 15 bis 20 Minuten.

Nach ca. einer $\frac{3}{4}$ Stunde ist die erste Teilung abgeschlossen. Die Keimscheibe ist in zwei Zellen (Blastomeren) geteilt (2-Zellstadium, Bild 1).



Bild 1: 2-Zellstadium (15 – 45 min nach Eiablage)

Nach ca. 1 Stunde ist die zweite Zellteilung durchlaufen, und es sind vier Zellen erkennbar. (4-Zellstadium, Bild 2). Nur Eier, die mindestens dieses Stadium erreicht haben, werden zur Durchführung des Versuchs verwendet.



Bild 2: 4-Zellstadium (45 - 75 min nach Eiablage)

Im Zuge der weiteren Teilungen entstehen Keimscheiben, die aus 8, 16, 32 und 64 Blastomeren bestehen (Bild 3, 4, 5, 6). Da die verwendeten Eier bei Entnahme zwischen 0 und 30 Minuten alt sind und für die Differenzierung der Eier in befruchtete und unbefruchtete ebenfalls Zeit benötigt wird, können alle diese unterschiedlichen Stadien während der Eidifferenzierung beobachtet und für den Versuch verwendet werden.



Bild 3: 8 Zell-Stadium (70 - 100 min nach Eiablage)

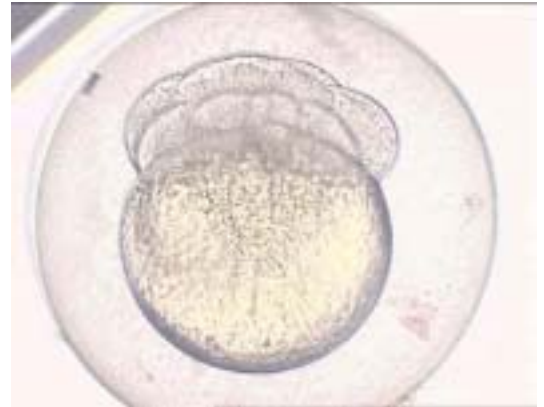


Bild 4: 16 Zell-Stadium (90–120 min nach Eiablage)



Bild 5: 32 Zell-Stadium (105 - 145 min nach Eiablage)



Bild 6: 64 Zell-Stadium (2,0 – 2,5 h nach Eiablage)

Unbefruchtete Eier koagulieren (Bild 7) innerhalb der ersten 8-10 Stunden. Eier, deren Keimscheibe asymmetrisch geteilt ist (Bild 8), Bläschenbildung aufweist (Bild 9a, b) oder deren Chorion verletzt ist, dürfen nicht für den Versuch herangezogen werden. Gelegentlich werden sehr kleine weiße Eier abgelaicht. Hierbei handelt es sich um Oozyten, die bereits in den Fischen denaturiert sind. Diese denaturierten Oozyten dürfen ebenfalls nicht zur Testdurchführung verwendet werden.



Bild 7: Unbefruchtetes, koagulierte Ei (nicht für Testzwecke geeignet)

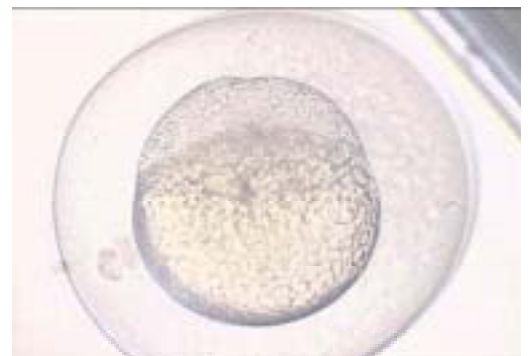


Bild 8: Asymmetrisch geteilte Keimscheibe



Bild 9a: Bläschenbildung (nicht für Testzwecke geeignet)



Bild 9b: Bläschenbildung (nicht für Testzwecke geeignet)

Da auch die weitere Entwicklung des Embryos bis zum Zeitpunkt 48 Stunden (Bild 10) im Rahmen des Versuches beurteilt wird, sei an dieser Stelle auf die Arbeit von Kimmel et al. (1995) hingewiesen. Die verschiedenen Entwicklungsstadien des Zebrafärblings sind hierin sehr gut dargestellt. Die Angaben zur Entwicklungsgeschwindigkeit stimmen jedoch nicht mit der Entwicklungsgeschwindigkeit unter den Testbedingungen des Fischei-Tests überein. Die Untersuchungen von Kimmel et al. (1995) wurden bei 28,5°C und nicht, wie der Fischei-Test, bei 26 °C durchgeführt. Die Entwicklungsgeschwindigkeit des Zebrafärblings ist bis zum Stadium der späten hohen Blastula, nach Schirone und Gross (1968) in einem Temperaturbereich zwischen 23°C und 34°C konstant. Die späteren Stadien der Embryonalentwicklung werden jedoch bei höheren Temperaturen schneller durchlaufen. Dementsprechend verläuft die Embryonalentwicklung unter den Testbedingungen des Fischei-Tests (26°C) in den späteren Stadien etwas langsamer als von Kimmel et al. (1995) beschrieben.



Bild 10: Ei mit entwickeltem Embryo bei Testende (48 h)

Empfohlene Literatur zur Embryonalentwicklung:

1. Detrich, H.W., Westerfield, M., Zon, L.I. (1999): The zebrafish – biology. *Methods in Cell Biology* 59: 391 pp. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.
2. Friccius, T.; Schulte, C.; Ensenbach, U.; Seel, P. und R. Nagel (1995): Der Embryotest mit dem Zebraärbling – eine neue Möglichkeit zur Prüfung und Bewertung der Toxizität von Abwasserproben. *Vom Wasser*, 84, 407-418.
3. Fußmann, G. und R. Nagel (1997): Laborvergleichsversuche – Embryotest mit dem Zebraärbling *Brachydanio rerio*. UBA-FB 98-009.
4. Hisaoka K.K. and C.F. Firlit (1960): Further studies on the embryonic development of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton Buchanan). *J. Morphol.* 107, 205-225.
5. Hisaoka, K.K. and H.J. Battle (1958): The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton Buchanan). *J. Morph.* 102, 311-328.
6. Kimmel, Charles B., Ballard, William W., Kimmel, Seth R., Ullman, Bonnie, and Thomas F. Schilling, (1995): Stages of Embryonic Development of the Zebrafish., *Developmental Dynamics* 203, No. 3, 253-310.
7. Nagel, R. und K. Isberner (1998): Testing of chemicals with fish – a critical evaluation of tests with special regard to zebrafish. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E. and B. Streit (Eds.). *Fish Ecotoxicology*, Birkhäuser Verlag Basel / Switzerland, 338-352.
8. Schirone, R.C. and L. Gross (1963): Effect of temperature on early embryological development of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. exp. Zool.* 169, 43-52.
9. Schulte, C. and R. Nagel (1994): Testing Acute Toxicity in the Embryo of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an Alternative to the Acute Fish Test: Preliminary results. *ATLA* 22, 12-19.
10. Strüder, F., Danwitz, von B., Scholze, M. (1998): Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen – Binäre Kombinationen von unähnlich wirkenden Substanzen unter Bedingungen akuter und chronischer Exposition. *FuE-Forschungsvorhaben Az. 070 TX 06*.
11. Westerfield M. (1995): *The zebrafish book. Guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 3rd ed. Univ. of Oregon Press, Eugene.
12. <http://www.grs.nig.ac.jp:6070/index.html>
13. <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/>
14. <http://zdb.wehi.edu.au:8282/>
15. <http://zfin.org/>

B.5.1 Etablierung von Kriterien zur Prüfung von Testsubstanzen in realitätsnahen Matrices

entfällt

B.5.2 Etablierung von Prüfkriterien oder Kriterien zum Ausschluß problematischer Testsubstanzen bei Abbauprüfungen

entfällt

B.5.3 Etablierung von Kriterien zur Erreichung einer ausreichenden Verteilung schwer wasserlöslicher Stoffe in Testansätzen

entfällt

B.5.4 Zugabe der Testsubstanz in die Testsysteme

Die Hinweise in DIN EN ISO 5667-16 sind zu beachten.

B.5.5 Definition des Anwendungsbereichs und der Auswertekriterien für problematische Testsubstanzen

Das Verfahren ist anzuwenden auf behandelte Abwässer. Es ist grundsätzlich möglich, mit diesem Verfahren auch Oberflächenwasser, Grundwasser sowie Eluate, z. B. aus Boden-, Sediment-, Abfall- und Klärschlammproben zu untersuchen

B.5.6 Etablierung von Kriterien zur Erkennung der Stabilität von Prüfsubstanzen in Testansätzen

entfällt

B.5.7 Etablierung von Kriterien zur Erkennung toxischer Wirkungen in Abbautestansätzen

entfällt

B.5.8 Festlegung geeigneter Testbedingungen

entfällt

B.5.9 Festlegung und Begründung der Wahl des Test- oder Kulturmediums

entfällt

B.5.10 Festlegung und Begründung der Wahl des gemessenen Effektes

Zur Beurteilung der toxischen Effekte im Sinne der Norm sind nach 48 h folgende Endpunkte abzu prüfen

- Koagulation (Bild 7): koagulierte Eier sind teilweise oder vollständig undurchsichtig. Die für die Normalentwicklung charakteristischen Strukturen sind ganz oder teilweise nicht mehr erkennbar.
- Somiten: Die segmentale Anordnung der Schwanzmuskulatur muss erkennbar sein. Die absolute Anzahl der Somiten ist nicht ausschlaggebend (Bild 2, Schemazeichnung)
- Schwanzablösung: Der Fortschritt der Schwanzablösung ist abhängig vom Entwicklungsstadium der sich entwickelnden Embryonen im Ei. Eine Ablösung muss klar zu erkennen sein. Der Grad der Ablösung ist unerheblich.
An die AK-Mitglieder wurde eine Abbildungsserie verschickt, auf deren Basis entschieden wurde, welches früheste Stadium zur Verdeutlichung einer eindeutigen Schwanzablösung als Abbildung aufzunehmen ist. Der sich entwickelnde Embryo im Ei muss nach 48 h dieses Stadium erreicht haben, damit das Kriterium "abgelöster Schwanz" erfüllt ist. Ein normal entwickelter Embryo nach 48 h ist in Bild 10, Punkt B.5 abgebildet.
- Herzschlag: Bei der Beobachtung und der Beurteilung des Parameters Herzschlag sind folgende Aspekte zu beachten. Ist innerhalb einer Beobachtungszeit von 30 sec kein Herzschlag erkennbar, gilt das Ei, bzw. der Embryo, als tot. Erläuterung: Voraussetzung für einen Blutkreislauf ist ein schlagendes Herz. Auf Grund der Lage der Eier in den Wells ist der Herzschlag gelegentlich schlecht erkennbar; als zusätzliches Kriterium kann der Blutkreislauf herangezogen werden, der häufig gut

im Schwanzwurzel-, Kopf- und Dottersackbereich sichtbar ist. Die Herzschlagfrequenz spielt für die Bewertung des Herzschlagparameters keine Rolle.

Während des Tests können weitere unterschiedliche Effekte auftreten, die jedoch für die Bewertung des Testergebnisses nicht berücksichtigt werden.

B.5.11 Vorsehen von Plausibilitätskontrollen und ggf. statistische Behandlung der Mess- und Kontrollwerte

B.6 Verfahrenskennndaten

Parameter	EC ₅₀ von 3,4-DCA	Mortalität
L	15	16
N	43	46
NAP in %	8,5	0,0
\bar{x}	3,31 mg/l	68 %
SI	0,289 mg/l	16,9 %
VI	8,7 %	25,0 %
SR	0,455 mg/l	24,0 %
VR	13,8%	35,0 %

L Anzahl der Laboratorien nach Ausreißereliminierung

N Anzahl der Analyseergebnisse nach Ausreißereliminierung

NAP Ausreißeranteil in Prozent

=

\bar{x} Gesamtmittelwert aller ausreißerfreien Analysenwerte im Ringversuch

SI Wiederholstandardabweichung

VI Wiederholvariationskoeffizient in %

SR Vergleichsstandardabweichung

VR Vergleichsvariationskoeffizient in %

Anlage 1 zum Validierungsprotokoll

1 Organisation der Ringversuche

UBA, FG III 3.6 (Pluta, Vogel, Rabau)

1.1 Durchführung der Ringversuche

Ermittlung der EC_{50} für die Referenzsubstanz 3,4-DCA, Ermittlung der Mortalität für eine vorgegebene Konzentration von 3,7 mg 3,4-DCA / L, Ermittlung des G_{EI} -Wertes einer behandelten Abwasserprobe.

1.2 Probenahme

6.6./7.6.2000, UBA III 3.6 (Gutsche, Vogel)

1.3 Versand der Proben

28.06.2000, UBA III 3.6 mit TNT

1.4 Teilnehmende Laboratorien am Ringtest (Lfd. Nr. 1 bis 17) und AK-Mitglieder (1 bis 27)

- | | |
|---|--|
| 1 Umweltbundesamt
Herr Dr. H.-J. Pluta, FG III 3.6
Versuchsfeld Marienfelde
Schichauweg 58
12307 Berlin | Tel.: 030 / 8903-4131
Fax: 030 / 8903-4152
e-mail: Hans-Juergen.Pluta@uba.de
Labor: Frau T. Wilkens, -4162 |
| 2 Staatl. Umweltamt Hagen
Herr Dipl. Biol. U. Schmieds
Labor
Feithstr. 150 B
58097 Hagen | Tel. 02331 / 8005-411
Fax: 02331 / 8005-33
e-mail: Ulrich.Schmieds@stua-ha.nrw.de
Labor: Siebeneich |
| 3 Landesamt für Wasserwirtschaft
Frau L. Portugall
Am Zollhafen 9
55020 Mainz | Tel.: 06131 / 63 01-33
Fax: 06131 / 63 01-48
e-mail: Liane.Portugall@www.rpl.de
Labor: Frau B. Hertel, -34 |
| 4 Bayer AG
Herr Prof. Dr. N. Caspers
Geb. W 15
Institut für Umweltanalyse
51368 Leverkusen | Tel.: 0214 / 305 74 21
Fax: 0214 / 306 17 09
e-mail: Norbert.Caspers.NC@bayer-ag.de
Labor: Frau Neuhahn
0214 / 30 22 060 |
| 5 Ruhrverband
Herr Dr. E. Nusch
Kronprinzenstr. 37
45128 Essen | Tel.: 0201 / 178 – 2810/2708
Fax: 0201 / 178 – 2705
e-mail: enu@ruhrverband.de
Labor: Hr. Vierhaus / Fr. Vogel: -2816 |
| 6 Niedersächsisches Landesamt für Ökologie
Herr Dr. B. Klein / Frau K. Müller
An der Scharlake 37
31135 Hildesheim | Tel.: 05121 / 509 - 638
Fax: 05121 / 509 - 196
e-mail: Karin.Mueller@nlloe.niedersachsen.de
Labor: Herr Schatte, -637 |

- 7 ECT Ökotoxikologie GmbH
Herr Dr. E. Bruns
Böttgerstr. 7-14
65439 Flörsheim
Tel.: 06145 / 95 64 30
Fax: 06145 / 95 64 99
e-mail: e-bruns@ect.de
- 8 TU Berlin, FB 7
Frau Fischer
Institut für Ökologie, FG Ökotoxikologie
Keplerstr. 4-6
10589 Berlin
Tel.: 030 / 31 42 59 06
Fax:
e-mail: pd.hansen@tu-berlin.de
Labor: Frau B. Fischer
- 9 Bayerisches Landesamt für
Wasserwirtschaft
Herr W. Kopf
Kaulbachstr. 37
80539 München
Tel.: 089 / 2180-3251
Fax: 089 / 2800-838
e-mail: willi.kopf@LfW.Bayern.de
Labor: Frau Heinrich
- 10 Universität Heidelberg
Herr Dr. T. Braunbeck
Zoologie I
Im Neuenheimer Feld 230
69120 Heidelberg
Tel.: 06221 / 54 56 68
Fax: 06221 / 54 61 62
e-mail: braunbeck@uz.uni-heidelberg.de
Labor: Herr Leist
- 11 Herr Prof. Dr. R. Nagel
TU Dresden
Institut für Hydrobiologie
01062 Dresden
Tel.: 0351 / 463 54 62
Fax:
e-mail: rnagel@rcs.urz.tu-dresden.de
Labor: Frau Brust
- 12 Institut für Gewässerökologie und
Binnenfischerei
Herr Dr. T. Meinelt
Abt. Fischzucht u. Fischpathologie
Müggelseedamm 301
12587 Berlin
Tel.: 030 / 64 19 05 60
Fax: 030 / 64 18 16 00
e-mail: Meinelt@IGB-Berlin.de
Labor: Frau A. Stüber
- 13 Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und
Ökotoxikologie
Herr Dr. C. Schäfers
Auf dem Aberg 1
57392 Schmallenberg
Tel.: 02972 / 302-270/265/248/343
Fax: 02972 / 302-319
e-mail: schaefers@iuct.fhg.de
Labor: Herr U. Boshof
- 14 Dr. Roth bioTEST
Biologisches Umweltlabor
Herr U. Biermann
Heinrich-Rau-Str. 39
04249 Leipzig
Tel.: 0341 / 42 90 308 (-309)
Fax: 0341 / 42 90 324
e-mail: dr.roth-biotest@t-online.de
- 15 Umweltbundesamt
Frau M. Pattard, FG IV 2.6
Versuchsfeld Marienfelde
Schichauweg 58
12307 Berlin
Tel.: 030 / 8903-4167
Fax: 030 / 8903-4200
e-mail: Monika.Pattard@uba.de
Labor: Frau I. Schmiedling -4165
- 16 Henkel KGaA
Herr Dr. T. Wind
VTB Ecology
40191 Düsseldorf
Tel.: 0211 / 797-9311
Fax: 0211 / 798-19311
e-mail: Thorsten.Wind@henkel.de
Labor: Frau Y. Özkabakcioglu
- 17 UFZ-Leipzig
Herr Dr. R. Altenburger
Chemische Ökotoxikologie
Permoser Str. 15
04318 Leipzig
Tel.: 0341 / 235 22 24
Fax: 0341 / 235 23 09
e-mail: ra@uoe.ufz.de
Labor: Frau Krüger, Herr Dorusch

- 18 Herr Dr. B. Allner
Hess. Landesanstalt für Umwelt
Technikum
Rheingastr. 186
65203 Wiesbaden
Tel.: 0611 / 69 39 326
Fax: 0611 / 69 39 328
e-mail: b.allner@hlfu.de
- 19 Herr Dr. D. Anwand
Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.
Varrentrappstr. 40-42
60486 Frankfurt/M.
Tel.: 069 / 7917-483
Fax: 069 / 7917-513
e-mail:
- 20 Frau Dr. Both
Landesamt für Umweltschutz
Sachsen-Anhalt
Reideburger Str. 47-49
06116 Halle / Saale
Tel.: 0345 / 52 40 664
Fax: 0345 / 52 40 160
e-mail:
- 21 ProTox
Herr Dr. U. Ensenbach
Hoechst Marion Roussel Deutschland
GmbH Mainzer Landstrasse 500
65795 Hattersheim
Tel.: 06190 / 807-286
Fax: 06190 / 807-354
e-mail: uwe.ensenbach@hmrag.de
- 22 Herr Dr. H.-J. Jatzek
BASF AG
DUU/00 - Z 570
67056 Ludwigshafen
Tel.: 0621 / 605 80 48
Fax: 0621 / 605 80 43
e-mail:
- 23 Frau Dr. S. Schmidt
Obmann DIN NAW IW1
ISO/TC 147; CEN/TC 230
Morsbroicher Str. 40
51375 Leverkusen
Tel.: 0214 / 850 59 63
Fax: 0214 / 850 59 64
e-mail: sibschi Schmidt@aol.com
- 24 Frau Dr. Deventer
Landesanstalt für Umweltschutz
Baden-Württemberg
Griesbachstr.3
76185 Karlsruhe
Tel.: 0721/983 - 1592
Fax:
e-mail:
- 25 Herr Dr. J. Hahn, AbtL. III 3
Umweltbundesamt
Versuchsfeld Marienfelde
Schichauweg 58
12307 Berlin
Tel.: 030 / 8903-4106
Fax: 030 / 8903-4200
e-mail: Juergen.Hahn@uba.de
- 26 Frau F. Vietoris
Landesumweltamt NRW
Dez. 224
Postfach 10 23 63
45023 Essen
Tel.: 0211 / 15 90 23 64
Fax: 0211 / 15 90 24 26
e-mail: Friederike.vietoris@lua.nrw.de
- 27 Frau Dr. B. von Danwitz
Landesumweltamt
Nordrhein-Westfalen
Postfach 10 23 63
45023 Essen
Tel.: 0211 / 15 90 23 49
Fax: 0211 / 15 90 24 26
e-mail: Brigitte.vondanwitz@lua.nrw.de

2 Auswertung der Ergebnisse

Fr. Dipl.-Ing. G. Donnevert, Fachhochschule Gießen-Friedberg, Fachbereich Mathematik, Naturwissenschaften, Informatik, Wiesenstr. 14, 35390 Gießen, Tel.: (0641) 309 23 34.

2.1 Statistische Auswertung der EC₅₀-Bestimmung

Parameter	EC ₅₀ von 3,4-DCA	Mortalität
L	15	16
N	42	46
NAP in %	8,7	0,0
\bar{x}	3,31 mg/l	68 %
SI	0,290 mg/l	16,9 %
VI	8,8 %	25,0 %
SR	0,460 mg/l	24,0 %
VR	13,9%	35,0 %

- L Anzahl der Laboratorien nach Ausreißereliminierung
N Anzahl der Analyseergebnisse nach Ausreißereliminierung
NAP Ausreißeranteil in Prozent
=
x Gesamtmittelwert aller ausreißerfreien Analysenwerte im Ringversuch
SI Wiederholstandardabweichung
VI Wiederholvariationskoeffizient in %
SR Vergleichsstandardabweichung
VR Vergleichsvariationskoeffizient in %

2.2

Auswertung der Verdünnungsreihen

G_{Ei} -Werte der Abwasserprobe

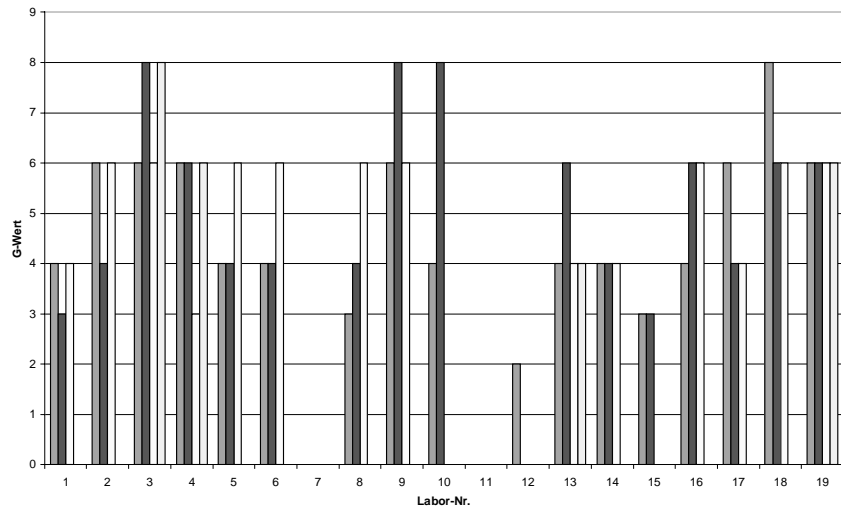


Bild 1: Einzelergebnisse der teilnehmenden Laboratorien

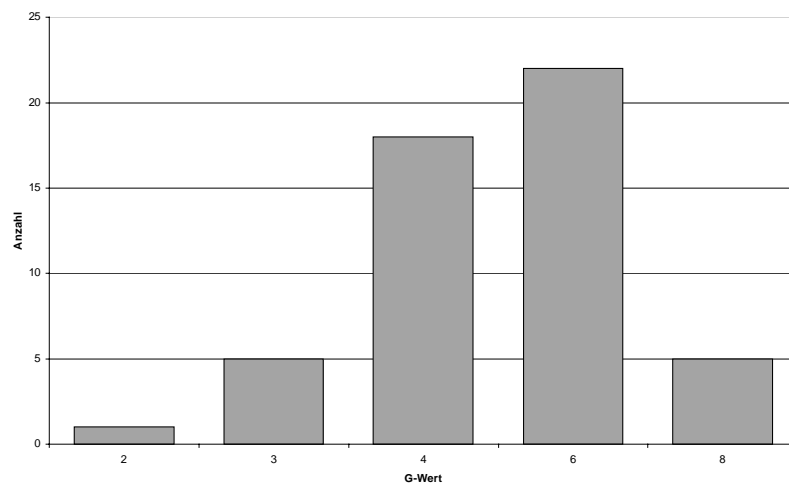


Bild 2: Häufigkeitsverteilung der G_{Ei} -Werte

Basistabelle der Einzelwerte

Datenerfassungsblatt Fischei-Ringtest, Proben vom 08.06.2000

Cod.-Nr.	Abwassertest			Referenzsubstanz			3,7 mg 3,4-DCA / L			Labor- kenn- blatt j/n	weitere Testergebnisse		
	G _{Ei}	G _{Ei}	G _{Ei}	EC ₅₀ [mg/L]	EC ₅₀ [mg/L]	EC ₅₀ [mg/L]	% Mort.	% Mort.	% Mort.		G _{Ei}	EC ₅₀ [mg/L]	% Mort.
1	4	3	4	3,24	2,74	4,09	70	90	20	j		3,29	80
2	6	4	6	3,8	1,4	3,5	40	80	80	j			
3	6	8	6	3,53	3,64	3,64	60	50	70	j	8	3,6	50
4	6	6	3	n.b.	2,62	3,08	90	90	80	j	6	3,45	100
5	4	4	6	3,58	3,03	3,73	60	60	50	j			
6	4	4	6	2,4	2,5	2,5	100	100	100	j			
7													
8	3	4	6	3,4	3,4	3,4	20	60	30	j			
9	6	8	6	3,6	3,4	3,6	50	60	40	j			
10	4	8		< 2,8	< 2,8	< 2,8	100	100	100	j			
11													
12	2	3	3	2,82	3,18		90	90		j			
13	4	6	4	3,61	3,35	3,74	50	60	50	j	4	3,19	80
14	4	4	4	3,4	2,9		70	90		j			
15	3	3		2,643	2,643		90	80		j			
16	4	6	6	3,8	3,8	3,4	40	40	70	j			70
17	6	4	4	3,3	3,1	3,8	70	*	20	j			
18	8	6	6	2,5			90			j			
19	6	6	6	3,83	3,83	3,9	*	*	*	n	6	4,3	*

Anlage 2 zum Validierungsprotokoll

Laborvergleichsuntersuchungen:

Im Verlauf der Normungsarbeit wurden "im Gelbdruckstadium" Laborvergleichsuntersuchungen mit verschiedenen Abwässern durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet

Probenversand: 15.02. - 19.02.1999

Vorinformationen: $G_F = 16-48$, vorgeschlagener Verdünnungsbereich $G = 8 - 48$

Labor	G_F	G_{Ei} (24 h)	G_{Ei} (48 h)	Aufarbeitung
UBA	16	8	12	März 1999
StUA Hagen	(32) geschwächte „Winterfische“		12	April 1999
TU Dresden	-		12	März 1999
Ruhrverband	16		8	März 1999
Uni Heidelberg	-	(32 / 16)	(32 / 24)	Februar 1999
TU Berlin	-	6 / 6	12 / 12	März 1999
Bay. LfW	-		16 / 16 / 12	April 1999
Bayer AG	16	12	12	März 1999
BASF	-	8	8	April 1999
LfW Mainz	24	8	12	April 1999
NLÖ	-	24	24	April 2000
ECT	-	- / 6	12 / 12	März 1999

Zusatzinformation:

$G_{Lemna\ minor} = 1$ (UBA); $G_{LB} = 12$ (UBA); $G_D = 8$ (LfW, München); $G_A = 32$ (LfW, München)

Probenversand: 21.02.2000

Vorinformationen: $G_x > 16$, $G_F > 32$, Informationen zur Charakterisierung der frischen Probe:
 $pH = 2,0$, $O_2 = 0,8 \text{ mg/L}$, $AOX = 15,4 \text{ mg/L}$, $TOC = 650 \text{ mg/L}$, $Cl^- = 0,77 \text{ g/L}$

Labor	G_F	G_{Ei} (24 h)	G_{Ei} (48 h)	Aufarbeitung
Bay. LfW	-		24 / 32 / 32	abgesetzte Probe ! April 2000
Bayer AG	64		32	Mai 2000
ECT	-	128	?	Feb./März 2000
IGB	-		96	März.2000
Lab. f. angew. Biol.	-		80 (96)	Feb./März 2000
LfW. Mainz	64		64 / 64	Feb./März 2000
NLÖ	-			Feb./März 2000
Ruhrverband	96		96	Februar 2000
StUA Hagen	(192) geschwächte "Winterfische"		96	Februar 2000
TU Berlin	-		256 / 256	Feb./März.2000
TU Dresden	-		192 / 192	März 2000
UBA	128	128	128 / 192 128 / 128	Februar 2000 März/April 2000
Uni Heidelberg	-	128 / 128 96 / 128	192 / 192 128 / 128	Feb./März 2000
Dr. U. Noack	-	-	80 / 64 80 / 80	März 2000

Zusatzinformation:

$G_{LB} = > 256$ (UBA); $G_D = 96$ (Noack)

- **Vergleichsdaten Fisch- / Fischei-Test aus Abwasseruntersuchungen:**

Probenversand: 15.02. - 19.02.1999

Vorinformationen: $G_F = 16-48$, vorgeschlagener Verdünnungsbereich $G = 8 - 48$

Labor	G_F	G_{Ei} (48 h)	Aufarbeitung
UBA	16	12	März 1999
StUA Hagen	(32) geschwächte „Winterfische“	12	April 1999
Ruhrverband	16	8	März 1999
Bayer AG	16	12	März 1999
LfW .Mainz	24	12	April 1999

Probenversand: 21.02.2000

Vorinformationen: $G_x > 16$, $G_F > 32$, Informationen zur Charakterisierung der frischen Probe:
pH = 2,0, $O_2 = 0,8$ mg/L, AOX = 15,4 mg/L, TOC = 650 mg/L, $Cl^- = 0,77$ g/L

Labor	G_F	G_{Ei} (48 h)	Aufarbeitung
Bayer AG	64	32	Mai 2000
LfW. Mainz	64	64 / 64	Feb./März 2000
Ruhrverband	96	96	Februar.2000
StUA Hagen	192	96	Februar 2000
UBA	128	128 / 192 128 / 128	Februar 2000 März/April 2000

Vergleich der Biotest-Ergebnisse von behandeltem Abwasser

Lfd. Nr.	Herkunft	Datum Aufarbeitung	G _F	G _{Ei}	G _{LB}	G _A
1	Keramik-Industrie	22.09.1998	1	1	1	1
2	Keramik-Industrie	16.09.1998	1	1	2	1
3	Keramik-Industrie	09.09.1998	2	1	6/8	1
4	Keramik-Industrie, Piezokeramik	06.10.1998	3	4	8	6
5	Keramik-Industrie, Isolatoren	29.09.1998	1	(1)	2	1
6	Deponie	13.10.1998	2	3	1	2
7	Deponie	13.10.1998	2	3	1	-
8	Deponie	02.11.1998	2	1	4	-
9	Deponie, Rohsickerwasser	20.10.1998	16	16	16	-
10	Deponie	27.10.1998	2	1	12	-
11	Sickerwasser, Kompostierung	18.11.1998	1	(1)	4	
12	Sickerwasser, Kompostierung	25.11.1998	1	1	12	
13	Komm. KA, Mikrofiltration	01.07.1997	1	1		
14	Komm. KA	24.06.1997	1	1		
15	HMV	12.02.1997	6	6	12	
16	HMV, Glas	19.02.1997	1	1	6	
17	HMV, Glas	05.03.1997	1	1	2	

Ringtestprobe Abwasser; 05.06.2000

Herkunft	G _F	G _{Ei}	CSB [mg/l]	pH	O ₂
Rohabwasser	32	32	2810	7,94	8,2
behandeltes Abwasser	4	6	818	8,01	8,3

Vergleich der Biotests mit dem Fischei-Test

(Daten der Bayerischen Landesanstalt für Wasserwirtschaft)

Branche	G _D	G _L	G _A	G _F	G _{Ei}
Siedlungsabfälle	8	8	24	16	12
Siedlungsabfälle	1	2	4	3	2
Siedlungsabfälle	2	1	3	8	<=3 ²⁾
Kraftwerk/Feuerungsanlage	48	1	2	3	>3 ²⁾
Siedlungsabfälle	6	1	4	4	4
Kraftwerk/Feuerungsanlage	8	3	48	4	3
Siedlungsabfälle	16	1	1024	6	6
Kraftwerk/Feuerungsanlage	32	1	12	3	2
Metallbe-/verarbeitung	48	2	24	6	4 ¹⁾
Metallbe-/verarbeitung	12	3	24	3	3
Metallbe-/verarbeitung	3	2	3	3	2 ¹⁾

¹⁾ fertige Verdünnung ca. 8 Tage im Brutschrank aufbewahrt

²⁾ zu wenig Probe vorhanden

Landesamt für Wasserwirtschaft, Rheinland-Pfalz, FG 56

Vergleich der Biotest-Ergebnisse von behandeltem Abwasser Rheinland-Pfalz, Stand 12/00

Lfd. Nr.	Herkunft	Datum	G _F	G _{Ei}	G _D	G _L	G _A
1	Chem. Industrie	2/99	2	1	1	4	1
2	Chem. Industrie	3/99	3	1	-	1	-
3	Chem. Industrie	3/99	2	1	-	2	-
4	Chem. Industrie	3/99	2	2	-	1	-
5	Chem. Industrie	3/99	2	1	1	24	1
6	Pharmazeut/ Chem. Industrie	4/99	2	2	-	1	-
7	Chem. Industrie	4/99	2	1	-	1	-
8	Nichteisenmetall- herstellung (Batterierecycling)	4/99	2	1	-	1	-
9	Chemische Industrie	5/99	2	2	1	2	1
10	Hersteller techn. Gase (Kühlwasser)	6/99	2	> 1	-	1	-
11	Speiseölhersteller	6/99	2	1	-	8	-
12	Speiseölhersteller	6/99	2	1	-	1	-
13	Chem. Industrie	7/99	2	1	-	1	-

Lfd. Nr.	Herkunft	Datum	G _F	G _{EI}	G _D	G _L	G _A
14	Chem. Industrie	9/99	2	1	-	1	-
15	Chem. Industrie	9/99	2	1	-	1	-
16	Chem. Industrie	9/99	2	2	1	6	1
17	Chem. Industrie	11/99	2	1	1	6	1
18	Chem. Industrie	11/99	2	1	-	6	-
19	Chem. Industrie	11/99	2	1	-	1	-
20	Chem. Industrie	12/992	2	1	2	6	1
21	Pharmazeut/ Chem. Industrie	12/99	2	1	-	1	-
Jahr 2000							
22	Chem. Industrie	1/00	2	1	1	1	1
23	Chem. Industrie	1/00	2	3	-	24	-
24	Pharmazeut/ Chem. Industrie	1/00	2	1	-	4	-
25	Chem. Industrie	1/00	2	1	-	1	-
26	Chem. Industrie	2/00	2	1	2	6	1
27	Chem. Industrie	3/00	2	1	-	1	-
28	Pharmazeut/ Chem. Industrie	3/00	2	1	-	3	-
29	Chem. Industrie	4/00	2	1	1	4	1
30	Chem. Industrie	4/00	2	1	-	4	-
31	Chem. Industrie	4/00	2	2	-	1	-
32	Chem. Industrie	5/00	2	1	1	1	1
33	Chem. Industrie	5/00	2	1	1	1	1
34	Chem. Industrie	6/00	2	1	1	6	1
35	Chem. Industrie	6/00	2	1	1	1	1
36	Chem. Industrie	6/00	2	1	1	1	1
37	Pharmazeut/ Chem. Industrie	6/00	2	2	-	1	1
38	Chem. Industrie	7/00	2	1	1	3	1
39	Chem. Industrie	7/00	2	1	1	1	1
40	Chem. Industrie	7/00	2	1	-	4	-
41	Herst techn.Gase(Kühlwa sser)	8/00	2	1	-	1	-
42	Chem.Industrie	9/00	2	1	1	1	1
43	Chem. Industrie	9/00	2	1	2	2	1
44	Chem. Industrie	9/00	2	1	4	6	4
45	Chem. Industrie	9/00	2	1	1	3	-
46	Chem. Industrie	9/00	2	1	1	3	1
47	Chem. Industrie	10/00	2	1	-	1	-
48	Chem. Industrie	12/00	2	1	1	2	
49	Chem. Industrie	12/00	2	1	1		

Weitere Daten aus dem Vollzug der Länder werden kontinuierlich ergänzt. Es liegen bereits Datensätze Nordrhein-Westfalen für verschiedene Abwasserbranchen vor.

- **Daten zur Ermittlung eines Korrekturfaktors für den "Salzfehler"**

Für den Einsatz des Fischei-Tests im abwasserrechtlichen Vollzug ist vorgesehen, in Analogie zum akuten Fischtest einen Salz-Korrekturfaktor zu ermitteln. Entsprechende Daten werden vom AK ermittelt und nach Abschluss der Untersuchungen in Tabellenform dargestellt. Die bisherigen Ergebnisse für Natriumchlorid und Natriumsulfat – jeweils bezogen auf das Anion – sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst dargestellt.

Mittelwerte für die EC10 auf Basis der bisher vorliegenden Daten

Anion	N	Mw	Stabw
Cl ⁻	13	3,91	0,48
SO ₄ ²⁻	12	9,59	1,26