

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungsbericht 299 25 261
UBA-FB 000508



**Validieren, Harmonisieren
und Implementieren eines
minimalen biologischen
Testsets zur Bewertung
mariner Wasser- und
Sedimentproben**

von

Dipl.- Biol. Carolin Peters
Dr. Wolfgang Ahlf

Technische Universität Hamburg-Harburg
Arbeitsbereich Umweltschutztechnik

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese TEXTE-Veröffentlichung kann bezogen werden bei

Vorauszahlung von 10,00 €

durch Post- bzw. Banküberweisung,
Verrechnungsscheck oder Zahlkarte auf das

Konto Nummer 4327 65 - 104 bei der
Postbank Berlin (BLZ 10010010)
Fa. Werbung und Vertrieb,
Wolframstraße 95-96,
12105 Berlin

Parallel zur Überweisung richten Sie bitte
eine schriftliche Bestellung mit Nennung
der **Texte-Nummer** sowie des **Namens**
und der **Anschrift des Bestellers** an die
Firma Werbung und Vertrieb.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr
für die Richtigkeit, die Genauigkeit und
Vollständigkeit der Angaben sowie für
die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in dem Bericht geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: 030/8903-0
Telex: 183 756
Telefax: 030/8903 2285
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet II 1.5
Dr. Rüdiger Berghahn

Berlin, Dezember 2003

BERICHTS-KENNBLETT

1. Berichtsnummer UBA-FB	2.	3.
4. Titel des Berichts Validieren, Harmonisieren und Implementieren eines minimalen biologischen Testsets zur Bewertung mariner Wasser- und Sedimentproben		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Peters, Carolin Ahlf, Wolfgang, Dr.		8. Abschlussdatum <div style="text-align: right;">31.12.02</div>
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Technische Universität Hamburg-Harburg Arbeitsbereich Umweltschutztechnik Eißendorfer Straße 40, 21073 Hamburg		9. Veröffentlichungsdatum
		10. UFOPLAN-Nr. <div style="text-align: right;">299 25 261</div>
		11. Seitenzahl <div style="text-align: right;">210</div>
		12. Literaturangaben <div style="text-align: right;">155</div>
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Bismarckplatz 1, 1493 Berlin		13. Tabellen und Diagramme <div style="text-align: right;">31</div>
15. Zusätzliche Angaben		14. Abbildungen <div style="text-align: right;">40</div>
16. Kurzfassung <p>Es wurde ein Biotest-Set zur Bewertung von Brackwasser- und Meerwasser-Sedimentproben (Baggergut) für die Umsetzung internationaler rechtlicher Anforderungen zum Schutz von Nordsee und Ostsee innerhalb Deutschlands bereitgestellt. Für eine Implementierung des Testsets im nationalen Umweltrecht war die Standardisierung der Testverfahren von erstrangiger Bedeutung. Deshalb wurde auf standardisierten Testverfahren aufgebaut und deren Anwendung auf Nordsee- und Ostsee-Sedimentproben weiterentwickelt, harmonisiert und validiert. Diese methodischen Entwicklungen mündeten unmittelbar in die nationale (DIN) und internationale (ISO) Standardisierung und stehen damit auch für weitere Anwendungen zum Schutz der Meeresumwelt vor Emissionen zur Verfügung.</p> <p>Es wurden zwei Tests für die Bewertung der wässrigen Phase der Meer- und Brackwasser-Sedimente (Eluate) (Leuchtbakterientest und mariner Algentest) und ein Gesamtsedimenttest (Amphipodentest) etabliert. Mit diesem Testset können akute und chronische Toxizität erfasst werden, wobei ein breites Spektrum an Beobachtungsgrößen – von Stoffwechselvorgängen, Verhaltensbeobachtungen bis zu integrierenden Parametern wie Reproduktion und Mortalität – erhoben wurde. Der Amphipode <i>Corophium volutator</i> wurde erstmals kontinuierlich über einen Zeitraum von einem Jahr zur Reproduktion unter Laborbedingungen gebracht. Damit wurde nicht nur ein kultivierter Testorganismus zur Verfügung gestellt (entgegen bisherigen Wildfängen), sondern auch die Basis für die Entwicklung eines chronischen Amphipodentests geschaffen.</p>		
17. Schlagwörter Biotest, Nordsee, Ostsee, Sedimentbewertung, Ecological Risk Assessment		
18. Preis	19.	20.

REPORT-COVER-SHEET

1. Report No. UBA-FB	2.	3.
4. Report Title Validation, harmonization and implementation of a base-set of bioassays for the assessment of brackish and marine sediment samples		
5. Author(s), Family Name(s), First Name(s) Peters, Carolin Ahlf, Wolfgang, Dr.		8. Report Date <div style="text-align: right;">31.12.02</div>
6. Performing Organisation (Name, Address) Technical University of Hamburg-Harburg Department of Environmental Science and Technology Eißendorfer Straße 40, 21073 Hamburg		9. Publication Date
		10. UFOPLAN-Ref. No. <div style="text-align: right;">299 25 261</div>
		11. No. of Pages <div style="text-align: right;">210</div>
		12. No. of References <div style="text-align: right;">155</div>
7. Sponsoring Agency (Name, Address) Umweltbundesamt, Bismarckplatz 1, 1493 Berlin		13. No. of Tables, Diag. <div style="text-align: right;">31</div>
		14. No. of Figures <div style="text-align: right;">40</div>
15. Supplementary Notes		
16. Abstract <p>A bioassay-battery for the ecotoxicological assessment of brackish and marine sediment samples (dredged material) was established within Germany and is ready for the implementation of international conventions for the protection of the North Sea and Baltic Sea. Standardisation is essential for the implementation of the test procedures in legislation. Therefore the bioassay-battery was based on standardised methods and was further developed, harmonized and validated for its application on North Sea and Baltic Sea sediment samples. The further development of the methods were directly implemented in the national (DIN) and international (ISO) standardization. Thus, the bioassay-battery is also available for further management of emissions for the protection of the marine environment.</p> <p>Two tests for the water phase of brackish and marine sediments (elutriates) (bacteria bioluminescence test and marine algae test) and a whole-sedimenttest (amphipod test) have been established. With this battery, acute and chronic toxicity can be detected and a broad spectrum of endpoints - physiological, behavioural (ethological) and integrating parameters like reproduction and mortality - are considered. For the first time, the amphipod <i>Corophium volutator</i> was continuously reproduced over a period of one year under laboratory conditions. Thus, a cultured test organism (instead of wild catch) is available and moreover, the development of a chronic amphipod test is possible.</p>		
17. Keywords bioassay, North Sea, Baltic Sea, sediment quality assessment, ecological risk assessment		
18. Price	19.	20.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Erläuterung der Abkürzungen.....	9
II. Abbildungsverzeichnis	10
III. Tabellenverzeichnis	12
1. Vorwort.....	15
2. Einleitung	15
2.1. Notwendigkeit der Implementierung eines marinen Biotest-Sets in Deutschland	15
2.2. Projektziele und die Projektstruktur	20
3. Das minimale Testset	24
3.1. Auswahlkriterien für das minimale Testset	24
3.1.1. Monospezies-Tests.....	25
3.1.2. Erfassung verschiedener Expositionspfade.....	25
3.1.3. Sensitiv gegenüber einem breitem Spektrum von Schadstoffen	25
3.1.4. Standardisierte Testverfahren (z.B. nach DIN, ISO)	26
3.1.5. Repräsentanten verschiedener Taxa und verschiedener trophischer Ebenen.....	26
3.1.6. Vorkommen der Testorganismen in Nordsee und Ostsee	27
3.1.7. Euryhaline Arten.....	27
3.1.8. Toleranz eines breiten Korngrößen – Spektrums	27
3.1.9. Praktikabilität im Verhältnis zur Aussagekraft	27
3.1.10. Tierethik	27
3.2. Vorstellung des minimalen Testsets	28
4. Allgemeine Hinweise zur Probenahme, Probenvorbereitung, Testdurchführung und Auswertung bei der Anwendung mariner Biotests auf Sedimente	32
5. Probenahme und Probenvorbereitung	35
5.1. Probenahme	35
5.2. Probenvorbereitung	35
5.2.1. Probenvorbereitung für den Gesamtsedimenttest	36
5.2.2. Probenvorbereitung für die Tests der wässrigen Phase.....	36
5.2.2.1. Stand der Forschung und Praxis	36
5.2.2.2. Herstellung von Meer- und Brackwasser- Eluaten.....	38

6. Testdurchführung und Auswertung	42
6.1. Der Leuchtbakterientest mit <i>Vibrio fischeri</i>	42
6.1.1. Kurze Methodenbeschreibung	42
6.1.2. Stand der Forschung	42
6.1.3. Anwendung auf Meer- und Brackwasser- Eluate	43
6.1.4. Modifikation des Leuchtbakterientests für Meer-/ Brackwasser-Eluate	44
6.1.5. Einsatz des modifizierten Leuchtbakterientests bei unterschiedlichen Salinitäten der Probe	47
6.1.6. Referenzsubstanzen für den modifizierten Leuchtbakterientest für Meer-/ Brackwasser	48
6.1.6.1. Kaliumdichromat.....	49
6.1.6.2. Zinksulfat.....	50
6.1.6.3. 3,5-Dichlorphenol	52
6.1.7. Validierung des Meer-/ Brackwasser-Leuchtbakterientests: Ringtest mit 3,5- Dichlorphenol.....	52
6.1.7.1. Ringtest Aufbau und Durchführung:.....	52
6.1.7.2. Ringtest Ergebnisse:	55
6.1.7.3. Diskussion der Ringtest Ergebnisse	59
6.1.8. Implementierung: Meer-/ Brackwasser-Modifikation des Leuchtbakterientests als informativen Annex der ISO Norm	61
6.2. Der marine Algentest mit <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	62
6.2.1. Kurze Methodenbeschreibung	62
6.2.2. Stand der Forschung und Standardisierung	62
6.2.3. Etablierung des marinen Algentests	63
6.2.4. Salinitätstoleranz von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	67
6.2.5. Anwendung auf Meer- und Brackwasser-Eluate.....	68
6.2.6. Referenzsubstanzen.....	71
6.2.7. Validierung an Nordsee und Ostsee Eluaten	74
6.2.8. Implementierung: Revision ISO 10253 mariner Algentest	74

6.3.	Der akute Amphipodentest mit <i>Corophium volutator</i>	75
6.3.1.	Kurze Methodenbeschreibung	75
6.3.2.	Stand der Forschung und Standardisierung	75
6.3.3.	Internationale Kooperation	77
6.3.4.	Beschaffung der Testorganismen	77
6.3.5.	Taxonomie: Unterscheidung <i>Corophium volutator</i> / <i>C. arenarium</i>	81
6.3.6.	Künstliches Meerwasser	81
6.3.7.	Natürliches Kontrollsediment/ Referenzsediment.....	83
6.3.8.	Synthetisches Kontrollsediment.....	84
6.3.9.	Referenzsubstanz - Tests mit dotiertem Sediment.....	87
6.3.10.	BEQUALM-Ringtest mit Bioban dotiertem Sediment.....	90
6.3.11.	BEQUALM-Ringtest mit Ivermectin dotiertem Sediment.....	93
6.3.12.	Ammoniumchlorid als Referenzsubstanz.....	101
6.3.13.	Tests mit Meer-/ Brackwasser-Sedimenten.....	103
6.3.14.	Implementierung des akuten Amphipodentests.....	103
6.3.14.1.	Short Course	103
6.3.14.2.	Gemeinsame Probenahme zur Beschaffung von <i>Corophium volutator</i>	104
6.4.	Kultivierung und Reproduktion von <i>Corophium volutator</i> im Labor	105
6.4.1.	Fütterungsversuch mit <i>C. volutator</i>	106
6.4.2.	Lebenszyklus von <i>Corophium volutator</i>	107
6.4.3.	Versuchsaufbau: Kultivierung und Reproduktion von <i>C. volutator</i> im Labor	110
6.4.4.	Ergebnisse und Diskussion der <i>C. volutator</i> Reproduktionsversuche im Labor	115
6.4.5.	Empfehlungen für eine kontinuierliche Reproduktion von <i>Corophium volutator</i> im Labor	121
6.4.6.	Validierung der Sensitivität von gezüchteten <i>Corophium volutator</i>	122
6.4.7.	Parasiten	123
6.4.8.	Implikationen der Reproduktionserfolge mit <i>C. volutator</i> im Labor für die Implementierung des Amphipodentests.....	124

7. Validierung des Testsets an Nordsee- und Ostsee- Sedimentproben.....	125
7.1. Vor-Ringtest: Validierung des Testsets an Nordsee- und Ostsee- Sedimenten.....	125
7.1.1. Aufbau und Durchführung	125
7.1.2. Ergebnisse und Diskussion des Vor-Ringtests	128
7.1.2.1. Physikalische Sedimenteigenschaften.....	128
7.1.2.2. Ergebnisse des Testsets.....	128
7.1.2.3. Ergebnisse der chemischen Analyse.....	134
7.1.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse des Vor-Ringtests	136
7.2. Ringtest zur Validierung des Testsets auf natürliche Sedimente	137
7.2.1. Aufbau und Durchführung des Ringtests	137
7.2.2. Ringtest-Ergebnisse und Diskussion	140
7.2.2.1. Physikalische Sedimenteigenschaften.....	140
7.2.2.2. Ringtest-Ergebnisse des Testsets.....	141
7.2.2.3. Ringtest-Ergebnisse der chemischen Sedimentanalyse	147
7.2.2.4. Zusammenfassung der Ringtest-Ergebnisse	152
7.3. Einsatz des Testsets auf weitere Sedimente der Nordsee und Ostsee	153
8. Bilanz: Validieren, Harmonisieren und Implementieren eines minimalen biologischen Testsets zur Bewertung von Brack- und Meerwasser – Sedimentproben.....	155
9. Ausblick	158
9.1. Optimierung und Weiterentwicklung des minimalen Testsets	158
9.1.1. Meer-/ Brackwasser Algentest.....	158
9.1.2. Akuter Amphipodentest.....	158
9.2. Anwendung des Testsets und Prüfung der Ergebnisse auf Redundanz und Komplementarität.....	159
9.3. Entwicklung neuer mariner Gesamtsedimenttests	160
9.4. Europäische Harmonisierung bezüglich der Erhebung und der Bewertung der marinen Sedimentqualität.....	161
9.5. Implementierung des marinen Biotest-Sets für weiteres Emissionsmanagement	162
10. Zusammenfassung	163
11. Literaturverzeichnis	167
Anhang, Materialien.....	184

I. ERLÄUTERUNG DER ABKÜRZUNGEN

ABW	Künstliches/ Synthetisches Brackwasser (<i>Artificial Brackish Water</i>)
ASW	Künstliches/ Synthetisches Meerwasser (<i>Artificial Sea Water</i>)
BEQUALM	EU-Projekt: <i>Biological Effects Quality Assurance in Monitoring</i>
BFA-Fisch	Bundesforschungsanstalt für Fischerei – Institut für Fischereiökologie (Hamburg)
BfG	Bundesanstalt für Gewässerkunde (Berlin)
BSH	Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrographie (Hamburg)
CEFAS	Center for Environment Fisheries and Aquaculture Science, Burnham Laboratory, Großbritannien
CEN	Europäisches Komitee für Normung
DIN	Deutsches Institut für Normierung e.V.
DMU	National Environmental Research Institute of Denmark (auch NERI)
Environment Canada	Environment Canada, Method Development and Application Section, Ontario, Canada
HABAK-WSV	Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Küstenbereich (BfG 1999)
HELCOM	Kommission des Helsinki Übereinkommens zum Schutz der Ostsee (Abkürzung des Übereinkommens: HELCON)
ISO	Internationale Standardisierungsorganisation (weltweit)
LB	Leuchtbakterien
NLÖ	Niedersächsisches Landesamt für Ökologie
OSPARCOM	Kommission des Oslo und Paris Übereinkommens zum Schutz des Nordostatlantiks (Abkürzung des Übereinkommens: OSPARCON)
RIKZ	National Institute for Coastal and Marine Management, Niederlanden
RW 1	Richtwert 1 der HABAK-WSV
S	Salinität (<i>Practical Salinity</i>) Die Salinität ist definiert als <i>Practical Salinity</i> (UNESCO 1978): “ <i>The practical salinity, symbol S, of a sample of sea water, is defined in terms of the ratio K of the electrical conductivity of a sea water sample of 15°C and the pressure of one standard atmosphere, to that of a potassium chloride (KCl) solution, in which the mass fraction of KCl is 0.0324356, at the same temperature and pressure.</i> ” Die Salinität ist als ein Verhältnis definiert und hat somit keine Einheit. (Der alte Wert 35 ‰ entspricht S 35) (s. a. ISO 6107 Teil 2 (1997)). Die Salinität wurde im Rahmen des Projekts mit einem Leitfähigkeitsmessgerät und einem Refraktometer gemessen.
TNO-MEP	Marine Department of TNO, Den Helder, Niederlanden
TUHH	Technische Universität Hamburg-Harburg
WRRL	EC-Wasserrahmenrichtlinie

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Notwendigkeit der Implementierung eines minimalen Biotest-Sets in Deutschland	18
Abb. 2: Besonderheiten der Schadstoffwirkung im marinen Ökosystem im Vergleich zum limnischen	20
Abb. 3: Ziele des Projekts	21
Abb. 4: Funktion und Struktur des DIN AK 5.3 Marine Biotests	22
Abb. 5: Einbindung des Projekts in die nationale und internationale Standardisierung	23
Abb. 6: Auswahlkriterien für die Zusammenstellung des marinen Biotest-Sets ...	24
Abb. 7: Das minimale marine Biotest-Set	28
Abb. 8: Anwendungsbereiche des marinen Biotest-Sets differenziert nach dem Testmedium	32
Abb. 9: Schematische Methodenübersicht bei der Anwendung des Biotest-Sets auf Sedimente	34
Abb. 10: Vergleich Leuchtbakterientest-Ergebnisse derselben Ostsee-Eluate nach DIN EN ISO und nach der Brackwasser-Modifikation	46
Abb. 11: Salinitätstoleranz des modifizierten Leuchtbakterientests	47
Abb. 12: Wachstum von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> bei unterschiedlicher Salinität	67
Abb. 13: Wachstumskurven <i>Phaeodactylum tricornutum</i> in der Kontrolle u. in der Konzentrationsreihe 3,5 DCP bei S 20 u. 31 (Erlenmeyerkolben)	72
Abb. 14: Wachstumskurven <i>Phaeodactylum tricornutum</i> in der Kontrolle u. in der Konzentrationsreihe 3,5 DCP bei S 20 u. 31 (Mikrotiterplatte)	73
Abb. 15: Labor-EC ₅₀ -Werte für den <i>Corophium</i> BEQUALM-Ringtest-1 mit Bioban	92
Abb. 16: Dosis-Wirkungskurven für den <i>Corophium</i> BEQUALM-Ringtest-1 mit Bioban	93
Abb. 17: Labor-EC ₅₀ -Werte für den <i>Corophium</i> BEQUALM-Ringtest-2 mit Ivermectin als Referenzsubstanz	96
Abb. 18: Dosis-Wirkungskurven für den <i>Corophium</i> BEQUALM-Ringtest-2 mit Ivermectin	97
Abb. 19: Labor-Mittelwerte der 1. unbekannten Probe für <i>Corophium</i> BEQUALM-Ringtest-2 mit Ivermectin als Referenzsubstanz	99
Abb. 20: Labor-Mittelwerte der 2. unbekannten Probe für <i>Corophium</i> BEQUALM-Ringtest-2 mit Ivermectin als Referenzsubstanz	100
Abb. 21: Schematischer Lebenszyklus von <i>Corophium volutator</i> im Freiland	108
Abb. 22: Versuchsdurchführung <i>Corophium</i> Reproduktion bezogen auf den Jahresverlauf	114
Abb. 23: Schematische Übersicht über die Versuchs-Ansätze zur Reproduktion von <i>Corophium volutator</i>	115
Abb. 24: Anzahl der Nachkommen im A-Ansatz (G1) Bilanz 1 bei 15° C, 19° C und 23°C	116

Abb. 25: Längen-Häufigkeitsverteilung der Nachkommen des A-Ansatzes Bilanz 1 und 2 bei 15°C, 19°C und 23°C	119
Abb. 26: Längen-Häufigkeitsverteilung der Nachkommen des B-Ansatzes Bilanz 1 und 2 bei 15°C, 19°C und 23°C	120
Abb. 27: Stationskarte der Ostsee-Sedimentproben (Gauss 371).	126
Abb. 28: Stationskarte der Nordsee-Sedimentproben (WHIII 231).....	127
Abb. 29: Testergebnisse der Ostsee- und Nordseesedimentproben (Eluate) im Brack-/ Meerwasser-Leuchtbakterientest (Vor-Ringtest)	129
Abb. 30: Testergebnisse der Ostsee- und Nordseesedimentproben (Eluate) im Brack-/ Meerwasser-Algentest (Vor-Ringtest)	131
Abb. 31: Testergebnisse der Ostsee- und Nordseesedimentproben im akuten Amphipodentest	132
Abb. 32: Chemische Analyse der Vor-Ringtest-Sedimentproben und RW1	135
Abb. 33: Stationskarte: Ringtest- Probenahmestellen auf Norderney	139
Abb. 34: Ringtest-Ergebnisse des Meerwasser-Leuchtbakterientests	142
Abb. 35: Ringtest-Ergebnisse des im marinen Algentests	143
Abb. 36: Ringtest-Ergebnisse des Amphipodentest.....	145
Abb. 37: Gesamt-Darstellung der Schadstoffbelastung der Ringtest- Sedimentproben im Vergleich zum RW 1 der HABAK-WSV	150
Abb. 38: Schadstoffbelastung der Ringtest-Sedimentproben im Vergleich zum RW1	151
Abb. 39: Bilanz der Implementierung des minimalen Biotest-Sets	155
Abb. 40: Nationale und internationale Projekt-(Re-)Präsentationen.....	157

III. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Künstliches Meerwasser (ASW) und künstliches Brackwasser (ABW)	40
Tab. 2: Zusammensetzung der Nährmedien des Leuchtbakterientests, künstlichem Brackwasser (ABW), künstlichem (ASW) u. natürlichem Meerwasser	44
Tab. 3: Vergleich der Standard Testdurchführung und der Brackwasser- und Meerwasser-Modifikation	45
Tab. 4: Ermittelte EC ₅₀ -Werte für Cr ⁶⁺ für flüssig getrocknete Leuchtbakterien ...	49
Tab. 5: Mittlerer EC ₅₀ -Wert und Präzisionsdaten für Zink mit flüssig getrockneten Leuchtbakterien	50
Tab. 6: Mittlerer EC ₅₀ -Wert und Präzisionsdaten für Zink mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien	51
Tab. 7: Mittlerer EC ₅₀ -Wert und Präzisionsdaten für Zink mit frisch gezüchteten Leuchtbakterien	51
Tab. 8: Übersicht Leuchtbakterientestverfahren des Ringtests	53
Tab. 9: Übersicht über die vier Tests des Ringtests	54
Tab. 10: Anzahl am Ringtest beteiligter Laboratorien und Anzahl der Datensätze	54
Tab. 11: Ringtest Präzisionsdaten für flüssig getrocknete Leuchtbakterien	56
Tab. 12: Ringtest Präzisionsdaten für gefriergetrocknete Leuchtbakterien.....	57
Tab. 13: Präzisionsdaten für frisch gezüchtete Leuchtbakterien	58
Tab. 14: Pipettierschema für den miniaturisierten marinen Algentest.....	69
Tab. 15: Brackwasser- und Meerwasser-Modifikation des marinen Algentests	70
Tab. 16: Vergleich Richtwert 1 für Schwermetalle mit BLMP-Monitoring Daten Norderney (1998) und Sediment-Analysedaten der <i>Corophium</i> -Probenahmestelle (Kontrollsediment)	79
Tab. 17: Vergleich Richtwert 1 für organischen Schadstoffe und des BLABAK-TBT Konzepts mit den BLMP-Monitoring Daten Norderney (1998) und Sediment-Analysedaten der <i>Corophium</i> -Probenahmestelle	80
Tab. 18: Zusammensetzung des Meersalz der Fa. Sigma Aldrich Chemie	82
Tab. 19: Gegenüberstellung der Kontrollsedimenteigenschaften: OSPAR-Ringtest-Richtlinie, Norderneyer Kontrollsediment und Kontrollsedimente der OSPAR-Ringtest Teilnehmer 1993	88
Tab. 20: <i>Corophium</i> BEQUALM Ringtest 1 (Bioban) und 2 (Ivermectin)	95
Tab. 21: Vergleich der erwarteten und erzielten Effekte der unbekannten Konzentrationen in Ringtest 1 (Bioban) und Ringtest 2 (Ivermectin).....	98
Tab. 22: Übersicht über den Versuchsaufbau zur Kultivierung und Reproduktion von <i>C. volutator</i>	111
Tab. 23: Besatz in den beiden Ansätzen A und B zu Versuchsbeginn	112
Tab. 24: Übersicht über die TeilnehmerInnen und Biotests des ersten Ringtests an Nordsee- und Ostsee-Sedimenten.....	125
Tab. 25: Probenahmestationen und Sedimenteigenschaften.....	128
Tab. 26: Ringtestteilnehmer	138

Tab. 27: Probenahmestationen und Sedimenteigenschaften.....	140
Tab. 28: Schwermetallkonzentration der Ringtest-Sedimentproben im Vergleich zum RW 1	147
Tab. 29: Konzentration der organischen Schadstoffe der Ringtest-Sedimentproben im Vergleich zum RW 1	148
Tab. 30: Konzentration der Nährstoffe der Ringtest-Sedimentproben im Vergleich zum RW 1	149
Tab. 31: Übersicht über Sedimentproben, in denen durch mindestens eines der marinen Testverfahren ein signifikant toxischer Effekt nachgewiesen wurde.....	153

1. Vorwort

Ziel des Projekts war es, ein Biotest-Set zur Bewertung von Brackwasser- und Meerwasser-Sedimentproben innerhalb Deutschlands für die Umsetzung internationaler rechtlicher Anforderungen bereitzustellen. Um diesem dringenden Erfordernis zumindest in den Grundanforderungen nachzukommen, wurde das Projekt anwendungsorientiert bearbeitet. Für eine Implementierung des Testsets im nationalen Umweltrecht war die Standardisierung der Testverfahren von erstrangiger Bedeutung. Deshalb wurde das Projekt in enger Zusammenarbeit mit dem nationalen Standardisierungsgremium, dem DIN Arbeitskreis „Marine Biotests“ und der internationalen Standardisierungsorganisation (ISO/ TC 147 „Water quality“) durchgeführt.

An der TUHH haben neben den Autoren folgende Mitarbeiterinnen an dem Projekt mitgewirkt: Dipl.-Biol. Kristina Barz, Kristin Rosenkranz, Silke Hardtke, Dipl.-Biol. Ulrike Mayer und Irene Brauer (Schwermetallanalyse) sowie MitarbeiterInnen der Service-Abteilungen der TUHH (u.a. Elektrowerkstatt und Zentrallabor).

2. Einleitung

2.1. Notwendigkeit der Implementierung eines marinen Biotest-Sets in Deutschland

Um die Qualität von Meerwasser und marinen Sedimenten hinsichtlich ihres toxischen Potentials bewerten zu können, ist der Einsatz mariner Biotests erforderlich (Hill et al. 1993; Chapman 1992). Deshalb sind marine Biotestverfahren auch in internationalen Richtlinien zum Monitoring der Meeresumwelt (u.a. OSPARCOM 1997) (Abb. 1) vorgesehen.

Biotests sind biologische Testverfahren, bei denen Organismen in definierter Art und Anzahl eingesetzt werden, um deren Reaktion auf eine Exposition zu

messen (Fent 1998). Mit keiner chemischen Analyse kann die Sedimenttoxizität zuverlässig vorhergesagt werden (O'Connor & Paul 2000), da über die Bioverfügbarkeit und Wechselwirkung der Schadstoffe in der Umwelt und im Organismus bisher zu wenig bekannt ist. Mit biologischen Testverfahren erfolgt eine integrierte Erfassung des toxischen Potentials, während bei chemischen Schadstoff-Analysen des Meerwassers und der Sedimente immer nur eine im Vorfeld festgelegte Auswahl von Substanzen identifiziert werden kann - vorausgesetzt die Konzentrationen liegen oberhalb der Nachweisgrenze.

Darüber hinaus sind marine Biotests auch für die Festlegung von Qualitätskriterien für marine Sedimente erforderlich (Hill et al. 1993; Ahlf & Förstner 2001). So sieht die EU-Wasserrahmenrichtlinie (WRRL) zur Festlegung von Qualitätszielen für die marine Umwelt (Wasser, Sediment oder Biota) bei prioritären Substanzen auch marine Biotests vor (Peters 2000) (Abb. 1).

Sowohl das Monitoring als auch die Festlegung von Qualitätszielen sind immissionsseitige Instrumente zum Schutz der Meeresumwelt. Diese sind jedoch aufgrund der Komplexität des marinen Ökosystems als alleinige Instrumente nicht ausreichend. Es ist allgemein anerkannt, dass zum Meeresumweltschutz auch emissionsseitige Maßnahmen erforderlich sind (u.a. HELCOM, OSPARCOM, WRRL).

Für den Schutz von Nord- und Ostsee vor schädlichen Emissionen ist die Anwendung mariner Biotests zwingend erforderlich. Sie stellen einen elementaren Baustein für die ökologische Risikobewertung (*Ecological Risk Assessment (ERA)*) und das daraus abgeleitete Risikomanagement (*Risk Management*) dar.

Der Begriff Emission umfasst Einzelsubstanzen und Schadstoffgemische auf unterschiedlichen Trägermedien (*Carrier*). Auch Baggergut kann unter den

Begriff Emission subsumiert werden: Die Erfassung der Sedimentqualität ist zunächst eine Immissionsanalyse, doch der Umgang mit dem Baggergut, die Risikoabschätzung einer Verbringung des Baggerguts ins Meer, entspricht einem Emissionsmanagement. Das Trägermedium, das unbelastete Sediment, ist eine natürliche Ressource, deren Rückführung in das natürliche System angestrebt ist.

Die Notwendigkeit der Anwendung eines marinen Biotest-Sets für die Charakterisierung des toxischen Potentials des marinen Baggerguts als Basis für ein *Ecological Risk Assessment* und *Risk Management* ist anerkannt (u.a. ICES 2000; IOC - UNEP - IMO 1999; Pedersen et al. 1998) und wurde deshalb auch in Richtlinien zum Baggergut-Management im Rahmen der völkerrechtlichen Übereinkommen zum Schutz der Meeresumwelt (OSPARCON, HELCON und der London Konvention (LC)) gefordert (Peters 2001a). Die internationalen Richtlinien sehen ein marines Testset vor, mit dem sowohl akute als auch chronische Toxizität erfasst wird (HELCOM 1992; PIANC 1997, 1998; OSPARCOM 1998; IDAC/ CEDA 1999; LC 2000).

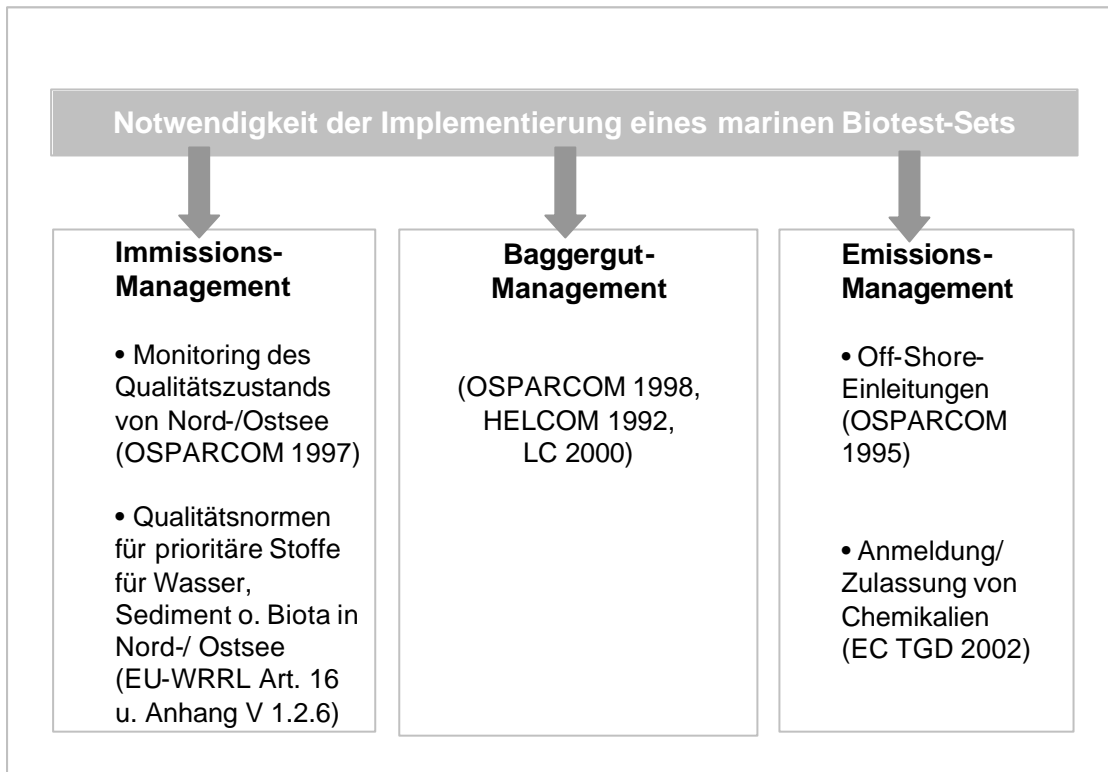


Abb. 1: Notwendigkeit der Implementierung eines minimalen Biotest-Sets in Deutschland

Das Baggergut-Management liegt in Deutschland in der Zuständigkeit des Bundes und der Länder, die bisher kein national einheitliches Baggergut-Management-Konzept für Deutschland erarbeitet haben (Peters 2001b). Aufgrund des nationalen Forschungs- und Erfahrungsrückstands bezüglich der Etablierung, Harmonisierung und Validierung mariner Biotestverfahren für die Sedimentbewertung wurden marine Biotests in den bisherigen nationalen Baggergut-Richtlinien nicht oder nur in geringem Umfang berücksichtigt. So wird nach der Baggergut-Richtlinie des Bundes - Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Küstenbereich (HABAK-WSV) (BfG 1999) - routinemäßig nur der Leuchtbakterientest angewendet. Weitere marine Testverfahren werden im Einzelfall herangezogen, gehören jedoch aufgrund mangelnder Standardisierung nicht zur Routine-Untersuchung (BfG 1999).

Langjährige Erfahrung mit dem Einsatz mariner Biotests zur Sediment-/Baggergutbewertung bestehen in Nordamerika (z.B. Environment Canada 1992; Lotufo et al. 2000; Carr et al. 2001), aber auch innerhalb Europas gewinnen sie hierfür an Bedeutung (z.B. Brils et al. 2000, Niederlande; Heijerick et al. 2000, Belgien; Thain et al. 2000, Großbritannien).

Ziel dieses Projekts war es, diesen im internationalen Vergleich bestehenden Rückstand aufzuholen und ein minimales marines Biotest-Set für die Bewertung mariner Wasser- und Sedimentproben deutschlandweit zu etablieren, zu harmonisieren und seine Anwendung auf Ostsee- und Nordseesedimente zu validieren. Die methodische Implementierung ist eine Voraussetzung für eine Berücksichtigung der marinen Biotestverfahren im nationalen Umweltrecht.

Dies ist auch im Hinblick auf die Anwendung des marinen Biotest-Sets für weiteres Emissionsmanagement wie z.B. für das Einleiten von Abwasser (*Whole-Effluent Assessment*) und für das Stoffstrommanagement zum Schutz von Nordsee und Ostsee von herausragender Bedeutung, dessen Notwendigkeit auch von der Europäischen Kommission gesehen wurde. So wurde das *Ecological Risk Assessment* der EU im Rahmen der Stoffprüfung um ein *Marine Ecological Risk Assessment* erweitert, in dem auch marine Biotests vorgesehen sind (EU TGD 2002).

Es liegt auf der Hand, dass Süßwasserbiotests aufgrund der für die limnischen Testorganismen zumeist tödlichen Salinität nicht für die Bewertung von marinen Sedimentproben herangezogen werden können. Aber auch bei der Stoffbewertung im Rahmen der Chemikalienzulassung/-anmeldung ist eine Extrapolation von Süßwassertoxizitätsdaten für das Marine Ecological Risk Assessment (ECETOC 2001; EU TGD 2002) kritisch zu betrachten (Hall & Anderson 1995; BUA 1999; Wheeler et al. 2002), denn das marine Ökosystem weist bezüglich der Schadstoffwirkung im Vergleich zum limnischen Ökosystem eine Vielzahl von Besonderheiten auf (Ahrens 2002) (siehe Abb. 2).

Besonderheiten der Schadstoffwirkung im marinen Ökosystem

- ultimative „Senke“ für eingetragene Stoffe,
- verzögerter Abbau außerhalb der Ästuar- und unmittelbaren Küstengewässer,
- die Bioverfügbarkeit ist im marinen Milieu anders als im limnischen (u.a. pH-Wert, Komplexierung aufgrund Salinität),
- Sensitivität mariner Organismen anders als Süßwasserorganismen (Hall & Andersson 1995),
- Meerwasserfauna hat eine höhere Biodiversität (ECETOC 2001),
- 15 exklusiv marine Metazoa Phyla (EC TGD 2002),
- komplexeres Nahrungsnetz,
- Wirkungen zeitverzögert und emissionsfern,
- Akkumulation in Biota und Nahrungskette,
- chronische Wirkung auf marine Spezies nicht vorhersagbar.

(nach Ahrens 2002, ergänzt)

Abb. 2: Besonderheiten der Schadstoffwirkung im marinen Ökosystem im Vergleich zum limnischen

2.2. Projektziele und die Projektstruktur

Ziel des Projekts war es, eine marine Biotestkombination für die Bewertung von Brackwasser- und Meerwasser-Sedimentproben innerhalb Deutschlands zu implementieren. Aufgrund des dringenden Bedarfs mariner Biotests sollte zunächst eine Mindestausstattung für ein Biotest-Set bereitgestellt werden. Das Projekt war in folgende Etappen-Ziele unterteilt (Abb. 3):

➤ Etablieren

Es war ein minimales marines Biotest-Set zur Bewertung mariner Wasser- und Sedimentproben für die marine Umwelt innerhalb Deutschlands zu etablieren. Der parallele Aufbau neuer Methoden an mehreren nationalen Instituten erforderte eine enge Kooperation.

➤ Validieren

Zunächst wurde jedes einzelne Testverfahren auf seine Eignung zur Bewertung von Ostsee- und Nordseesedimentproben hinsichtlich folgender Fragestellungen überprüft:

1. Liefert jedes Verfahren laborübergreifend reproduzierbare Ergebnisse?
2. Gibt es Störfaktoren, die zu falsch positiven oder falsch negativen Testergebnissen führen?

Im darauf folgenden Schritt wurde die Validität des Testsets zur Bewertung von Brack- und Meerwassersedimenten anhand folgender Fragen geprüft:

1. Ergänzen sich die Testergebnisse schlüssig?
2. Sind die Ergebnisse der einzelnen Verfahren redundant?
3. Werden bestimmte Informationen nicht erfasst?

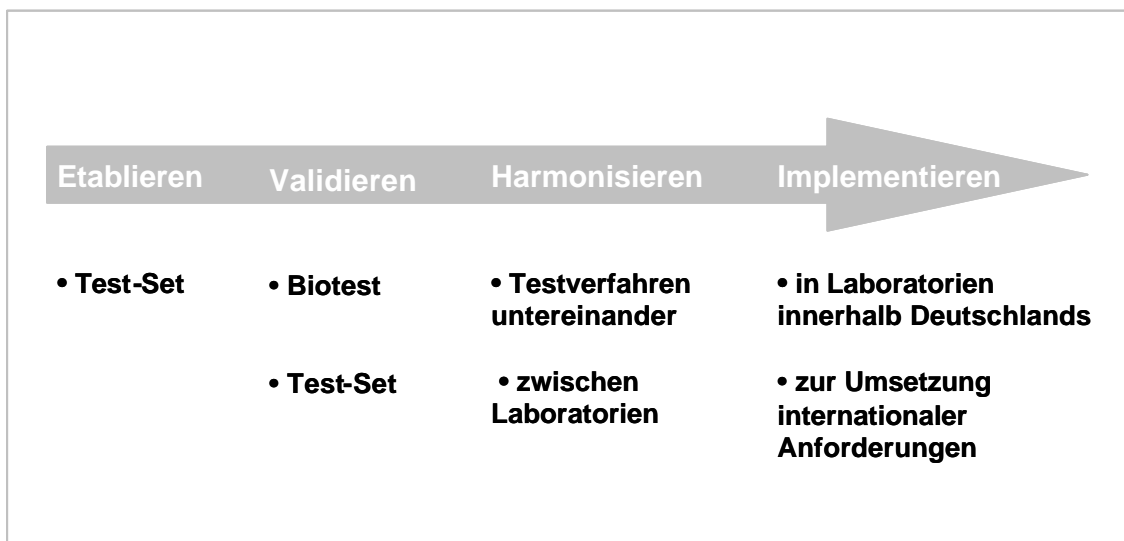


Abb. 3: Ziele des Projekts

➤ Harmonisieren

Eine Harmonisierung fand auf zwei Ebenen statt: Erstens wurden die biologischen Testverfahren untereinander harmonisiert. Dies betraf u.a. die Probenvorbereitung und den Einsatz von künstlichem Meer- und Brackwasser. Zweitens wurde eine Harmonisierung zwischen den Laboratorien vorgenommen. So wurde die Probenahme, Probenvorbereitung, Testdurchführung und Auswertung vereinheitlicht, um sowohl die Qualität als auch die Vergleichbarkeit der Testergebnisse zu sichern.

➤ Implementieren

Zur Prüfung der Validität der Biotests und zur methodischen Implementierung des Testsets innerhalb Deutschlands wurden im Rahmen des Projekts Ringtests durchgeführt. Mit dieser nationalen Implementierung von naturwissenschaftlicher Seite sollte angesichts der international fortschreitenden Entwicklungen und rechtlichen Verpflichtungen ein anwendungsbereites Instrument bereitgestellt werden.

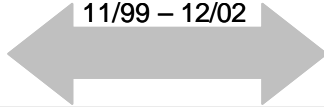
DIN AK 5.3 „Marine Biotests“		
Funktion: nationales Standardisierungsgremium und Spiegelung internationaler Standards im Bereich marine Biotestverfahren		
Obfrau: Dipl.-Biol. C. Peters (TUHH) Stellvertreter: PD Dr. R. Berghahn (UBA)		
11 Sitzungen 13 aktive Mitglieder	Projektlaufzeit 11/99 – 12/02 	10 PraktikerInnentreffen 4 Laboratorien*
PD Dr. W. Ahlf (TUHH), Dipl.-Biol. K. Barz (TUHH)*, Dipl.-Biol. S. Becker (Dr. U. Noack Laboratorium)*, PD Dr. R. Berghahn (UBA), Dr. K. Broeg (AWI), Dipl.-Biol. W. Bülow (NLÖ)*, Dipl.-Biol. D. Danischewski (BFA Fischerei), Dr. U. Kammann (BFA Fischerei), Dr. V. Maaß (HH Strom- u. Hafenbau), Dr. U. Noack (Dr. U. Noack Laboratorium)*, Dipl.-Biol. C. Peters (TUHH)*, Dipl.-Biol. S. Pfitzner (BfG)*, Prof. Dr. M. Sellner (Uni- Wismar).		

Abb. 4: Funktion und Struktur des DIN AK 5.3 Marine Biotests (* = PraktikerInnen)

Zur Erfüllung dieser Ziele wurde eng mit dem DIN Arbeitskreis 5.3 „Marine Biotests“ zusammengearbeitet (Abb. 4). Die Aufgabe des Arbeitskreises (AK) besteht in der nationalen Standardisierung und Spiegelung internationaler Standards (europäischen (CEN) und weltweiten (ISO)) im Bereich mariner biologischer Testverfahren (Abb. 5). In dem DIN AK 5.3 findet ein intensiver Expertenaustausch mit Vertretern aus Landes- und Bundesbehörden, Hochschulen, privaten Forschungsinstituten und Industrie statt. Diese Einbindung des Projekts auf nationaler und auch auf internationaler Ebene, als ISO Delegation (C. Peters), trug zu der hohen Qualität des Projekts bei und ermöglichte zugleich das direkte Einmünden von Projektergebnissen in die Standardisierung der Testverfahren. Darüber hinaus wurden frühzeitig sogenannte „PraktikerInnenentreffen“ eingerichtet, auf denen die AnwenderInnen der marinen Biotests (Herr W. Bülow (NLÖ), Frau S. Becker (Dr. U. Noack Laboratorium), Frau C. Peters (TUHH) und Frau S. Pfitzner (BfG)) die Methoden im Detail prüften, Versuche planten, durchführten und Ergebnisse diskutierten. Durch diese intensive praktische Zusammenarbeit wurde eine sehr hohe Effizienz und große Akzeptanz des Testsets erreicht. Dies war für die Implementierung der Testverfahren von großer Bedeutung.

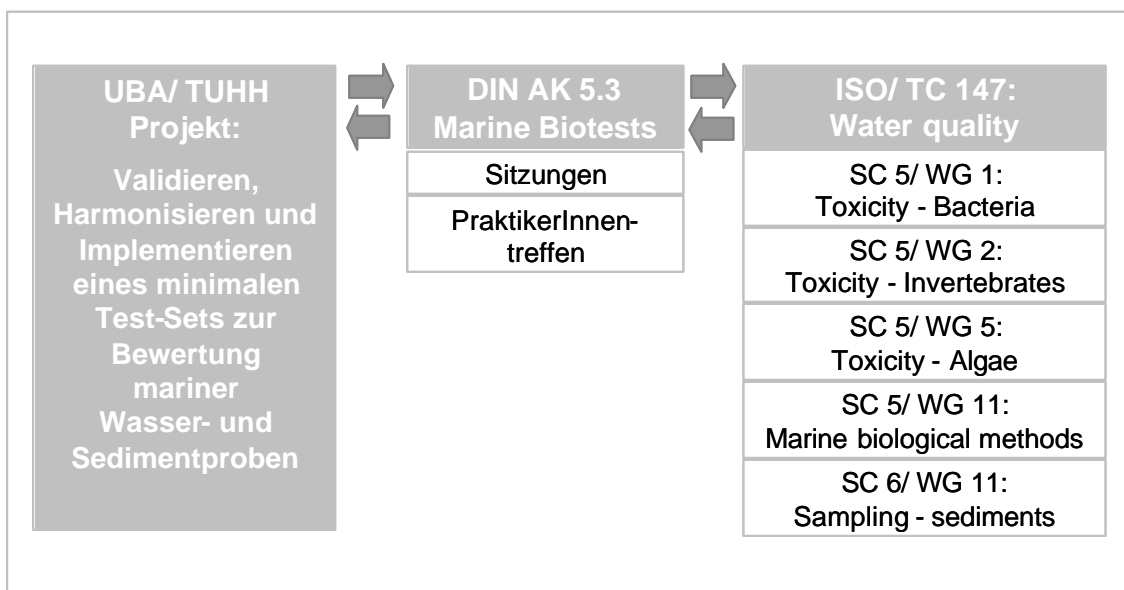


Abb. 5: Einbindung des Projekts in die nationale und internationale Standardisierung

3. Das minimale Testset

Um ein breites Spektrum von Schadstoffen sensitiv zu erfassen, muss ein Set von Biotests (*Bioassay-Battery*) mit unterschiedlichen Testorganismen und verschiedenen Parametern auf dieselbe Sedimentprobe angewendet werden (Zimmer & Ahlf 1994; Traunspurger & Drews 1996).

3.1. Auswahlkriterien für das minimale Testset

Die Zusammenstellung des marinen Testsets erfolgte anhand der in Abbildung 6 formulierten Auswahlkriterien (vgl. Peters 1999). Es wurden auch die Empfehlungen aus der Literaturstudie von Herbst & Nendza (2000) und dem UBA Expertengespräch berücksichtigt, die diesem Projekt vorausgingen. Ferner erfüllt das Testset auch die internationalen Anforderungen der OSPARCOM (1998).

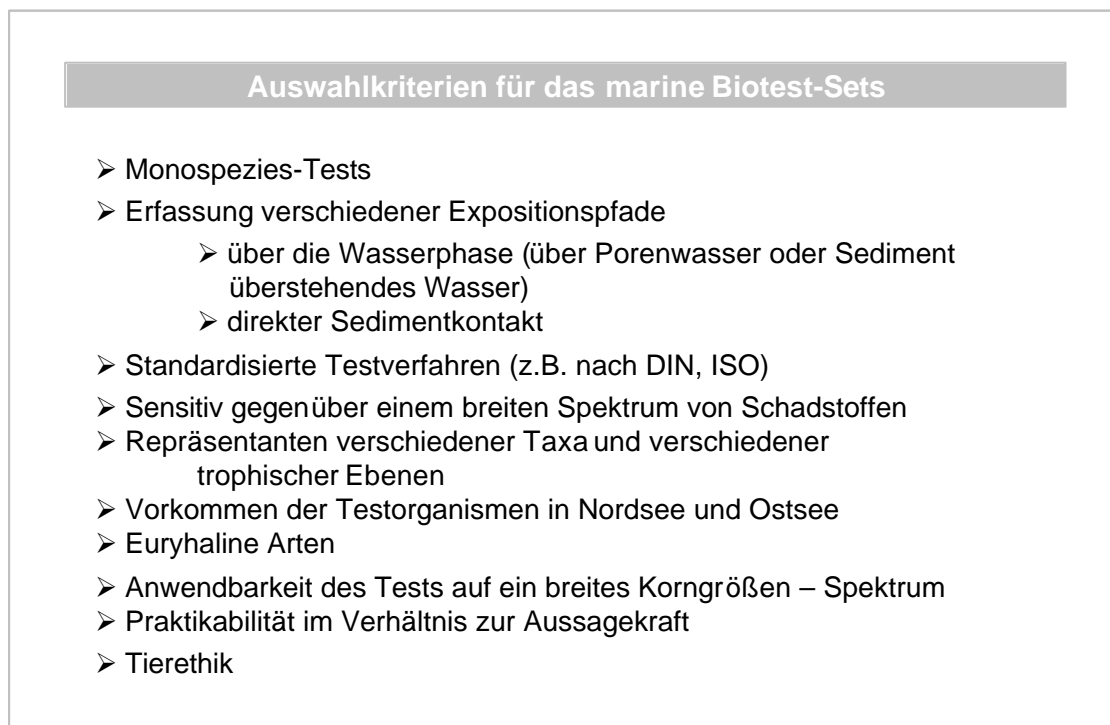


Abb. 6: Auswahlkriterien für die Zusammenstellung des marinen Biotest-Sets

3.1.1. Monospezies-Tests

Grundsätzlich stehen biologische Testverfahren von unterschiedlicher biologischer Organisationshöhe zur Verfügung. Mit Monospezies-Tests werden im Vergleich zu suborganismischen Testverfahren wichtige Aspekte wie die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe und den Organismen inhärente Reparaturmechanismen bei der Antwort des Testsystems integriert. Suborganismische Tests, die weiteren Aufschluss über den Wirkmechanismus geben, und Untersuchungen der Lebensgemeinschaft (Mesokosmen und Makrozoobenthosanalysen), die die Ökosystem-Relevanz des Testergebnisses steigern, sind als Erweiterung eines minimalen Testsets zu sehen und waren nicht Gegenstand des Projekts.

3.1.2. Erfassung verschiedener Expositionspfade

Bei der Erfassung der Sedimenttoxizität sind verschiedene Expositionspfade zu berücksichtigen: Schadstoffe können sowohl in gelöster Form über die Wasserphase (Porenwasser und Wassersäule) als auch partikulär gebunden von den Organismen aufgenommen werden (Harkey et al. 1994; Liß & Ahlf 1997). An Partikel gebunden können Schadstoffe durch Ingestion oder durch Interaktion der Oberflächen in den Organismus gelangen (Power & Chapman 1992). Der Einfluss der Expositionspfade scheint sowohl für Organismen als auch für Umweltchemikalien spezifisch zu sein (Ahlf 1995). Die Testbatterie musste folglich so gewählt werden, dass sowohl Tests für die Wasserphase als auch für die Feststoffphase (Gesamtsedimenttest) vertreten waren.

3.1.3. Sensitiv gegenüber einem breitem Spektrum von Schadstoffen

Die Sensitivität der Testsysteme ist aufgrund einer unterschiedlichen Sensitivität der Testorganismen und Testparameter, sowie der Erfassung verschiedener Expositionspfade und durch eine unterschiedliche Probenvorbereitung verschieden. Das Test-Set sollte so zusammengestellt

werden, dass sich die Sensitivitäten ergänzen und somit ein breites Spektrum von Schadstoffen sensitiv erfasst wird (Zimmer & Ahlf 1994; Traunspurger & Drews 1996).

3.1.4. Standardisierte Testverfahren (z.B. nach DIN, ISO)

Es sind einige marine Biotests entwickelt (Traunspurger & Drews 1996; Herbst & Nendza 2000), die in unterschiedlichem Maße international und national standardisiert sind. Die Implementierung eines marinen Biotest-Sets innerhalb Deutschlands steht aber noch aus. Für den Vollzug rechtlicher Regelungen, wie z.B. der Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Küstenbereich (HABAK-WSV (BfG 1999)) müssen die Biotestverfahren justiziabel und somit standardisiert sein. Aufgrund der Dringlichkeit der Implementierung einerseits und des langwierigen Standardisierungsverfahrens andererseits war eine möglichst abgeschlossene Standardisierung des Tests ein Auswahlkriterium. Die Berücksichtigung von methodischen Weiterentwicklungen der Standards ist bei ISO und DIN im Rahmen des Revisionsverfahrens möglich, das turnusmäßig alle fünf Jahre zur Disposition steht.

3.1.5. Repräsentanten verschiedener Taxa und verschiedener trophischer Ebenen

In Analogie zu den etablierten Süßwassertest-Sets sollten die Testorganismen verschiedenen Taxa angehören, da die Sensitivitäten von Organismen einer phylogenetischen Klasse ähnlicher im Vergleich zu phylogenetisch entfernteren Arten sind (Slooff et al. 1986). Mit der Berücksichtigung unterschiedlicher Trophiestufen sollte die Funktion der Organismen im Nahrungsnetz berücksichtigt werden, obwohl Nahrungsketteneffekte nicht explizit erfasst werden. Es wurde für drei Chemikalien gezeigt, dass die Toxizitätsergebnisse (EC_{50} -Werte) innerhalb einer Trophiestufe eine größere Spannbreite aufwiesen als zwischen den verschiedenen Trophiestufen, so dass kein allgemeiner Zusammenhang zwischen Trophiestufe und Sensitivität der Testorganismen *a priori* hergestellt werden kann (Ahlf 1994).

3.1.6. Vorkommen der Testorganismen in Nordsee und Ostsee

Das Testset soll zum Schutz von Nordsee und Ostsee eingesetzt werden, somit sollten die Testorganismen auch in diesen Gewässern vorkommen.

3.1.7. Euryhaline Arten

Da das Testset sowohl im Meerwasser- als auch im Brackwasserbereich anwendbar sein sollte, mussten die Testorganismen möglichst euryhalin sein.

3.1.8. Toleranz eines breiten Korngrößen – Spektrums

Für die Wahl des Gesamtsedimenttests war die Toleranz gegenüber einem breiten Korngrößenspektrum bedeutsam, um einen umfangreichen Anwendungsbereich zu gewährleisten.

3.1.9. Praktikabilität im Verhältnis zur Aussagekraft

Ein höherer Arbeitsaufwand war gerechtfertigt, wenn der Test eine hohe Aussagekraft hat, sei es z.B. durch besondere Ökosystem-Relevanz, Abdeckung eines komplexeren Expositionspfades oder wenn er Aufschluss über das Wirkstoffmuster gibt.

3.1.10. Tierethik

Es mussten mindestens die Erfordernisse des Tierschutzgesetzes eingehalten werden.

3.2. Vorstellung des minimalen Testsets

Unter Berücksichtigung der Auswahlkriterien wurden drei, weitestgehend standardisierte Testverfahren ausgesucht: der Leuchtbakterientest (DIN EN ISO 11348-1-3), der marine Algenbiotest (DIN EN ISO 10253) und der akute Amphipodentest (ISO DIS 16712) (siehe Abb. 7).




	Test	Organismus	Parameter	Dauer
	Leucht-bakterientest	<i>Vibrio fischeri</i>	Reduktion Biolumineszenz	30 Minuten
	Mariner Algenbiotest	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Wachstums-hemmung (Reproduktion)	72 Stunden
	Akuter Amphipodentest	<i>Corophium volutator</i>	Letalität, Eingrabe-verhalten	10 Tage

Abb. 7: Das minimale marine Biotest-Set

Damit besteht das Testset aus zwei Tests für die Wasserphase (Leuchtbakterientest und Algentest) und einem Gesamtsedimenttest (Amphipodentest). Mit dem Amphipoden *Corophium volutator* (Pallas) wurde ein endobenthischer, in Wohnröhren lebender Organismus ausgewählt, der zugleich eine epibenthische Ernährungsweise hat. Er ernährt sich von Bakterien, Algen und Detritus der Sedimentoberfläche (Schellenberg 1942).

Während die Tests der Wasserphase als internationale und nationale Standardvorschriften vorlagen, ist der Amphipodentest derzeit Gegenstand des weltweiten Standardisierungsverfahrens (ISO). Dies wird voraussichtlich 2003 abgeschlossen sein. Der Test ist bereits als ICES Richtlinie veröffentlicht (Roddie & Thain 2001) und war Aufgabe zur Qualitätssicherung im Rahmen des EU-Projekts "Biological Effects Quality Assurance in Monitoring" (BEQUALM) (Matthiessen 2000).

Der Leuchtbakterien- und Amphipodentest sind akute Tests, während der Algentest mehrere Generationen erfasst und als chronischer Test anzusehen ist. Mit diesem Testset wurden Beobachtungsgrößen erhoben, die von einem integralen Indikator für ungestörte Stoffwechselvorgänge (Biolumineszenz), über Verhaltensbeobachtungen (Sedimentmeidung während des Tests und Wiedereingrabeverhalten nach Testende) bis zu den integrierenden Parametern wie Reproduktion und Mortalität reichen.

Alle drei Tests sind als sehr sensibel im Vergleich zu anderen marinen Biotests anerkannt (Herbst & Nendza 2000). Der Leuchtbakterientest zeigte sich als sensitivster Test bei der Untersuchung kontaminierter mariner Sedimente (Pastorok & Becker 1990) und Off-Shore Chemikalien (Weideborg et al. 1997) im Vergleich zu einigen anderen Biotests. Bei Sedimentuntersuchungen korrelierte er als einziger Test mit Veränderungen der Makrozoobenthosstruktur (Becker et al. 1990).

Der marine Algentest mit *Skeletonema costatum* oder *Phaeodactylum tricornutum* war der sensitivste im Ringtest der Paris Kommission, bei dem Off-Shore Chemikalien und Bohrklein gegenüber ausgewählten marinen Organismen getestet wurde (Bjørnstad et al. 1993).

Amphipoden gelten als die ersten Arten der marinen benthischen Lebensgemeinschaft, die bei Kontamination aus den entsprechenden Gebieten verschwinden (Bellan-Santini, 1980; Swartz et al., 1982) und sind somit sensitive und ökosystem-relevante Indikatoren für Verschmutzungen der Sedimente. Nach einem internationalen Vergleich von Sedimenttests zur Bewertung der Qualität von Nordseesedimenten wurde der Amphipodentest als geeignetester Gesamtsedimenttest und seine Berücksichtigung in rechtlichen Regelungen in Europa empfohlen (Chapman et al. 1992). *C. volutator* war ferner die sensitivste Amphipodenart in Toxizitätstest mit Nordseesedimenten (van den Hurk et al. 1992).

Der Test mit *C. volutator* wurde von OSPARCOM als Standard *sediment reworker test* für die Prüfung von Off-Shore Chemikalien/ Produkten ausgewählt (OSPARCOM 1995). Er ist auch der Testorganismus der Wahl im Rahmen des gemeinsamen Monitoring Programms (Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP)) von OSPARCON (OSPARCOM 1997) und Bestandteil des Biotest-Sets zur Bewertung der Sedimentqualität in den Niederlanden (Brils et al. 2000), Großbritannien (Thain et al. 2000) und Belgien (Heijerick et al., 2000).

Die ausgewählten Testorganismen repräsentieren drei verschiedene Taxa und drei verschiedene trophische Stufen. Sie kommen in der Nordsee und Ostsee vor und haben eine breite Salinitätstoleranz¹: *Vibrio fischeri* 20- 35 (Krebs 1992), *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin 2- 63 (Fanuko 1981), *Corophium volutator* 2- 50 (bevorzugt 10- 30 (Mc Lusky 1970)), so dass ihr Einsatz für

¹ Die Salinität ist definiert als *Practical Salinity* (UNESCO 1978): "The practical salinity, symbol *S*, of a sample of sea water, is defined in terms of the ratio *K* of the electrical conductivity of a sea water sample of 15°C and the pressure of one standard atmosphere, to that of a potassium chloride (KCl) solution, in which the mass fraction of KCl is 0.0324356, at the same temperature and pressure." Die Salinität ist als ein Verhältnis definiert und hat somit keine Einheit. (Der alte Wert 35 ‰ entspricht *S* 35) (s. a. ISO 6107 Teil 2 (1997)). Die Salinität wurde im Rahmen des Projekts mit einem Leitfähigkeitsmessgerät und einem Refraktometer gemessen.

Meer- und Brackwasserproben möglich ist. *C. volutator* ist tolerant gegenüber einem breiten Korngrößenspektrum (Roddie & Thain 2001).

Die Kosten für die Kultivierung der Testorganismen der Wasserphase und für die Durchführung dieser Testverfahren wurden als gering bewertet, die Kosten-Effektivität als hoch bis mittel im Vergleich zu einigen anderen marinen Biotests (Herbst & Nendza 2000). Die Kosten für den Amphipodentest hängen stark davon ab, ob es sich bei den Testorganismen um Freilandtiere, die stets erst aufwändig beschafft werden müssen, oder um gezüchtete Tiere handelt. Der Kostenaufwand für die Durchführung des Tests wird hinsichtlich des Arbeitsaufwandes als mittelmäßig eingestuft, hinsichtlich der Materialkosten als gering (Bowmer 1994).

Mit dieser Zusammenstellung des Testsets wurden auch die Empfehlungen der Literaturstudie berücksichtigt (Herbst & Nendza 2000), die diesem Projekt vorausgegangen ist.

4. Allgemeine Hinweise zur Probenahme, Probenvorbereitung, Testdurchführung und Auswertung bei der Anwendung mariner Biotests auf Sedimente

Für eine Etablierung und Harmonisierung der Testverfahren untereinander und zwischen den Laboratorien waren zunächst allgemeine Hinweise zu beachten. Man kann die Anwendungsbereiche eines marinen Biotest-Sets nach den zu untersuchenden Medien wie folgt unterteilen (Abb. 8):

1. Sedimentproben,
2. wässrige Umweltproben (Porenwasser, Eluate, Brack-/ Meerwasser, Abwasser),
3. Stoffprüfung.

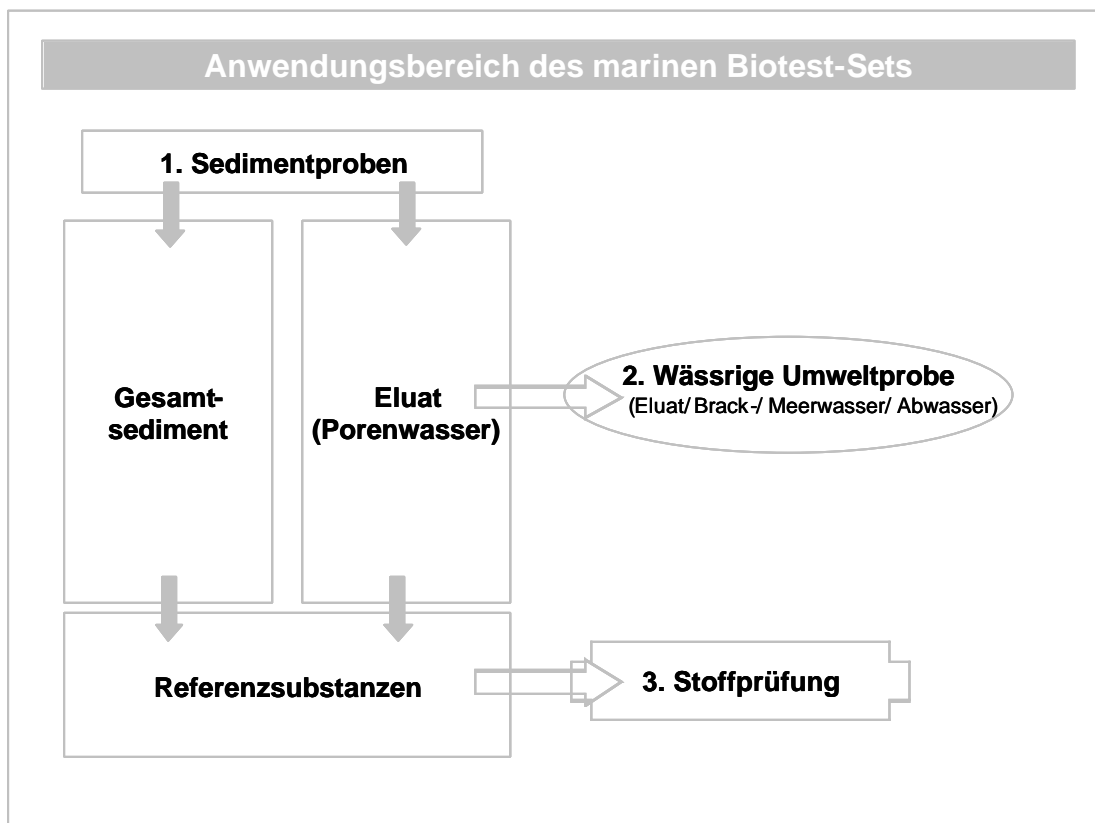
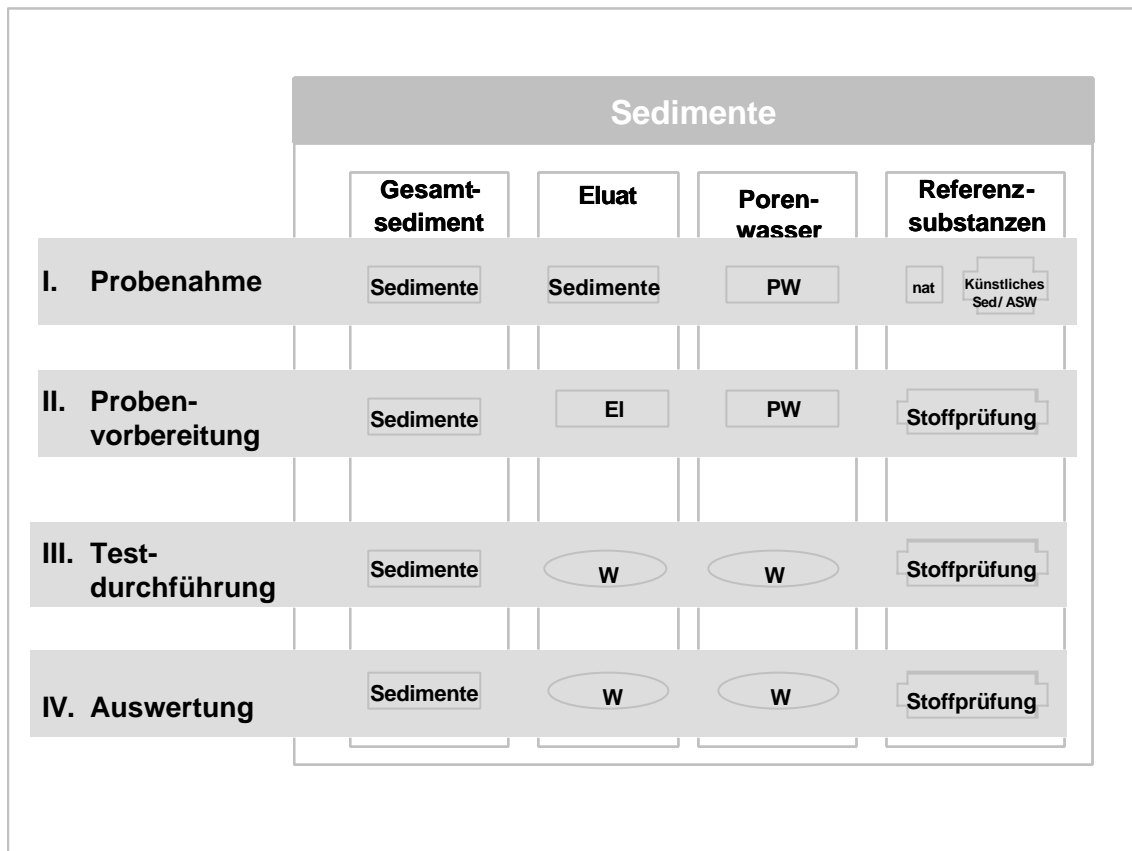


Abb. 8: Anwendungsbereiche des marinen Biotest-Sets differenziert nach dem Testmedium

Bei der Anwendung des Biotest-Sets auf Brack- und Meerwasser- Sedimente wurden sowohl die wässrige Phase (Interstitialwasser/ Porenwasser und das dem Sediment überstehende Wasser) als auch das Gesamtsediment (wässrige Phase und Feststoff) untersucht. Damit wurden bei der Probenahme, Probenvorbereitung, Testdurchführung und Auswertung auch allgemeine Methoden und Hinweise berücksichtigt, die für Sedimente und für wässrige Umweltproben (z.B. Herstellung von Verdünnungsstufen (G-Stufen)) gelten. Da bei jedem Ökotoxizitätstest eine Referenzsubstanz mitzuführen war, wurden auch Methoden der Stoffprüfung (z.B. Dotieren von Sedimenten, EC-Wert-Berechnung) angewendet (siehe Abb. 9).



Legende:

Die Symbole verweisen auf Methoden, die mit anderen Anwendungsbereichen des Biotest-Sets übereinstimmen oder speziell sind:

- Sedimente** Methoden für Sedimentproben
- EI** Methoden speziell für Eluate
- PW** Methoden speziell für Porenwasser
- W** Methoden für wässrige Umweltproben (Eluate, Brack-/ Meerwasser, Abwasser)
- Stoffprüfung** Methoden der Stoffprüfung (z.B. Dotieren von (natürlichen/ künstlichen) Sedimenten, EC-Wert Berechnung)

Abb. 9: Schematische Methodenübersicht bei der Anwendung des Biotest-Sets auf Sedimente

5. Probenahme und Probenvorbereitung

5.1. Probenahme

Bisher gibt es keinen internationalen oder nationalen Standard speziell für die Probenahme von Meer- und Brackwasser-Sedimenten für die Durchführung von Biotests. Ein solcher Standard muss u.a. folgende Aspekte abdecken:

- die Probenahmestrategie,
- das Probenahmegerät,
- Probengefäße,
- Probentransport,
- Lagerung (Art und Dauer).

Nach Prüfung bestehender ISO und DIN Standards (u.a. DIN EN ISO 5667-16 Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren (1999)) sowie weiterer Richtlinien und Handbücher (u.a. HABAK-WSV (BfG 1999); OSPARCOM 1998; Hill et al. 1993; ASTM 1994; Environment Canada 1994, Mudroch 1995) wurde ein kurzer Leitfaden erstellt, der im Anhang abgedruckt ist.

5.2. Probenvorbereitung

Vor der Vorbereitung der Sedimentproben für die Biotests, wurden u.a. folgende qualitative Sedimentcharakteristika erfasst: Farbe, Geruch, Tiefe der oxidativen Schicht, Makrofauna und Flora. Darüber hinaus wurde ein Basis-Set an Parametern erhoben, die als *Confounding Factors* das Testergebnis beeinflussen können und gleichzeitig das Habitat geochemisch charakterisieren (vgl. Hill et al. 1993; Spies 1989; Bagarinao 1992; Ankley et al. 1990):

- Trockengewicht (% Wassergehalt),
- Organischer Gehalt (TOC),
- Korngrößenverteilung,
- pH-Wert,
- Redoxpotential oder Sauerstoffsättigung,

- Salinität,
- Ammoniumgehalt und
- Sulfidgehalt.

5.2.1. Probenvorbereitung für den Gesamtsedimenttest

Bei der Vorbereitung der Sedimentproben für den Gesamtsedimenttest wurden die allgemeinen Hinweise zur Probenvorbereitung (DIN EN ISO 5667-16 (1999) sowie die speziellen Hinweise zum akuten Amphipodentest beachtet (ISO DIS 16712 (2002)).

5.2.2. Probenvorbereitung für die Tests der wässrigen Phase

5.2.2.1. Stand der Forschung und Praxis

Die Exposition des Benthos erfolgt über das Porenwasser und über das dem Sediment überstehende Wasser. Demnach wäre der Einsatz von Porenwasser in Biotests erwünscht, weist jedoch folgende Nachteile auf (Ahlf 2001; Carr et al. 2001):

- Es können nur kleine Volumina gewonnen werden;
- Die Artefakte durch Probenahme, Extraktion, Lagerung und Test (Oxidation) sind gravierend;
- Es treten Störungen durch Ammonium und durch ein lebensfeindliches Medium mit anoxischen Bedingungen auf;
- Bei anaeroben Porenwässern ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gering;
- Probenahme und Extraktion von Porenwasser ist mit großem Aufwand verbunden.

Aufgrund dieser gravierenden Nachteile werden zur Abbildung des Expositionspfades über die Wasserphase bevorzugt Eluate anstelle von Porenwasser eingesetzt, es sei denn, spezielle wissenschaftliche Fragestellungen oder Handlungsanweisungen erfordern eine Untersuchung von

Porenwasser. Eluate simulieren zugleich auch Resuspensionsereignisse, wie sie bei Baggerungen von Sedimenten auftreten.

Zur Eluatherstellung wird ein Sediment-Wasser-Gemisch hergestellt und geschüttelt. Anschließend wird die Wasserphase vom Feststoff durch Zentrifugation und evtl. Filtration getrennt. Das so gewonnene Eluat (wässriger Überstand) wird im Test in Verdünnungsstufen eingesetzt. Bisher gibt es weder für Süß-, Brack- noch für Meerwasser-Sedimente eine national standardisierte Eluatvorschrift. Die in der Literatur vorgenommenen Eluierungen unterscheiden sich u.a. hinsichtlich folgender Aspekte:

- der Vorbereitung der Sedimente (Sieben, Entfernung von großen Bestandteilen),
- dem Elutionsmittel (deionisiertes Wasser, limnisches Oberflächenwasser, künstliches Meerwasser, natürliches Meer-/ Brackwasser aus einem Referenzgebiet),
- dem Verhältnis von Wasser zu Sediment (1: 3 oder 1: 4),
- dem Bezugspunkt für das Verhältnis (bezogen auf das Volumen oder auf das Trockengewicht des Sediments),
- der Art und Dauer des Schüttelns (von 30 Minuten bis 24 Stunden),
- der Zentrifugation (Dauer und Stärke),
- der Filtration (ja/ nein, Filtertyp, ggf. Porenweite),
- der Dauer und Art der Lagerung bevor das Eluat getestet wird.

Aufgrund der methodischen Vielfalt können die erzielten Toxizitätsergebnisse sowohl zwischen den unterschiedlichen Tests der Wasserphase als auch bei Untersuchungen in verschiedenen Laboratorien oft nur schwer miteinander verglichen werden. Wird z.B. in Labor A ein Sediment zu Wasser Verhältnis von 1: 3 bezogen auf das Volumen und bei Labor B ein Sediment zu Wasser Verhältnis von 1: 4 bezogen auf das Trockengewicht eingesetzt, so ist bei einem Trockengewicht des Sediments von z.B. 30% der Anteil des Elutionsmittels bei Labor A 67% und bei Labor B 17%. Damit werden bereits im

Elutionsverfahren unterschiedliche Verdünnungen hergestellt. Diese Unterschiede sind bei der Interpretation der Testergebnisse zu berücksichtigen, d.h. eine Angabe der Test-Verdünnungsstufen (G-Stufen) ohne Angabe des Elutionsverhältnisses ist nicht ausreichend.

5.2.2.2. Herstellung von Meer- und Brackwasser- Eluaten

Es wurde mit den PraktikerInnen des DIN AK 5.3 „Marine Biotests“ eine Eluatvorschrift entwickelt (siehe Anhang). An dieser Stelle sollen wesentliche Aspekte der Vorschrift erläutert werden.

➤ Vorbereitung der Sedimentproben

Die Vorbereitung der Sedimentproben für die Tests der Wasserphase hängt von der zu untersuchenden Fragestellung ab. Steht im Vordergrund der Untersuchung

- a) der Vergleich der Sedimenttoxizität unterschiedlicher Probenahmestationen? oder
- b) der Vergleich der Testergebnisse innerhalb des Testsets oder zwischen verschiedenen Laboratorien (Ringtest)?

Im ersten Fall sollte das Sediment nur von Bestandteilen > 10 mm befreit werden. Im zweiten Fall kann es sinnvoll sein, dass das Sediment zur Eluatherstellung auf gleiche Weise vorbehandelt wird wie das Sediment für den akuten Amphipodentest: Das Sediment sollte durch 1 mm gesiebt werden, um Prädatoren und native Corophien auszuschließen.

➤ Elutionsmittel

Das Elutionsmittel für Meerwasser- und Brackwasser-Sedimente sollte:

- Meer- und Brackwasserverhältnisse repräsentieren (Resuspension, Bioverfügbarkeit),
- eine geringere Komplexität als Meer- und Brackwasser aufweisen, um die Wechselwirkungen mit Schadstoffen, und somit mögliche Maskierungen der Schadstoffe zu beschränken,
- mit praktikablen Aufwand (Zeit/ Kosten) herzustellen sein,
- standardisiert sein,
- sowohl im Leuchtbakterientest als auch im marinen Algenbiotest einsetzbar sein (Harmonisierung).

Als Elutionsmittel wurde standardisiertes, künstliches (synthetisches) Meerwasser der DIN EN ISO 10253 mariner Algenbiotests (*Artificial Sea Water* (ASW)) eingesetzt. Es wurde in Abhängigkeit von der Salinität² des Porenwassers als künstliches Meerwasser (ASW) oder mit deionisiertem Wasser verdünnt als künstliches Brackwasser (ABW) (siehe Tabelle 1) verwendet:

- Salinität der Probe: $5 \leq x \leq 20$ \Rightarrow ABW als Elutionsmittel
- Salinität der Probe: $20 < x \leq 35$ \Rightarrow ASW als Elutionsmittel

² siehe Definition der Salinität auf Seite 14.

Tabelle 1: Künstliches Meerwasser (ASW) (nach DIN EN ISO 10253) und künstliches Brackwasser (ABW)

	Artificial Sea Water (ASW)	Artificial Brackish Water (ABW)
Salz	[g/L]	[g/L]
NaCl	22,0	14,19
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	9,7	6,26
Na ₂ SO ₄ (wasserfrei)	3,7	2,39
CaCl ₂ (wasserfrei)	1,0	0,65
KCl	0,65	0,42
NaHCO ₃	0,20	0,13
H ₃ BO ₃	0,023	0,015
Salinität (Refraktometer bei 20°C)	31 ± 1	20 ± 1
Leitfähigkeit [µS/cm] (20°C)	47.000 ± 1.000	31.000 ± 1.000
pH-Wert:	7,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2

➤ **Verhältnis Sediment zu Wasser und dessen Bezugspunkt (vV oder TG)**

Die Sedimentproben wurden im Verhältnis Sediment: Wasser = 1: 4 eluiert, d.h. 1 Teil Sediment (Trockengewicht) und 3 Teile künstliches Meer-/ Brackwasser. War der Wassergehalt der Probe ≥ 75 %, so wurde die Sedimentprobe mit ihrem eigenen Wasseranteil eluiert.

Als Bezugspunkt wurde das Trockengewicht gewählt, um eine Vergleichbarkeit mit den chemischen Analyse-Ergebnissen zu ermöglichen. Darüber hinaus kann der Wassergehalt von der Art der Probenahme und dem Probenahmegerät abhängen, so dass bei Volumenbezug eine Manipulation möglich gewesen wäre. Mit dem Bezugspunkt TG wurde auch der Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Küstenbereich (HABAK-WSV (BfG 1999)) entsprochen.

➤ Trennung von Feststoff- und Wasserphase

Die Trennung von Feststoff- und Wasserphase erfolgte über Zentrifugation, wobei je nach Laborkapazität mind. bei 3.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert wurde. Die gewonnenen Überstände wurden filtriert. Eine Filtration ist grundsätzlich kritisch zu betrachten, weil dadurch

- Schwebstoffe abgetrennt werden und somit die Schadstofffracht verändert werden kann,
- Zerfallsprodukte entstehen können, die möglicherweise vorher nicht bioverfügbar waren,
- die Gefahr besteht, dass filtereigene Schadstoffe in das Eluat abgegeben werden (Klein 1991).

Dennoch wurden die Eluate filtriert, um

- Störungen des Algenwachstums infolge von Beschattung durch Schwebstoffe zu unterbinden,
- Störung durch Eigenfluoreszenz durch Huminstoffe im Leuchtbakterientest auszuschließen und
- eine Gleichbehandlung von allen Eluaten zu gewährleisten.

Die Schadstoffexposition gegenüber Fest- und Schwebstoffen wurde im Gesamtsedimenttest erfasst. Untersuchungen von Klein (mdl. Mitteilung Bülow (NLÖ) 2000) haben zudem gezeigt, dass die Glasfaserfilter von Macherey & Nagel (MN GF – 5, Ø 50 mm, 0,45 µm) nach Vorwaschen geeignet sind.

6. Testdurchführung und Auswertung

6.1. Der Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri*

6.1.1. Kurze Methodenbeschreibung

Bei dem international und national standardisierten Leuchtbakterientest (DIN EN ISO 11348-1-3 (1999)) wird die Hemmung der Biolumineszenz des marinen Bakteriums *Vibrio fischeri* nach 30 minütiger Exposition gegenüber einer flüssigen Probe (Abwasser, Eluate, Oberflächenwasser, Extrakt oder Einzelstoffe in Lösung) im Vergleich zu einer Negativkontrolle gemessen. Das Leuchten ist ein integraler Bestandteil des bakteriellen Energiestoffwechsels (Krebs 1992b). Dieses Testverfahren kann mit flüssig getrockneten, gefriergetrockneten oder frisch gezüchteten Leuchtbakterien durchgeführt werden.

6.1.2. Stand der Forschung

Der Leuchtbakterientest ist der weltweit bekannteste Biotest. Er ist nach nationalem Recht u.a. für die Untersuchung von Abwasser (AbwVO), für die Einstufung in Wassergefährdungsklassen (19g WHG), für die Anmeldung von Chemikalien (ChemG) und für die Zulassung von Pflanzenschutzmitteln (PflSchG) gefordert. Seine Sensitivität, Praktikabilität und gesellschaftliche Akzeptanz sind somit für die Stoff- und Abwasserprüfung belegt.

Der Test ist national und international vielfach Bestandteil von Testbatterien zur Bewertung von limnischen Sedimenten, z.B. nach der „Handlungsanweisung zur Bewertung von Baggergut im Binnenland“ HABAB (BfG 1997) und auch zur Bewertung mariner Sedimente (z.B. Heijerick et al. 2000, Williams et al. 1986). In internationalen Testsets zur Bewertung mariner Sedimente ist derselbe Testorganismus – *Vibrio fischeri* - auch als Solid-Phase Test vertreten (Brils et al. 2000). Er ist derzeit der einzige Test, der nach der „Handlungsanweisung für

den Umgang mit Baggergut im Küstenbereich“ HABAK-WSV (BfG 1999) für die Bewertung mariner Sedimente herangezogen wird.

6.1.3. Anwendung auf Meer- und Brackwasser- Eluate

Vibrio fischeri ist ein marines Bakterium. Die Anwendung des Testverfahrens auf Meer-/ Brackwasser-Eluate sollte entsprechend der Vorschrift („für salzhaltige und Brackwasser“) und der Literaturstudie von Herbst & Nendza (2000) möglich sein.

Untersuchungen mit Meer-/ Brackwasser-Proben und Eluate wiesen jedoch häufig signifikante Fördereffekte der Proben im Vergleich zur Negativkontrolle auf. Als signifikant wurden Fördereffekte gewertet, die größer als die 2-fache Standardabweichung ($> 10\%$, Warnbereich der Kontrollkarte) waren. Entsprechende Beobachtungen wurden sowohl für das Verfahren mit flüssig getrockneten Leuchtbakterien (DIN EN ISO 11348-2 (1999), TUHH, Dr. Noack Laboratorium) als auch für das Verfahren mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien (DIN EN ISO 11348-3 (1999), BfG, NLÖ) gemacht.

Fördereffekte können Hemmeffekte maskieren und damit zu falsch negativen Befunden führen (Klein 1991, Krebs 1992b). Eine Maskierung wurde beispielsweise in vier von fünf Ostsee-Eluaten festgestellt (siehe Abb. 10).

Klein (1991) zeigte, dass die Biolumineszenz durch Zugabe von Kalium und Kalzium-Ionen im Vergleich zu einer Natriumchlorid-Lösung gefördert wird, wobei Magnesium-Ionen die Kaliumwirkung noch steigern. Demnach bewirken Kaliumgehalte ab etwa 10 mg/l unverkennbare Förderungen, die bei ca. 200 mg/l ihr Maximum erreichen. Die Rekonstitutionslösungen bzw. Nährmedien der aktuellen Vorschriften beinhalten 157 mg/l Kalium und 243 mg/l Magnesium, jedoch kein Kalzium (siehe Tabelle 2).

6.1.4. Modifikation des Leuchtbakterientests für Meer-/ Brackwasser-Eluate

Der Leuchtbakterientest wurde für Meer-/ Brackwasser-Proben und Eluate modifiziert: Die Leuchtbakterien wurden weiterhin mit den Nährmedien nach DIN EN ISO 11348-1-3 rekonstituiert. In Abhängigkeit von der Salinität der Probe wurde das künstliche Meerwasser (ASW, DIN EN ISO 10253) oder das künstliche Brackwasser (ABW) (Tabelle 2) als negative Kontrolle, als Verdünnungswasser zur Herstellung der Verdünnungsstufen der Proben (G-Stufen) sowie als Lösungsmittel für die Referenzsubstanz anstelle der 2%igen Natrium-Chlorid-Lösung eingesetzt (siehe Übersicht in Tabelle 3; Testanleitung siehe Anhang).

Tabelle 2: Zusammensetzung der Nährmedien des Leuchtbakterientests, künstlichem Brackwasser (ABW), künstlichem (ASW) u. natürlichem Meerwasser

	DIN EN ISO 11348-2	DIN EN ISO 11348-3		DIN EN ISO 10253	Natürliches Meerwasser
	flüssig getrocknete LB	gefrier getrocknete LB	ABW	Marine Algen ASW	(Ott, 1988)
	S 40	S 22	S 20	S 34	S 35
	[g/ l]	[g/ l]	[g/ l]	[g/ l]	[g/ l]
Anionen					
Cl ⁻	12,985	12,985	11,397	17,666	19,353
SO ₄ ²⁻			1,614	2,502	2,712
HCO ₃ ⁻			0,094	0,145	0,142
Br ⁻					0,067
BO ₃ ³⁻			0,015	0,023	0,025
Kationen					
Na ⁺	7,868	7,868	6,392	9,907	10,760
Mg ²⁺	0,243	0,243	0,748	1,160	1,294
Ca ²⁺			0,228	0,354	0,413
K ⁺	0,157	0,157	0,220	0,341	0,387
Sr ²⁺					0,008
Organik					
C ₆ H ₁₂ O ₆ x H ₂ O	8,000				
N-(2- Hydroxyethyl)- piperazin-N-(2- ethansulfonsäure) HEPES	11,900				

Tabelle 3: Vergleich der Standard Testdurchführung und der Brackwasser- und Meerwasser-Modifikation

	Standard DIN EN ISO 11348-1 -3	Brackwasser- Modifikation	Meerwasser- Modifikation
Salinität der Probe	< 5	5 = x = 20	20 < x = 35
Lösungsmittel der Referenzsubstanz	NaCl-Lösung (S 20)	ABW (S 20)	ASW (S 31)
negativ Kontrolle	NaCl-Lösung (S 20)	ABW (S 20)	ASW (S 31)
Verdünnungswasser	NaCl-Lösung (S 20)	ABW (S 20)	ASW (S 31)

Mit dieser Modifikation wurde

- das Leuchten der Negativkontrolle optimiert, so dass die Förderungen durch Meer-/ Brackwasser und die daraus möglichen Maskierungseffekte reduziert wurden (siehe Abb. 10),
- die Salinitätsunterschiede der Meerwasser- Proben und Eluate in den verschiedenen Verdünnungsstufen reduziert,
- ein künstliches Meer-/ Brackwasser eingesetzt, das eine standardisierte Vorgehensweise und eine Anwendung des Tests in küstenfernen Laboratorien ermöglicht,
- die Zusammensetzung des ASW und ABW so gewählt, dass die Hauptbestandteile des natürlichen Meerwassers repräsentiert und der Aufwand der Herstellung angemessen waren,
- eine Harmonisierung der Eluatherstellung, des Leuchtbakterientests und des marinen Algenbiotests erzielt, indem dasselbe ASW und ABW eingesetzt wurden. Damit wurde die Praktikabilität sowie die Vergleichbarkeit der Testergebnisse gesteigert.

In Abbildung 10 sind die Leuchtbakterientestergebnisse derselben Ostsee-Eluate nach dem standardisierten Verfahren mit Natriumchlorid (oben) und mit ABW (unten) als Kontrolle und Verdünnungswasser dargestellt. Nach dem Standardverfahren zeigte nur die Probe 722 einen Effekt, während nach der

Brackwasser-Modifikation insgesamt vier von fünf Proben einen Effekt ($> 10\%$) zeigten. Es wurden folglich die Effekte von drei Proben bei dem standardisierten Verfahren maskiert.

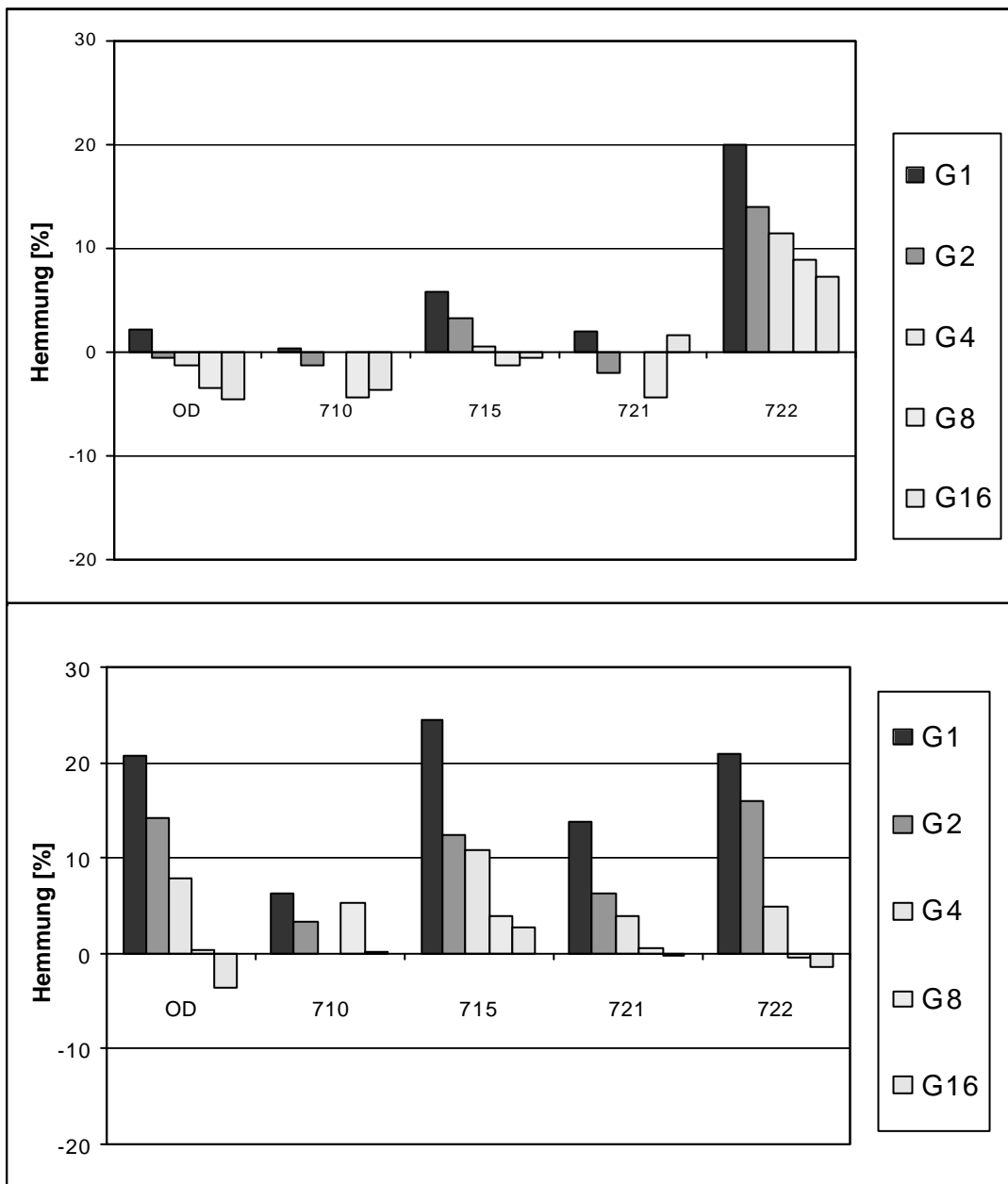


Abb. 10: Vergleich Leuchtbakterientest-Ergebnisse (flüssig getrocknete LB) derselben Ostsee-Eluate nach DIN EN ISO (oben) und nach der Brackwasser-Modifikation (unten) (TUHH Sept. 2001)

6.1.5. Einsatz des modifizierten Leuchtbakterientests bei unterschiedlichen Salinitäten der Probe

Zur Überprüfung der Modifikation des Leuchtbakterientests bei unterschiedlichem Salzgehalt der Probe wurde das ASW als Probe in verschiedenen Salinitätsstufen³ eingesetzt. Es wurden die Salinitätsstufen 5, 10, 15, 20 und 30 durch Verdünnung mit deionisiertem Wasser und die Salinitätsstufen: 35 und 40 durch Aufsalzung mit Natrium-Chlorid (Salinitätsmessung: Hand-Refraktometer, S-10, Fa. ATAGO) hergestellt und mit flüssig getrockneten Leuchtbakterien (Fa. Dr. Lange) getestet.

Die Ergebnisse derselben Testreihe sind in Abbildung 11 zweimal dargestellt: einmal mit der Angabe der Salinität in der Probe und einmal mit der Salinität im Testansatz. Dies soll verdeutlichen, dass aufgrund der Konservierung und Rekonstitution der Leuchtbakterien die Salinität im Testansatz größer als in der Probe ist.

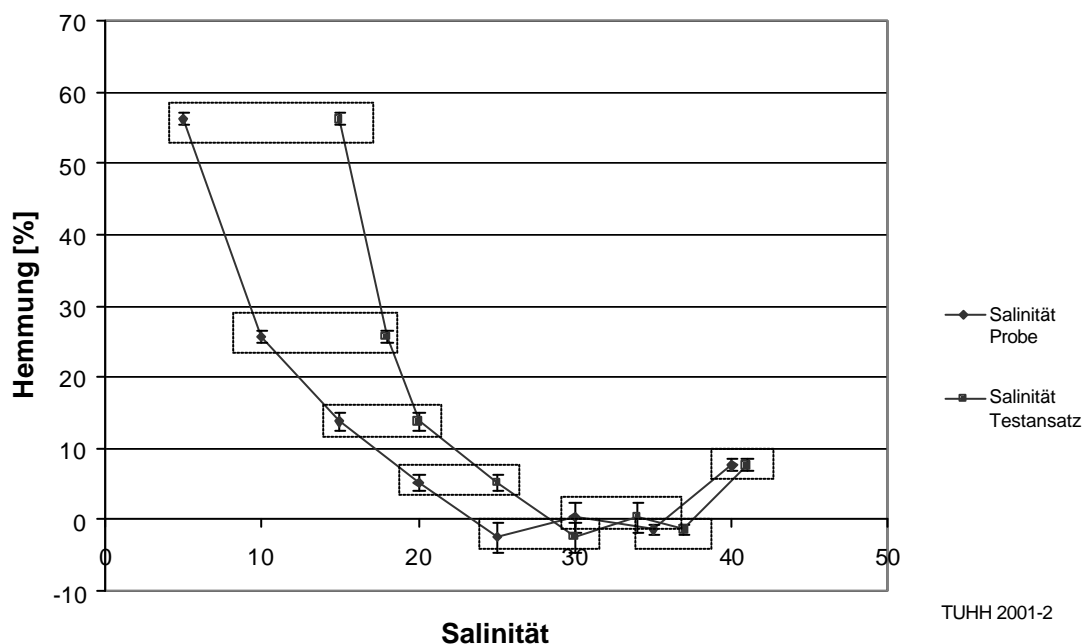


Abb. 11: Salinitätstoleranz des modifizierten Leuchtbakterientests

³ siehe Definition der Salinität auf Seite 14.

Bei einer Salinität der Probe von 20 – 40 war keine signifikante Hemmung der Biolumineszenz (Signifikanzniveau 10%) festzustellen (siehe Abb. 11).

6.1.6. Referenzsubstanzen für den modifizierten Leuchtbakterientest für Meer-/ Brackwasser

Eine Referenzsubstanz (Standardschadstoff) wird zu einer positiven Kontrolle gegeben, die bei jedem Test zur Qualitätssicherung des Testsystems mitgeführt wird. Sie dient sowohl zur Sensitivitätskontrolle der Testorganismen als auch zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Testsystems. Die Testergebnisse der Referenzsubstanz werden in Qualitätsregelkarten (Kontrollkarten) als interne Qualitätssicherungsmaßnahme dokumentiert.

Eine Referenzsubstanz für den Leuchtbakterientest sollte folgende Anforderungen erfüllen:

- Hohe Stabilität,
- geringe Humantoxizität,
- hohe Toxizität gegenüber Leuchtbakterien,
- geeignete Dosis-Wirkungskurve (nicht zu steil, nicht zu flach),
- die Toxizität sollte im pH-Wert Testbereich (6-8,5) stabil sein,
- gute Wasserlöslichkeit (bei pH-Wert 6,5-8),
- keine oder geringe Färbung.

Der Leuchtbakterientest-Standard sieht als Referenzsubstanzen Kaliumdichromat, Zinksulfat-Heptahydrat und 3,5-Dichlorphenol vor. Es war zu überprüfen, ob diese Referenzsubstanzen auch für die Meer-/ Brackwasser-Modifikation des Leuchtbakterientests geeignet sind. Dafür wurden alle Stammlösungen in künstlichem Meerwasser (ASW) bzw. künstlichem Brackwasser (ABW) angesetzt (siehe Tabelle 3).

6.1.6.1. Kaliumdichromat

Tests mit dem modifizierten Leuchtbakterientest und Kaliumdichromat zeigten, dass Kaliumdichromat als Referenzsubstanz für die Meer-/ Brackwasser-Modifikation aus folgenden Gründen ungeeignet ist:

- Die Komplexierung von Chrom in künstlichem und natürlichem Meerwasser (Cook et al. 2000) führte dazu, dass erst hohe Konzentrationen von Kaliumdichromat (154 mg/L) toxische Effekte (EC_{50} -Wert) bewirkten (siehe Tabelle 4).
- Diese hohen Konzentrationen wiesen eine Eigenfluoreszenz auf, die eine Farbkorrektur erforderlich machten. Eine Farbkorrektur ist mit zusätzlichem Arbeitsaufwand und einer zusätzlichen möglichen Fehlerquelle verbunden, die es bei der Auswahl einer Referenzsubstanz zu vermeiden gilt.
- Chrom weist bei unterschiedlichen pH-Werten verschiedene Speziationen auf, die sich in ihrer ökotoxischen Wirkung stark unterscheiden (Villaescusa et al. 1997). Der Umschlagpunkt liegt in einem testrelevanten Bereich von pH-Wert 7 (Baraj et al. 2000). Dies bestätigten unsere Tests: bei einem pH-Wert von 6 wurde ein EC_{50} -Wert von 154 mg/l und bei pH-Wert von 8 EC_{50} -Wert von 277 mg/l ermittelt (siehe Tabelle 4).
- Daten zur Humantoxizität klassifizieren die Substanz als kanzerogen und mutagen.

Tabelle 4: Ermittelte EC_{50} -Werte für Cr^{6+} für flüssig getrocknete Leuchtbakterien

Stammlösungsmittel, Kontroll- u. Verdünnungswasser	Salinität	pH- Wert	EC_{50} - Wert Cr^{6+} [mg/L]	95% Konfidenz Intervall EC_{50} -Wert Cr^{6+} [mg/L]	Anzahl Parallelen
NaCl (nach DIN)	20	7,0	3,43	3.18 bis 3.69	4
ASW (Meerwasser- Modifikation)	31	6,0	153,7	151.3 bis 156.2	8
ASW (Meerwasser- Modifikation)	31	8,0	277,2	204.8 bis 375.2	4

6.1.6.2. Zinksulfat

Die DIN EN ISO Norm des Leuchtbakterientests sieht auch Zinksulfat als Referenzsubstanz vor. Aus diesem Grund wurde der Einsatz von Zink als Referenzsubstanz für die Meer-/ Brackwasser-Modifikation des Leuchtbakterientests geprüft. Die in den Tabellen 5 - 7 zusammengestellten EC_{50} -Werte und Präzisionsdaten wurden nicht im Rahmen eines Ringtests erhoben. Der Datenumfang war auch deutlich geringer, so dass eine statistische Auswertung (Ausreißer Identifikation und Eliminierung) nicht möglich war.

Tabelle 5: Mittlerer EC_{50} -Wert und Präzisionsdaten für Zink mit flüssig getrockneten Leuchtbakterien (Datenerhebung: TUHH und Dr. Noack Laboratorium)

Verfahren mit	Referenz-substanz	Test	L	N	\bar{x} (EC_{50} -Wert) [mg/L]	SD [mg/L]	CV [%]
flüssig getrockneten LB	Zn^{2+}	Standard	1	2	24,78	2,28	9,2
		Brackwasser	2	3	35,96	1,27	22,1
		Meerwasser	2	2	43,65	9,66	3,55

Legende:

LB	Leuchtbakterien
L	Anzahl Laboratorien
N	Anzahl Datensätze
\bar{x}	Mittelwert (EC_{50} -Wert)
SD	Standardabweichung
CV	Variationskoeffizient [%]

Tabelle 6: Mittlerer EC₅₀-Wert und Präzisionsdaten für Zink mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien (Datenerhebung: NLÖ, BfG und Macherey & Nagel) (Legende siehe Tabelle 5)

Verfahren mit	Referenz-substanz	Test	L	N	\bar{x} (EC ₅₀ -Wert) [mg/L]	SD [mg/L]	CV [%]
gefrier- getrockneten LB	Zn ²⁺	Standard	3	5	2,84	0,73	25,67
		Brack- wasser	2	4	6,10	1,59	26,13
		Meer- wasser	3	5	6,08	1,50	24,65

Tabelle 7: Mittlerer EC₅₀-Wert und Präzisionsdaten für Zink mit frisch gezüchteten Leuchtbakterien (Datenerhebung: UBA) (Legende siehe Tabelle 5)

Verfahren mit	Referenz-substanz	Test	L	N	\bar{x} (EC ₅₀ -Wert) [mg/L]	SD [mg/L]	CV [%]
frisch gezüchteten LB	Zn ²⁺	Standard	1	3	20,70	2,39	11,55
		Brack- wasser	1	2	31,43	2,63	8,36
		Meer- wasser	1	6	36,73	3,66	9,96

Der EC₅₀-Wert der Brackwasser- und Meerwasser-Modifikation war bei allen drei Verfahren größer als der der Standardvorschrift. Ein zunehmender Salzgehalt setzt die Bioverfügbarkeit des Zn²⁺ herab, wodurch die effektive Konzentration (EC₅₀-Wert) erhöht wird. Tendenziell ist der Vergleichsvariationskoeffizient der Modifikationen in der gleichen Größenordnung wie der des Standards. Legt man die zweifache Standardabweichung als Maß für einen signifikanten Unterschied der Modifikationen zum standardisierten Test zugrunde, so besteht bei dem Verfahren mit gefriergetrockneten LB kein signifikanter Unterschied. Bei den Verfahren mit flüssig getrockneten und frisch gezüchteten LB besteht demnach ein signifikanter Unterschied zwischen der Standardmethode und der Brackwassermodifikation, beim letzteren Verfahren trifft dies auch für die

Standardmethode vs. Meerwassermodifikation zu. Dieses Ergebnis ist jedoch unter dem Vorbehalt des sehr geringen Datenumfanges zu sehen.

6.1.6.3. 3,5-Dichlorphenol

3,5-Dichlorphenol (3,5-DCP) erfüllt die Anforderungen an eine Referenzsubstanz für den Leuchtbakterientest. 3,5-DCP erwies sich in ersten Untersuchungen der PraktikerInnen des DIN AK 5.3 in der Meerwasser- und Brackwasser-Modifikation des Leuchtbakterientests sowohl bei dem Verfahren mit flüssig getrockneten als auch bei dem mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien als geeignet.

Zur Überprüfung, ob die Meer- und Brackwasser-Modifikation des Leuchtbakterientests ebenso gut reproduzierbar wie das nach DIN EN ISO standardisierte Verfahren ist, wurde mit der Referenzsubstanz 3,5-DCP ein deutschlandweiter Ringtest durchgeführt.

6.1.7. Validierung des Meer-/ Brackwasser-Leuchtbakterientests: Ringtest mit 3,5- Dichlorphenol

6.1.7.1. Ringtest Aufbau und Durchführung:

Im November und Dezember 2001 wurde von der TUHH in Zusammenarbeit mit dem Dr. Noack Laboratorium ein Ringtest mit der Meerwasser- und Brackwasser- Modifikation des Leuchtbakterientests durchgeführt. An dem Ringtest nahmen deutschlandweit 24 Laboratorien teil (siehe Teilnehmerliste im Anhang).

Es wurde die Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol sowohl in der Brackwasser- und Meerwasser-Modifikation für alle 3 Verfahren, mit flüssig getrockneten (DIN EN ISO 11348-2), mit gefriergetrockneten (11348-3) und mit frisch gezüchteten Leuchtbakterien (11348-1) angewendet (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht Leuchtbakterientestverfahren des Ringtests

Leuchtbakterien (LB)	flüssig getrocknete	gefrier- getrocknete	frisch gezüchtete
DIN EN ISO 11348 -	2	3	1
Hersteller der LB	Dr. Lange	Macherey & Nagel	
Abkürzung	LA	MN	FG

Je Verfahren wurden vier Tests mit einer Konzentrationsreihe von 3,5-DCP durchgeführt:

1. Der erste Test wurde nach DIN EN ISO vollzogen. Er diente zum einen der Qualitätsüberprüfung jedes teilnehmenden Labors, zum anderen wurde damit die Varianz zwischen den Laboratorien bei Anwendung des standardisierten Tests festgestellt.
2. Der zweite Test war die Meerwasser-Modifikation (S 31).
3. Der dritte Test war die Brackwasser-Modifikation (S 20).
4. Als vierter Test wurde eine weitere Brackwasser-Modifikation angewendet, die ein reduziertes künstliches Meerwasser nach Klein (NLÖ) vorsieht und von Herrn Dr. Krebs (BfG) angewendet wird (Zusammensetzung siehe Anhang).

Alle vier Tests unterschieden sich nur darin, dass jeweils ein anderes Salzwasser eingesetzt wurde als (siehe Tabelle 9):

- Lösungsmittel für die Stammlösung von 3,5-DCP,
- Verdünnungswasser zur Herstellung der Konzentrationsreihe,
- Kontrolle, gegenüber der die prozentuale Hemmung bestimmt wurde.

Tabelle 9: Übersicht über die vier Tests des Ringtests

	1. Test	2. Test	3. Test	4. Test
Beschreibung	DIN EN ISO Standard	Meerwasser-Modifikation	Brackwasser-Modifikation	Brackwasser-Modifikation nach Krebs
Lösungsmittel für Stammlösung, Verdünnungswasser, Kontrolle	NaCl-Lösung	ASW	ABW	Klein ASW
Salinität	20	31	20	20
Vorschrift	DIN 11348-1/2/3	DIN AK 5.3 u. DIN 10253	DIN AK 5.3 u. DIN 10253	nach Krebs (BfG)

Insgesamt wurden 12 verschiedene Tests durchgeführt, drei Verfahren à vier Tests. In Tabelle 10 sind die Anzahl der Ringtestteilnehmer je Verfahren und Test zusammengefasst. Lediglich für das Verfahren mit frisch gezüchteten Leuchtbakterien (FG) konnte nicht die für einen Ringtest erforderliche Mindestteilnehmerzahl von acht gewonnen werden. Aufgrund der abwasserrechtlichen Relevanz dieses Verfahrens, war die Teilnahme zumindest eines Laboratoriums als Indiz für die Reproduzierbarkeit der Modifikation des Leuchtbakterientests von großer Bedeutung.

Tabelle 10: Anzahl am Ringtest beteiligter Laboratorien und Anzahl der Datensätze

Verfahren	LA				MN				FG			
Test	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
Anzahl Labor	16	16	16	15	10	10	10	10	1	1	1	1
Anzahl Datensätze (einschl. Wdh)	18	18	18	17	13	13	13	12	5	3	2	3

Alle Ringtest-TeilnehmerInnen erhielten je Verfahren dieselbe Leuchtbakterien-Charge und dieselbe Charge 3,5-DCP als Trockensubstanz vom Hersteller abgefüllt (Organisation Dr. Noack Laboratorium). Die 3,5-DCP Konzentration

sollte in der Stammlösung bei allen Verfahren und Tests gleich sein. Jeder Test wurde mit denselben sechs Verdünnungsstufen durchgeführt (G2, G3, G4, G6, G8, G12). Es wurden gemäß DIN mindestens 2 Parallelen je Verdünnungsstufe und Kontrolle gefordert.

Anhand der Rohdaten wurden die prozentuale Hemmung nach 30 Minuten und die EC_{50} - und EC_{20} -Werte einheitlich nach DIN ermittelt (TUHH). Die statistische Ringtestauswertung wurde nach DIN von Frau G. Donnevert (FH Giessen-Friedberg) vorgenommen.

Wenn ein Labor in einem der Tests des jeweiligen Verfahrens als Ausreißer identifiziert wurde (Krupps-Test), wurden die Ergebnisse dieses Labors bei der Gesamtauswertung nicht berücksichtigt.

6.1.7.2. Ringtest Ergebnisse:

In den folgenden Tabellen (11 - 13) sind die Ergebnisse der Ringtestauswertung zusammengestellt (siehe auch Abbildungen im Anhang). Es ist nochmals darauf hinzuweisen, dass bei dem Verfahren mit frisch gezüchteten LB nur ein Laboratorium (mit mehreren Datensätzen) beteiligt war, so dass eine Ringtest-Auswertung für dieses Verfahren nicht möglich war. Aufgrund der abwasserrechtlichen Relevanz dieses Verfahrens, war aber die Teilnahme zumindest eines Laboratoriums als Indiz für die Reproduzierbarkeit der Modifikation des Leuchtbakterientests von großer Bedeutung.

Tabelle 11: Ringtest Präzisionsdaten für flüssig getrocknete Leuchtbakterien (Legende siehe Tabelle 13)

EC₅₀-Werte - alle Laboratorien

– Ausreißertest mit Ausschluss des Ausreißer nur in Test 1

Test	L	N	NAP [%]	\bar{x} [mg/l]	S _R [mg/l]	V _R [%]
T1	11	13	24	4,67	0,370	8
T2	15	17	0	4,97	1,825	37
T3	15	17	0	5,94	2,344	40
T4	15	17	0	6,34	3,010	48

EC₅₀-Werte – ohne die Laboratorien 4, 7, 9, 12 (Ausreißer)

Test	L	N	NAP [%]	\bar{x} [mg/l]	S _R [mg/l]	V _R [%]
T1	11	13	0	4,67	0,370	8
T2	11	13	0	4,02	0,158	4
T3	11	13	0	4,83	0,420	9
T4	11	13	0	4,81	0,410	9

EC₂₀-Werte - alle Laboratorien

Test	L	N	NAP [%]	\bar{x} [mg/l]	S _R [mg/l]	V _R [%]
T1	15	17	0	3,40	1,149	34
T2	15	17	0	3,08	1,014	33
T3	15	17	0	3,38	1,159	34
T4	15	17	0	3,58	1,484	42

EC₂₀-Werte – ohne die Laboratorien 4, 7, 9, 12 (Ausreißer)

Test	L	N	NAP [%]	\bar{x} [mg/l]	S _R [mg/l]	V _R [%]
T1	11	13	0	2,82	0,300	11
T2	11	13	0	2,55	0,171	7
T3	11	13	0	2,82	0,419	15
T4	11	13	0	2,81	0,339	12

Präzisionsdaten der DIN EN ISO 11348-2 Anhang C (1999):

	L	N	NAP [%]	\bar{x} [mg/l]	S _R [mg/l]	V _R [%]
EC ₂₀	20	20	5	4,69	1,03	22
EC ₅₀	20	20	5	7,61	1,31	17

Tabelle 12: Ringtest Präzisionsdaten für gefriergetrocknete Leuchtbakterien (Legende siehe Tabelle 13)

EC₅₀-Werte - alle Laboratorien

Ausreißertest mit Ausschluss des Ausreißer nur in Test 3

Test	L	N	NAP [%]	\bar{x} [mg/l]	S _R [mg/l]	V _R [%]
T1	10	13	0	3,63	0,879	24
T2	10	13	0	3,62	0,683	19
T3	9	12	8	3,63	0,434	12
T4	10	12	0	3,42	0,887	26

EC₅₀-Werte – ohne Laboratorium 23 (Ausreißer)

Test	L	N	NAP [%]	\bar{x} [mg/l]	S _R [mg/l]	V _R [%]
T1	9	12	0	3,50	0,760	22
T2	9	12	0	3,52	0,599	17
T3	9	12	0	3,63	0,434	12
T4	9	11	0	3,31	0,843	26

EC₂₀-Werte - alle Laboratorien

Test	L	N	NAP [%]	\bar{x} [mg/l]	S _R [mg/l]	V _R [%]
T1	10	13	0	2,39	0,752	32
T2	10	13	0	2,27	0,555	25
T3	10	13	0	2,40	0,556	23
T4	10	12	0	2,23	0,604	27

EC₂₀-Werte – ohne Laboratorium 23

Test	L	N	NAP [%]	\bar{x} [mg/l]	S _R [mg/l]	V _R [%]
T1	9	12	0	2,28	0,665	29
T2	9	12	0	2,20	0,524	24
T3	9	12	0	2,30	0,464	20
T4	9	11	0	2,19	0,620	28

Präzisionsdaten der DIN EN ISO 11348-3 Anhang C (1999):

	L	N	NAP [%]	\bar{x} [mg/l]	S _R [mg/l]	V _R [%]
EC ₂₀	14	14	0	2,32	0,43	19
EC ₅₀	13	13	7	3,36	0,32	10

Tabelle 13: Präzisionsdaten für frisch gezüchtete Leuchtbakterien

EC₅₀-Werte (ein Labor)					
Test	L	N	\bar{x} [mg/l]	SD [mg/l]	VK [%]
T1	1	5	3,87	0,317	8
T2	1	3	3,23	0,188	6
T3	1	2	3,46	0,094	3
T4	1	3	4,77	0,350	7

EC₂₀-Werte (ein Labor)					
Test	L	N	\bar{x} [mg/l]	SD [mg/l]	VK [%]
T1	1	5	2,71	0,269	10
T2	1	3	2,11	0,196	9
T3	1	2	2,20	0,058	3
T4	1	3	3,51	0,381	11

Präzisionsdaten der DIN EN ISO 11348-1 Anhang C (1999):						
	L	N	NAP [%]	\bar{x} [mg/l]	S _R [mg/l]	V _R [%]
EC₂₀	15	15	0	3,78	1,65	44
EC₅₀	14	14	7	6,06	1,69	28

Legende:

T1	Test Nr. 1: nach DIN EN ISO Standard
T2	Test Nr. 2: Meerwasser-Modifikation
T3	Test Nr. 3: Brackwasser-Modifikation
T4	Test Nr. 4: Brackwasser-Modifikation nach Krebs
L	Anzahl der Laboratorien
N	Anzahl der Datensätze
NAP	Anteil Ausreißer in Prozent
\bar{x}	Gesamtmittelwert über alle Laboratorien
S _R	Vergleichsstandardabweichung
V _R	Vergleichsvariationskoeffizient in Prozent
\bar{x}	Mittelwert (ein Labor)
SD	Standardabweichung (ein Labor)
VK	Variationskoeffizient in Prozent (ein Labor)

6.1.7.3. Diskussion der Ringtest Ergebnisse

➤ Verfahren mit flüssig getrockneten Leuchtbakterien

- Bei dem Verfahren mit flüssig getrockneten Leuchtbakterien wurden in Test 1 (Standard) 27% der Ringtestteilnehmer (4 von 15) als Ausreißer identifiziert. Der Vergleichsvariationskoeffizient war nach Eliminierung der Ausreißer bei allen 4 Tests geringer als bei dem für die DIN EN ISO Normierung durchgeführten Ringtest. Hierbei ist jedoch der hohe, eliminierte Ausreißeranteil und die geringere Anzahl von Laboratorien zu berücksichtigen.
- Entscheidend für die Bewertung dieser Ringtestergebnisse war, dass die Modifikation des LB-Tests für den Meer- und Brackwasserbereich ebenso gute Präzisionsdaten wie der nach DIN EN ISO standardisierte Test geliefert hat.
- Die EC-Mittelwerte des Tests 1 nach dem DIN EN ISO Verfahren waren signifikant niedriger als die im Anhang C der DIN-Norm aufgeführten EC-Mittelwerte (Mittelwert-t-Test). Die im Rahmen dieses Ringtests ermittelten vier Ausreißer liegen alle oberhalb des Mittelwertes, so dass bei Berücksichtigung der EC-Werte und Präzisionsdaten des Anhangs C der DIN EN ISO Norm zwei der vier Ausreißer den Ringtest bestanden hätten.
- Das nach der DIN-Norm geforderte Gültigkeitskriterium: „Der Test ist gültig, wenn: ...die Abweichung der Parallelbestimmungen von ihrem Mittelwert nicht mehr als 3% beträgt. Dies gilt sowohl für die Kontrollansätze als auch für die Probenansätze, mit denen LID („die niedrigste unwirksame Verdünnung“) oder die EC_{20}/EC_{50} -Werte bestimmt werden...“ ist bzgl. der Probenansätze nicht von allen Teilnehmern erfüllt worden. Eine Eliminierung dieser Teilnehmer hätte den Datensatz zu stark reduziert. Darüber hinaus wurde bei der Erstellung der DIN-Norm und des dazugehörigen AQS-Merkblattes das Hauptaugenmerk auf die Ermittlung der LID-Werte für die Abwasseruntersuchung gelegt. Dabei

wurde vernachlässigt, dass in die EC-Wert Berechnung alle Daten der Dosis-Wirkungsbeziehung einfließen und trotz einer möglicherweise größeren Abweichung der Parallelen die EC_x -Werte stabilisieren.

➤ **Verfahren mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien**

- Mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien wurden 10% der Ringtest-Teilnehmer (1 von 10) als Ausreißer identifiziert.
- Die Modifikationen des LB-Tests für den Meer- und Brackwasser-Bereich lieferten ebenso gute Präzisionsdaten wie der nach DIN EN ISO standardisierte Test geliefert.
- Vergleicht man die beiden Brackwasser-Modifikationen (Test 3 und Test 4), so war der Vergleichsvariationskoeffizient des Test 4 (Klein ASW) etwas höher als der des Tests 3 (ABW).
- Die EC-Mittelwerte des Tests 1 unterschieden sich nicht signifikant von denen, die im Rahmen des Ringtests zur DIN-Normierung (Anhang C der DIN EN ISO Norm) ermittelt wurden (Mittelwert-t-Test).
- Bezüglich des Gültigkeitskriteriums, dass die Parallelbestimmungen vom Mittelwert nicht mehr als 3% (Punkte) abweichen dürfen, gelten dieselben Ausführungen wie bereits für das Verfahren mit flüssig getrockneten Leuchtbakterien erläutert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Ringtest aufgrund der guten Präzisionsdaten die Reproduzierbarkeit des modifizierten Leuchtbakterientests und somit seine Anwendbarkeit bestätigt hat. Es ist zu betonen, dass diese Modifikation nicht den DIN EN ISO Leuchtbakterientest in einem seiner Anwendungsbereiche ersetzen soll. Es galt lediglich einen Leuchtbakterientest für Brackwasser- und Meerwasser-Proben bereit zu stellen. Bei einem Vergleich der EC-Mittelwerte der Modifikationen (Tests 2-4) mit dem DIN EN ISO Test 1 des jeweiligen Verfahrens wurde für das Verfahren mit flüssig getrockneten Leuchtbakterien ein signifikanter Unterschied festgestellt, der jedoch auf die geringen Vergleichs-Variationskoeffizienten aller vier Tests

zurückzuführen ist. Dennoch ist anzunehmen, dass in Abhängigkeit von den Eigenschaften der zu prüfenden Substanz das DIN EN ISO Verfahren zu einem unterschiedlichen Ergebnis im Vergleich zum modifizierten Verfahren kommen kann (siehe am Beispiel Kaliumdichromat).

6.1.8. Implementierung: Meer-/ Brackwasser-Modifikation des Leuchtbakterientests als informativen Annex der ISO Norm

Der DIN AK 5.3 „Marine Biotests“ hat mit Unterstützung des DIN AK 5.1 „Biotests“ einen Antrag bei ISO über die Aufnahme der Meer- und Brackwasser-Modifikation des Leuchtbakterientests als informativen Annex der ISO 11348-1-3 im Rahmen des im Jahr 2003 möglichen Revisionsverfahrens gestellt. Wird dieser Vorschlag international befürwortet, so wird der informative Annex entsprechend auch in der DIN Norm umgesetzt. Damit stünde international eine standardisierte Modifikation des Leuchtbakterientests für den Meer- und Brackwasser-Bereich zur Verfügung.

6.2. Der marine Algentest mit *Phaeodactylum tricornutum*

6.2.1. Kurze Methodenbeschreibung

Der Wachstumshemmtest mit marinen Algen (Diatomeen) ist zur Prüfung von chemischen Verbindungen nach ISO EN DIN 10253 (1998) standardisiert. Er kann mit den marinen Algen *Skeletonema costatum* oder *Phaeodactylum tricornutum* in statischer Kultur durchgeführt werden. Es handelt sich um einen chronischen Biotest, bei dem die Hemmung der Zellvermehrung in den Testansätzen im Vergleich zu Kontrollansätzen über 72 Stunden bestimmt wird. Die Messung der Zellzahl erfolgt alle 24 Stunden. Die Hemmung des Wachstums wird als Hemmung des Biomasseintegrals (Fläche unterhalb der Wachstumskurve) oder der Wachstumsrate berechnet. Beide Berechnungsverfahren können jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

6.2.2. Stand der Forschung und Standardisierung

Der marine Algentest ist in seinem Anwendungsbereich auf die Stoffprüfung beschränkt und ist als solcher auch von OSPARCOM für die Prüfung von Offshore-Chemikalien empfohlen (Weideborg et al. 1997). Es gibt jedoch auch zahlreiche Untersuchungen, die einen marinen Algenbiotest mit *Skeletonema costatum* oder *Phaeodactylum tricornutum* für die Bewertung mariner Sedimente als Porenwasser- oder Eluattest einsetzen (Wong et al. 1995; Pedersen et al. 1998; Andersen et al. 1998; Heijerick et al. 2000). Die beiden Testspezies gelten als sensitive Arten (Beaumont & Newman 1986; Bjørnstad et al. 1993; Wong et al. 1995; Heijerick et al. 2000; Sverdrup et al. 2002). Da der Test mit *Phaeodactylum tricornutum* in Untersuchungen von marinen Sedimenten sensibler gegenüber Schwermetallen als der Leuchtbakterientest (Wong et al. 1995) reagierte und der Leuchtbakterientest wiederum für seine Sensitivität gegenüber organischen Verbindungen bekannt ist (Janssen 1998), wurde von uns angenommen, dass sich beide Testverfahren bezüglich der Bewertung mariner Sedimente in der Wasserphase gut ergänzen würden. Um

die ökologische Relevanz der Labor-Testergebnisse abzuschätzen, wird derzeit an der Ergänzung des marinen Algenbiotests durch *in situ* Methoden mit immobilisierten *Phaeodactylum tricornutum* auf Alginat-Kugeln in Ästuaren geforscht (Moreira dos Santos et al. 2002).

6.2.3. Etablierung des marinen Algentests

Die Testvorschrift sieht alternativ die Testalgen *Skeletonema costatum* oder *Phaeodactylum tricornutum* vor. *Skeletonema costatum* ist die von OSPARCOM empfohlene Art für die Testung von Offshore-Chemikalien (Weideborg et al. 1997). Trotzdem wurde sich aus folgenden Gründen für den Einsatz von *Phaeodactylum tricornutum* entschieden:

- Nach der Testvorschrift bedarf es für die langfristige Kultivierung von *Skeletonema* natürlichen Meerwassers, nicht aber für *Phaeodactylum*. Ziel des Projekts war, das Testset deutschlandweit zu implementieren. Aus logistischen Gründen und aus Gründen der Vergleichbarkeit sollten nach Möglichkeit alle Testverfahren auf künstlichem Meerwasser aufgebaut sein.
- *Skeletonema* wächst in Zellketten, die in Einzelzellen zerfallen können. Deshalb wurde angenommen, dass eine homogene Verteilung des Inokulums schwieriger zu erreichen und somit das Testergebnis mit größeren Fehlern behaftet sei.
- Mit *Phaeodactylum* wurden bereits gute Erfahrungen innerhalb des DIN AK "Marine Biotests" gemacht, während die Kultivierung von *Skeletonema* Schwierigkeiten bereitete.

Aufgrund der positiven Resultate im Arbeitsbereich der TUHH mit der Miniaturisierung des Süßwasseralgentests (in Anlehnung an DIN 38412 Teil 33) auf 24-well Mikrotiterplatte (Ahlf & Gratzner 1999), wurde die Miniaturisierung an der TUHH auch für den marinen Algentest angestrebt. Hierbei reduziert sich das Testvolumen auf 2 ml und die Volumenverhältnisse für Probe, Verdünnungswasser, Nährlösung und Algen werden entsprechend DIN EN ISO

10253 eingehalten. Vorteile der Miniaturisierung sind: Es können eine Vielzahl von Proben gleichzeitig getestet werden, durch automatische Pipettierung der Verdünnungsstufen und Messung der Fluoreszenz mit einem Plattenfluorometer können Fehlerquellen beim Pipettieren reduziert, sowie Zeit und Kosten gespart werden.

Zu Beginn des Testaufbaus zeigte *Phaeodactylum tricornutum* in den Kontrollansätzen nicht die geforderte Wachstumsrate von 0,04 je Stunde (Zunahme um den Faktor 16 innerhalb von 72 Stunden) auf der Mikrotiterplatte wohl aber im Erlenmeyerkolben. Eine Hypothese zur Erklärung dieser Ergebnisse war, dass die Kieselalgen in den Mikrotiterplatten Silikat limitiert waren, während sie das Glas der Erlenmeyerkolben als zusätzliche Silikatquelle nutzen konnten. Es ist bekannt, dass das Silikat der Glasgefäße bioverfügbar für Diatomeen ist, insbesondere beim Autoklavieren der Gefäße mit Meerwasser. Versuche mit unterschiedlichen Silikatkonzentrationen (Na_2SiO_3) in Mikrotiterplatten konnten diese Hypothese nicht bestätigen. Vielmehr konnte die geforderte Wachstumsrate erreicht werden, indem die Schüttelfrequenz reduziert wurde (beim Horizontalschüttler der Firma Edmund Bühler: Typ SWIP 200 rpm, beim Typ KL2 30 rpm). Möglicherweise hatten die Scherkräfte, die bei einem reduzierten Test-Volumen von 2 ml stärker sind als bei größeren Volumina, eine wachstumshemmende Wirkung. Darüber hinaus wurde die Wachstumsrate gefördert, wenn sich die Kultur, aus der die Vor-Kultur für den Test entnommen wurde, ebenfalls in der exponentiellen Wachstumsphase befand. Auf beide Aspekte wurde in der Testvorschrift bisher nicht hingewiesen.

Kritische Punkte beim Einsatz von Mikrotiterplatten im Algentest konnten beim Aufbau des marinen Algentests gelöst werden:

- Eine ausreichende Kohlendioxidzufuhr ist durch Schütteln der Platten auf einem Horizontalplattenschüttler gewährleistet.
- Bei der Testung flüchtiger Substanzen sollte entweder für jeden Testansatz eine separate Mikrotiterplatte oder eine atmungsaktive Membran zur

Abdeckung und damit Abtrennung der Testansätze untereinander eingesetzt werden.

An der BfG (Berlin) wurde die Miniaturisierung des marinen Algentests auf 24-well Mikrotiterplatte ebenfalls erfolgreich etabliert (siehe Abb. 13 und Abb. 14). Beim NLÖ wurde die Etablierung des marinen Algentests im sog. Hildesheimer-Algenrad (10 ml Glas-Testgefäße) vorgenommen. Beim Dr. Noack-Laboratorium wurde der Test in 20 ml Küvetten aus Polyethylen durchgeführt.

Alle vier Laboratorien bestimmten die Zellvermehrung über die *in vivo* Fluoreszenzmethode, wobei von jedem Labor zuvor Eichgeraden zur Zellzahl und Fluoreszenz in Kontrollansätzen mit einem hohen Bestimmtheitsmaß angelegt wurden. Das NLÖ maß in jedem Testansatz zusätzlich die Zellzahl (Schärfe Casy) zur Fluoreszenz. Folgende Aspekte sind bei Einsatz der Fluoreszenzmessung als alleinige Methode zu beachten:

- Der Chlorophyllgehalt ist abhängig vom Alter der Zellen sowie von der Licht- und Nährstoffsituation: Lichtmangel führt zu hohen, Nährstoffmangel zu niedrigen Chlorophyllgehalten (Kohl & Nicklisch 1988). Licht- und Nährstoffmangel-Situationen können jedoch während des Testverfahrens in der Regel ausgeschlossen werden.
- Herbizide können die Fluoreszenz beeinflussen, so bewirkt z.B. eine Exposition gegenüber Atrazin eine signifikante Zunahme des Chlorophyllgehaltes bei mittlerer bis starker Wachstumshemmung (Mayer et al. 1997; Mayer 1998).

An der TUHH basierte der Testaufbau zunächst primär auf Zellzählung unter dem Mikroskop mit einer Zählkammer (Neubauer improved), da das vorhandene Plattenfluorometer (Fluorolite 1000) die geringe Fluoreszenz zu Testbeginn (10^4 Zellen/ ml) nicht erfassen konnte. Ab 2002 war jedoch durch die Anschaffung eines neuen Plattenfluorometers (Bio-Tek FLx800) die Fluoreszenzmessung möglich.

Die Testvorschrift sieht zwei Methoden zur Berechnung der Hemmung des Wachstums vor: Hemmung des Biomasseintegrals (Fläche unterhalb der Wachstumskurve) oder Hemmung der Wachstumsrate. Beide Methoden führen jedoch in vielen Fällen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Da auf der ISO/TC 147 Sitzung in Antalya im Jahr 2000 beschlossen wurde, bei allen zukünftigen Standards und bei der Revision bestehender Standards nur noch die Wachstumsrate als Parameter heranzuziehen, wurden bereits alle Algentestergebnisse auf die Wachstumsrate bezogen.

Die im Laufe des Projekts erreichten Wachstumsraten variierten zwischen den Laboratorien stark - von einer Unterschreitung des als Gültigkeitskriterium geforderten Vermehrungsfaktors 16 bis hin zu einer Zunahme um den Faktor 85. Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, ein stabiles und zwischen den Laboratorien harmonisiertes Wachstum zu erzielen, u.a. durch

- Überprüfung der Temperatur während des Tests im Testgefäß,
- Kontrolle der Lichtintensität,
- Überprüfung der Herstellung des Nährmediums,
- Austausch der Stammkulturen,
- Mikroskopische Kontrolle der Stammkulturen,
- Harmonisierung der Kultivierung der Stammkulturen (flüssig Nährmedium),
- Überprüfung der Testauswertung (insbesondere Umgang mit Blindwerten).

Es wurde festgestellt, dass die Wachstumsrate in der Kontrolle einen Einfluss auf die Sensibilität des Tests haben kann. Bei der Prüfung von Referenzsubstanzen wurde laborintern mit zunehmender Wachstumsrate eine Zunahme der Sensibilität des Testsystems festgestellt. Aufgrund des unterschiedlichen Testaufbaus in den vier Laboratorien war die Harmonisierung der Wachstumsraten in den Kontrollen und Proben zwischen den Laboratorien bis zum Ende des Projekts nicht abgeschlossen.

6.2.4. Salinitätstoleranz von *Phaeodactylum tricornutum*

Da der marine Algentests sowohl für Meerwasser- als auch für Brackwasser-Eluate eingesetzt werden sollte, war die Überprüfung der Salinitätstoleranz von *Phaeodactylum tricornutum* notwendig. Die BfG bestimmte das Wachstum von *P. tricornutum* bei Einsatz des künstlichen Meerwassers nach Rezeptur des marinen Algentests (ASW) bei drei verschiedenen Salinitäten: 10, 20 und 32. Dafür wurde das künstliche Meerwasser nach der original DIN EN ISO Rezeptur (S 31) mit destilliertem Wasser auf S 20 und S 10 verdünnt. Anschließend wurden die Nährlösungen 1-3 nach Vorschrift hinzugegeben. Der Test wurde über 72 Stunden parallel sowohl im Erlenmeyerkolben als auch auf Mikrotiterplatte durchgeführt. Die größte Wachstumsrate wurde in beiden Testgefäßen bei einer Salinität von 20 erreicht (siehe Abb. 12). Ein Wachstumsoptimum bei S 20 wird auch durch Literaturangaben bestätigt (Moreira dos Santos et al. 2002). In allen Kontrollansätzen wurde die nach der Testvorschrift geforderte Wachstumsrate von 0,04 pro Stunde erreicht.

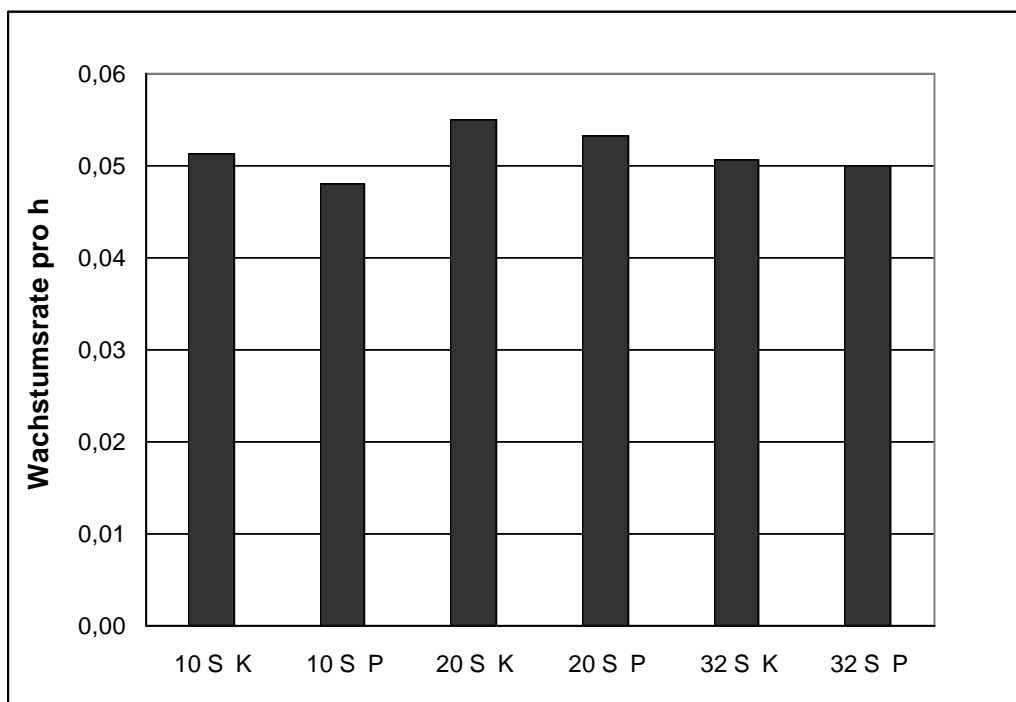


Abb. 12: Wachstum von *Phaeodactylum tricornutum* bei unterschiedlicher Salinität (S) im Erlenmeyerkolben (K) und auf der Mikrotiterplatte (P) (BfG Aug. 2001)

6.2.5. Anwendung auf Meer- und Brackwasser-Eluate

Für die Anwendung des marinen Algentests bei der Bewertung von Meer-/Brackwasser-Sedimenten war die Vorschrift nach DIN EN ISO 10253 (1998) um zwei Aspekte zu erweitern:

- Erweiterung der Testvorschrift von der Einzelsubstanzprüfung auf die Prüfung von Eluaten.
- Berücksichtigung von Eluaten unterschiedlicher Salinität (Meerwasser- und Brackwasser-Eluate).

➤ Erweiterung der Testvorschrift von der Einzelsubstanzprüfung auf die Prüfung von Eluaten und ihren Verdünnungsstufen

Die Herstellung der Brackwasser- und Meerwasser- Eluate war für den Leuchtbakterientest und marinen Algentest identisch, so dass die Probenvorbereitung für beide Verfahren harmonisierte. Der pH-Wert der Eluate für den marinen Algentest lag zwischen 7,5 – 8,5.

Für die Untersuchung von Eluaten und ihren Verdünnungsstufen wurde die Verfahrensvorschrift folgendermaßen geändert:

- Es wurde ein aufkonzentriertes Nährmedium hergestellt, in dem die Stammlösungen 1-3 in neunfacher Konzentration dem ASW zugefügt wurden. Dies wurde in allen Testansätzen und Kontrollen in gleicher Menge so vorgelegt, dass zu Testbeginn in allen Testansätzen und Kontrollen eine Nährmediumkonzentration entsprechend der Testvorschrift vorlag.
- Als Verdünnungswasser für die Herstellung der Verdünnungsstufen wurde das künstliche Meerwasser des marinen Algentests (ASW) ohne die Stammlösungen 1-3 verwendet.
- Für jede Verdünnungsstufe wurde ein Blindwert (Testansatz ohne Algen) mitgeführt. Hierfür wurde in den Testansatz anstelle des Inokulums (200 µL) einfach-konzentriertes Nährmedium (200 µl) eingesetzt.

- Zur Herstellung des Inokulums wurde die erforderliche Zellzahl aus der Vor-Kultur in frisches, einfach-konzentriertes Nährmedium überführt.
- Bei Anwendung des Pipettierschemas nach Tabelle 14 wurde unter diesen Vorgaben die vorgeschriebene Endkonzentration in allen Testansätzen gewonnen.

Tabelle 14: Pipettierschema für den miniaturisierten marinen Algentest

Verdünnung	Verdünnungs- stufe	Inokulum [µL]	Probe [µL]	ASW oder ABW [µL]	9x- konz. Nähr- medium [µL]	End- volumen [µL]
1 in 1,25	1	200	1600	-	200	2000
1 in 2	2	200	1000	600	200	2000
1 in 3	3	200	667	933	200	2000
1 in 4	4	200	500	1100	200	2000
1 in 5	5	200	400	1200	200	2000
1 in 8	8	200	250	1350	200	2000
1 in 12	12	200	167	1433	200	2000
1 in 16	16	200	125	1475	200	2000
1 in 24	24	200	83	1517	200	2000
1 in 32	32	200	63	1537	200	2000
Kontrolle		200	-	1600	200	2000

➤ **Berücksichtigung von Eluaten unterschiedlicher Salinität (Meerwasser- und Brackwasser-Eluate)**

Die Behandlung von Eluaten unterschiedlicher Salinität wurde für den marinen Algentest in Anlehnung an die Modifikation des Leuchtbakterientests für Brackwasser- und Meerwasserproben durchgeführt.

In Abhängigkeit von der Salinität der Probe wurde das künstliche Meerwasser (ASW) (DIN EN ISO 10253) oder das künstliche Brackwasser (ABW) (Tabelle 15) zur Herstellung des einfach und neunfach konzentrierten Nährmediums, als Verdünnungswasser sowie als Lösungsmittel für die Referenzsubstanz eingesetzt. Ebenfalls in Abhängigkeit von der Salinität der Probe wurde ABW oder ASW als Basis für das Nährmedium der Kontrolle genutzt (siehe Tabelle 15); Testanleitung siehe Anhang).

Tabelle 15: Brackwasser- und Meerwasser-Modifikation des marinen Algentests

	Brackwasser-Modifikation	Meerwasser-Modifikation
Salinität der Probe	10 = x = 20	20 < x = 35
Basis für Nährmedien	ABW (S 20)	ASW (S 31)
Verdünnungswasser	ABW (S 20)	ASW (S 31)
Lösungsmittel der Referenzsubstanz	ABW (S 20)	ASW (S 31)

Die im Rahmen des Projekts untersuchten Proben hatten eine Salinität 10 = x = 34. Da *Phaeodactylum tricornutum* in diesem Salinitätsbereich die als Gültigkeitskriterium geforderte Wachstumsrate von 0,04 pro Stunde in den Untersuchungen zur Salinitätstoleranz erreichte (siehe Abb. 12), wurde die Salinität der Proben nicht verändert.

6.2.6. Referenzsubstanzen

Die Testvorschrift sieht als Referenzsubstanzen (positive Kontrolle) Kaliumdichromat und 3,5 Dichlorphenol vor. Auf beide Referenzsubstanzen wurde bereits beim Leuchtbakterientest (siehe 6.1.6.2 und 6.1.6.3) eingegangen. Aus den bereits genannten Gründen, wurde sich auch im marinen Algenbiotest für 3,5 Dichlorphenol entschieden. Der Test wurde bezüglich der Referenzsubstanz-prüfung nicht grundsätzlich verändert, so dass der im Ringtest nach DIN EN ISO 10253 ermittelte mittlere EC_{50} -Wert von 2,7 mg/l ($N = 10$, Ausreißer = 3, $SD = 0,2$ mg/L, $CV = 8,6\%$) weiterhin als Referenzwert gilt. In den Abbildungen 13 und 14 wird anhand von Daten der BfG gezeigt, dass eine gute Übereinstimmung der EC_{50} -Werte bei einer Salinität von 20 und 31 in Erlenmeyerkolben und auf Mikrotiterplatte erreicht wurde. Die DIN EN ISO 10253 sieht im Gegensatz zum Leuchtbakterientest nicht die Einhaltung eines bestimmten Grenzwertes (Sensitivitätsbereichs) als Gültigkeitskriterium vor.

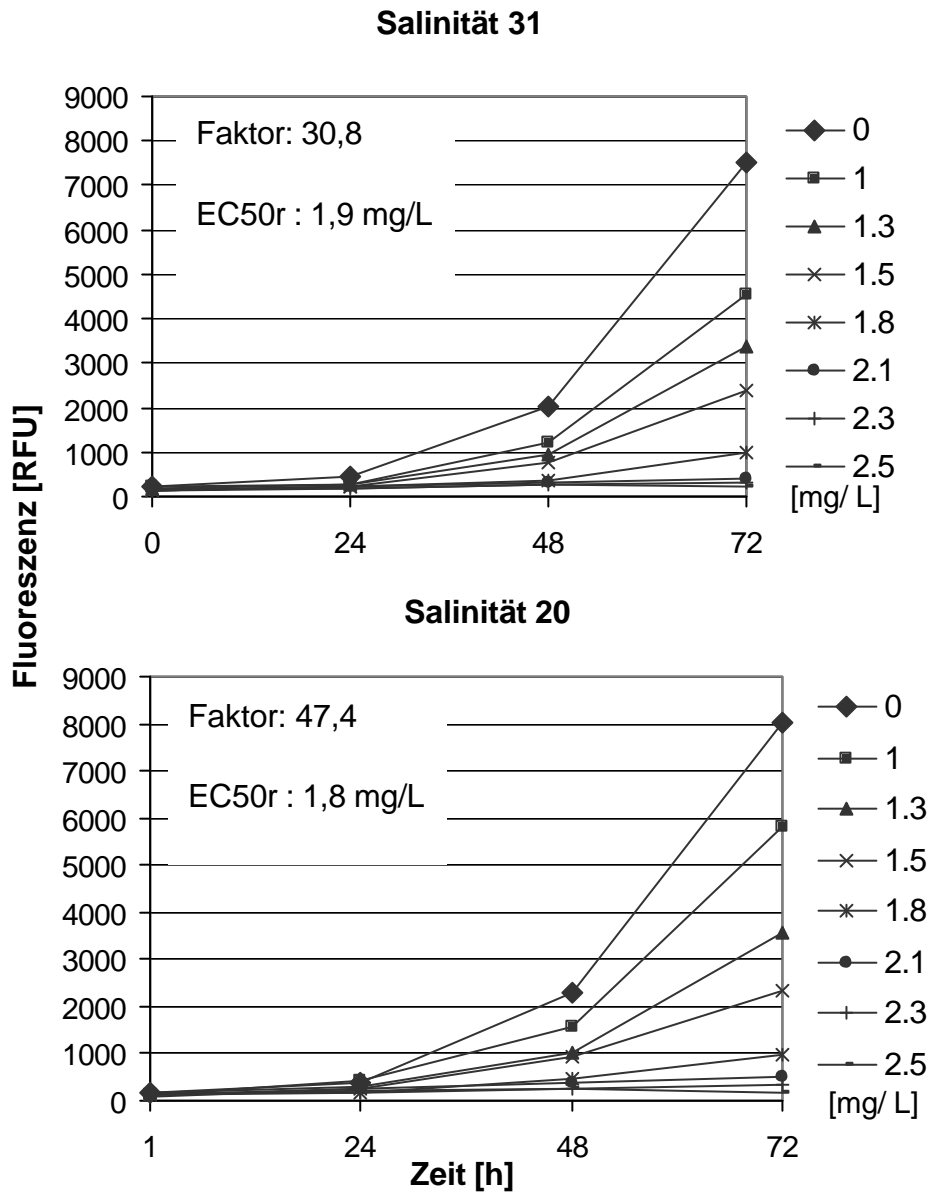


Abb. 13: Wachstumskurven von *Phaeodactylum tricornutum* in der Kontrolle und in der Konzentrationsreihe 3,5 DCP bei S 20 u. 31 im Erlenmeyerkolben (Faktor = Vermehrungsfaktor in der Kontrolle über 72 h) (BfG 2002)

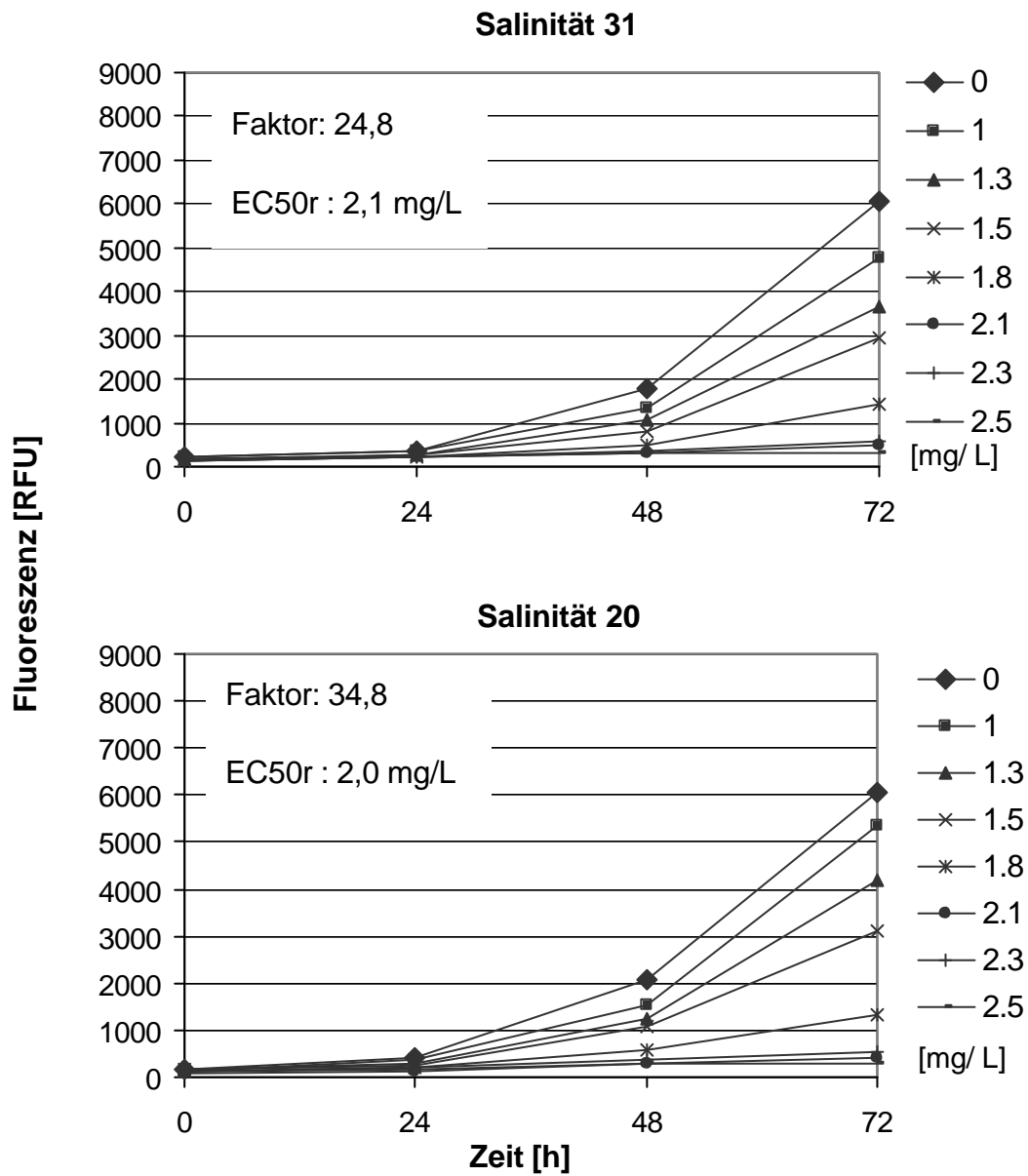


Abb. 14: Wachstumskurven von *Phaeodactylum tricornutum* in der Kontrolle und in der Konzentrationsreihe 3,5 DCP bei S 20 u. 31 auf Mikrotiterplatte (Faktor = Vermehrungsfaktor in der Kontrolle über 72 h) (BfG 2002)

6.2.7. Validierung an Nordsee- und Ostsee- Eluaten

Die Validierung des erweiterten marinen Algenbiotests an Eluaten von Nordsee- und Ostsee- Sedimenten wird unter Kapitel 7 dargestellt.

6.2.8. Implementierung: Revision ISO 10253 mariner Algentest

Der marine Algentest befindet sich zur Zeit in der ISO Revision, die wir zusammen mit Herrn Dr. T. Kållqvist (Norwegian Institute for Water Research (NIVA)) leiten. Die Erweiterung des Einzelsubstanztests auf Meer-/ Brackwasser-Eluate wurde in den Revisionsentwurf aufgenommen.

6.3. Der akute Amphipodentest mit *Corophium volutator*

6.3.1. Kurze Methodenbeschreibung

Der akute Amphipodentest ist ein statischer 10-Tage Test (1 l Becherglas)), bei dem 20 Schlickkrebse pro Testgefäß in 200 ml Sediment (2 cm) und 700 ml Meerwasser bei 15°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) exponiert werden. Ein Test besteht aus dem Testansatz (3 Parallelen), einer Negativkontrolle (5 Parallelen) und einer Positivkontrolle (Referenzsubstanz) mit 3 Konzentrationsstufen und 2 Parallelen à 10 Tiere. Während des Tests wird neben physikalischen und chemischen Parametern das Sedimentmeidungsverhalten der Testorganismen beobachtet. Am Testende werden die Parameter Mortalität und Wieder-Eingrabeverhalten der überlebenden Testorganismen nach Überführung in Kontrollsediment erhoben. Im Rahmen dieses Projekts wurden zusätzlich zu den genannten Parametern die am Testende lebenden Organismen in „moribund“ und „fit“ unterteilt.

6.3.2. Stand der Forschung und Standardisierung

Der akute Amphipodentest ist nach verschiedenen Richtlinien (u.a. Environment Canada 1992, ASTM 1999, Niederländische SOP (Schipper et al. 1999), ICES (Roddie & Thain 2001)) mit verschiedenen ästuarinen und marinen Arten ein weltweit verbreiteter Test, u.a. mit *Corophium volutator*, *Corophium arenarium*, *Ampelisca abdita*, *Rhepoxynius abronius* und *Leptocheirus plumulosus*. So gehören Amphipoden zu den am meisten genutzten Taxa in Sedimenttoxizitätstests in Nordamerika (Ferretti et al. 2002). Der akute Amphipodentest befindet sich zur Zeit unter Berücksichtigung von acht atlantischen (inkl. *Corophium volutator*) und sechs pazifischen Amphipodenarten im ISO Standardisierungsverfahren (ISO DIS 16712), das voraussichtlich 2003 abgeschlossen sein wird. Er gehörte zu den ausgewählten Sedimentbiotests des EU-Projekts "Biological Effects Quality Assurance in Monitoring" (BEQUALM) (Matthiessen 2000), an dessen Ringtests wir im Rahmen dieses Projekts erfolgreich teilgenommen haben.

Im Rahmen des Projekts wurden die bestehenden internationalen Testvorschriften ausgewertet und weiterentwickelt. Diese Erfahrungen sind direkt in das ISO Standardisierungsverfahren eingemündet. Wie für die anderen beiden Testverfahren befindet sich im Anhang eine ergänzende Empfehlung zum derzeitigen Entwurf des ISO-Standards.

Der Test mit *C. volutator* wurde von OSPARCOM als Standard *Sediment Reworker Test* für die Prüfung von Off-Shore Chemikalien/ Produkten ausgewählt (OSPARCOM 1995) und für das gemeinsame Monitoring Programm (Joint Assessment and Monitoring Programme (JAMP)) empfohlen (OSPARCOM 1997). Er ist Bestandteil des Biotest-Sets zur Bewertung der Sedimentqualität sowohl für Monitoring Zwecke als auch im Rahmen des Baggergut Managements in den Niederlanden (Brils et al. 2000, Stronkhorst et al. 2001, Brils et al. 2002), Großbritannien (Thain et al. 2000) und Belgien (Heijerick et al. 2000).

Es wird vielfach der Bedarf der Kultivierung und Züchtung der Testorganismen (ISO/ TC 147 Sitzung, Antalya 2000) sowie der Entwicklung eines chronischen Amphipodentests mit in der Nordsee und Ostsee einheimischen Arten gesehen (u.a. OSPARCOM 1998, EU TGD 2002). Derzeit wird in Großbritannien (Allen et al. 2000, Sims et al. 2000) und in den Niederlanden der akute Test als verlängerter Test mit *Corophium volutator* über 28 Tage und unter Berücksichtigung des subletalen Parameters Wachstum weiterentwickelt.

Darüber hinaus werden in Nordamerika und Europa verschiedene Untersuchungsansätze zur Validierung der Ökosystem-Relevanz von Sedimentbiotest-Ergebnissen auf Freilandpopulationen (Ferraro & Cole 2002) verfolgt. Eine Validierung erfolgt über Populationsmodelle, in die Testergebnisse aus marinen, akuten Amphipodentests und *Life-Cycle* Daten

(u.a. Kuhn et al. 2002) sowie *in situ* Untersuchungen (*Caging*) mit *Corophium volutator* (Kater et al. 2001) einmünden.

6.3.3. Internationale Kooperation

Durch die Teilnahme an dem internationalen Workshop „*Dredged Material in the Port of Rotterdam – Interface between Rhine Catchment Area and North Sea*“ (GKSS April 2000) wurde eine Kooperation zwischen der TUHH und RIKZ (*National Institute for Coastal and Marine Management*) und TNO-MEP (Marine Department, Den Helder) in den Niederlanden und CEFAS (*The Center for Environment, Fisheries and Aquaculture Science*, Großbritannien) aufgebaut. Diese Institute verfügen über langjährige Erfahrungen mit verschiedenen marinen Biotests, die für den Aufbau des akuten Amphipodentests an der TUHH sehr wertvoll waren.

6.3.4. Beschaffung der Testorganismen

Für den akuten Amphipodentest werden Schlickkrebse aus weitestgehend unkontaminierten Gebieten benötigt. Es werden für einen Test mit einer Probe (bei Einsatz von 20 Tieren und 3 Replikaten, 5 Negativkontrollen und 6 Positivkontrollen á 10 Tiere) insgesamt 220 Tiere und für jede weitere Probe 60 Tiere einer Größe von 5-8 mm (ohne Antennenlänge) gebraucht. Es sollten mindestens ein Drittel mehr Tiere als für den Test benötigt gesammelt werden. *Corophium volutator* kann in Dichten von 10.000 - 50.000 Individuen/m² (Roddie & Thain 2001) vorkommen, im Winter können die Populationen jedoch auch stark reduziert sein. Die Tiere leben in U-förmigen Röhren in den oberen ca. 8 cm (im Winter bis ca. 20 cm tief) (Schellenberg 1942) des Schlickwatts/Schlicksands und kommen u.a. im Elbeästuar, in der Ostsee und in der Nordsee (Wattenmeer) vor.

Nach logistischen Erwägungen erfolgten die ersten Probenahmen zum Testaufbau und Aufbau der Aquarien-Halterungen in Otterndorf/ Elbe. Die Tiere

wurden in hoher Dichte an dem von Herrn Dr. K.-H. van Bernem (GKSS) beschriebenen Probenahmeort gefunden. Sie erwiesen sich jedoch in Tests mit dotiertem Sediment als nicht sensitiv, was möglicherweise auf eine Toleranz durch eine Standort-Belastung zurückzuführen war. Auf der Grundlage der Schadstoff-kartierung (Koopmann et al. 1994) und *Corophium volutator* Bestandsdichte-Kartierung des deutschen Wattenmeeres (van Bernem 1998) wurden nach Einholen einer Ausnahmegenehmigung Proben im Nationalpark Schleswig-Holsteinisches Wattenmeer (Friedrich-Wilhelm-Lübke Koog) genommen. Im Winter 2000/2001 waren die Populationen jedoch so stark dezimiert, dass die Beschaffung einer ausreichenden Zahl von Tieren auch mit Unterstützung der Wattenmeerstationen nicht möglich war. Da *C. volutator* ein schneller, aber nicht konkurrenzstarker Erstbesiedler ist, ist die *Patchiness* seines Vorkommens sehr hoch und die vorliegenden Bestandskartierungen aus der Ökosystem-Forschung Schleswig-Holsteinisches Wattenmeer (Erhebungen bis 1992) schienen zumindest für den Winter nicht zuzutreffen. Hinzu kam, dass die Wintersituation 2000/ 2001 durch stark ablandigen Wind und Eisbedeckung der Wattenflächen geprägt war, was die Populationen möglicherweise dezimiert hat (mdl. Mitteilung Herr Prof. K. Reise, AWI-BAH). Schwierigkeiten bei der Beschaffung der Tiere in diesem Winter wurden auch aus den Niederlanden (Frau Dr. B. Kater, RIKZ)) und England (Frau Dr. Y. Allen, CEFAS)) berichtet.

Schließlich wurde *C. volutator* mit Unterstützung der Forschungsstelle Norderney (Herrn B. Obert, Niedersächsisches Landesamt für Ökologie (NLÖ)) im Februar 2001 in der sog. Surfbucht auf Norderney in ausreichender Dichte gefunden. Zur Überprüfung der chemischen Belastung des Probenahmestandortes wurden zunächst die von der Forschungsstelle Norderney zur Verfügung gestellten chemischen Monitoring Daten der im Mischwatt gelegenen Messstation des Bund-Länder-Messprogramms (BLMP) (1998) herangezogen. Zur Bewertung der chemischen Belastung des Standortes wurde der HABAK-WSV Richtwert 1 (RW 1) (BfG 1999) herangezogen. Bei Unterschreitung oder Einhaltung des RW 1 ist nach der

HABAK-WSV das Verbringen des Baggerguts im Meer erlaubt, sofern die Toxizitätsdaten und der Nährstoffgehalt nicht dagegen sprechen. Der RW 1 wurde von der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) aus der im Zeitraum von 1982-1992 vorherrschenden chemischen Belastung der deutschen Wattenmeersedimente abgeleitet. Nach den Monitoring Daten lagen die Konzentrationen aller Schadstoffe, die im Rahmen der HABAK-WSV gefordert werden, unterhalb des RW 1 (siehe Tabelle 16 und Tabelle 17). Auch der RW 1 für TBT nach dem Bund-Länder-Arbeitskreis Baggergut Küste (BLABAK) „Konzept zur Handhabung von Tributylzinn(TBT)-belastetem Baggergut im Küstenbereich“ (BLABAK 2001) wurde eingehalten.

Tabelle 16 : Vergleich Richtwert 1 für Schwermetalle (HABAK-WSV, BfG 1999) mit BLMP-Monitoring Daten Norderney (1998) und Sediment-Analysedaten der *Corophium*-Probenahmestelle (Kontrollsediment) (TUHH 2002)

Metall	Einheit	Richtwert 1 (HABAK-WSV)	Mischwatt Monitoring Daten 1998	Schlickwatt Kontroll- sediment 2002
		Fraktion < 20 µm	Fraktion < 20 µm	Gesamt- sediment
Arsen	mg/kg TG	30	22	6,4
Cadmium	mg/kg TG	2,5	0,69	0,5
Chrom	mg/kg TG	150	86	29,0
Kupfer	mg/kg TG	40	20	6,4
Blei	mg/kg TG	100	57	21,1
Quecksilber	mg/kg TG	1	0,26	0,097
Nickel	mg/kg TG	50	35	43,9
Zink	mg/kg TG	350	170	69,0

Eine spätere chemische Analyse des Schlickwatts der *Corophium*-Probenahmestelle zeigte, dass die Schadstoffkonzentration sehr wahrscheinlich auch an diesem Standort unterhalb des RW 1 war (siehe Tabelle 16). Ein direkter Vergleich der chemischen Analysedaten mit dem RW 1 Wert war erschwert, da sich der RW 1 Wert auf die Fraktion < 20 µm bezieht, die chemische Analyse jedoch am Gesamtsediment vorgenommen wurde. Das

Sediment war feinpartikulär (Schlickwatt) mit einem Anteil der Fraktion < 20 µm von 38% (siehe dazu auch Kapitel 7.1.2.3 und 7.2.2.3). Einige Einzelwerte der polychlorierten Biphenyle (PCB) (PCB 101, PCB 138 und PCB 180) wurden überschritten, der Summenwert wurde jedoch eingehalten.

Tabelle 17: Vergleich Richtwert 1 für organischen Schadstoffe (HABAK-WSV, BfG 1999) und des BLABAK-TBT Konzepts (BLABAK 2001) mit den BLMP-Monitoring Daten Norderney (1998) und Sediment-Analysedaten der *Corophium*-Probenahmestelle (Kontrollsediment) (TUHH 2002)

Organischer Schadstoff	Einheit	Richtwert 1 HABAK-WSV	Mischwatt Monitoring Daten 1998	Schlickwatt Kontroll- sediment 2002
		Fraktion < 20 µm	Gesamt- sediment	Gesamt- sediment
PCB 28	µg/kg TG	2	0,6	<1
PCB 52	µg/kg TG	1	0,09	<1
PCB 101	µg/kg TG	2	0,5	3
PCB 118	µg/kg TG	3	0,3	<1
PCB 138	µg/kg TG	4	1,1	5
PCB 153	µg/kg TG	5	0,4	3
PCB 180	µg/kg TG	2	0,4	5
Σ PCB	µg/kg TG	20	3,39	<19
α-Hexachlorocyclohexan	µg/kg TG	0.4	0,09	0,002
γ-Hexachlorocyclohexan	µg/kg TG	0.2	0,07	0,002
Hexachlorbenzol	µg/kg TG	2	0,2	0,001
Pentachlorbenzol	µg/kg TG	1	0,1	0,002
p,p'-DDT	µg/kg TG	1	0,01	0,008
p,p'-DDE	µg/kg TG	1	0,10	0,001
p,p'-DDD	µg/kg TG	3	0,3	0,003
Σ PAK*	mg/kg TG	1	0,296	0,615
Σ HC	mg/kg TG	300	Keine Daten	<50
TBT	µg TBT/kg TG	20	0,5 (bez. Sn)	Keine Daten

* Summe von 6 PAK (Fluoranthen, Benzo(b)fluoranthen, Benzo(k)fluoranthen, Benzo(a)pyren, Benzo(ghi)perylene, Indeno(1,2,3-cd)pyren)

Der Standort Surfbucht auf Norderney wurde im Weiteren aufgrund der kontinuierlichen Verfügbarkeit der Organismen sowohl für die Probenahme der Testorganismen als auch für die Reproduktionsversuche im Labor genutzt.

6.3.5. Taxonomie: Unterscheidung *Corophium volutator*/ *C. arenarium*

Die Testorganismen sollen aus derselben Population stammen und auf Artniveau identifiziert werden (ISO DIS 16712). Das Testverfahren ist grundsätzlich sowohl mit *Corophium volutator* als auch mit *C. arenarium* möglich. Die taxonomische Identifizierung von *Corophium volutator* und *Corophium arenarium* ist aufgrund möglicher Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Schadstoffen notwendig (Bowmer 1994, Roddie & Thain 2001, ISO DIS 16712). In der Regel kommt *C. volutator* im Schlickwatt und *C. arenarium* im Sandwatt vor, jedoch können sie auch gemeinsam an einem Standort auftreten (Bowmer 1994). Die beiden Arten lassen sich an Merkmalen der beiden Antennen und der Uropoden unterscheiden (Flügge 1977; Flügge 1978; Lincoln 1979; Fish & Mills 1980). Eine Einführung in die Taxonomie und eine Bestätigung der Testorganismen als *C. volutator* wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Andres (Zoologisches Institut und Museum, Universität Hamburg) gegeben.

6.3.6. Künstliches Meerwasser

Die Testvorschriften (Roddie & Thain 2001; ISO DIS 16712) sehen entweder den Einsatz von gefiltertem, gering belastetem, natürlichen Meer-/ Brackwasser oder von künstlichem Meerwasser vor. Da das Ziel des Projekts die deutschlandweite Implementierung des Testsets war, musste ein standardisiertes, deutschlandweit verfügbares Meerwasser eingesetzt werden. Auf Empfehlung von CEFAS wurde für die Tests, Hälterung und Züchtung von *C. volutator* das synthetische Meersalz der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Produkt No. S 9883) verwendet. Die Zusammensetzung laut Analyse-Zertifikat

des Herstellers ist in Tabelle 18 wiedergegeben. Das Produkt enthält nach Auskunft des Herstellers nicht den Komplexbildner EDTA.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Meersalzes der Fa. Sigma Aldrich Chemie

Ion	ppm
Chlorid (Cl ⁻)	18.788
Natrium (Na ⁺)	10.424
Sulfat (SO ₄ ²⁻)	2.577
Magnesium (Mg ²⁺)	1.265
Calcium (Ca ²⁺)	398
Kalium (K ⁺)	371
Bi-Carbonat (HCO ₃ ⁻)	145
Borat (BO ₃ ²⁻)	28
Strontium (Sr ²⁺)	6,2
Phosphat (PO ₄ ²⁻)	1,4
Silikat (SiO ₃)	3,0
Mangan (Mn)	1,2
Fluor (F)	1,0
Molybdat (MoO ₄)	0,6
Lithium (Li)	0,2
Summe	34.003,6

Corophium volutator ist euryhalin und toleriert eine Salinität von 2 - 50, bevorzugt aber eine Salinität von 10 - 30 (Mc Lusky 1970). Da Blutuntersuchungen von *C. volutator* gezeigt haben, dass eine Salinität unter 20 möglicherweise zum osmotischen Stress führt (Mc Lusky 1970) und der Test nach Roddie & Thain (2001) bei einer Salinität von mindestens 25 durchgeführt werden soll, werden sowohl Meerwasser als auch Brackwasser Sedimente mit künstlichem Meerwasser einer Salinität von 30 (34,3 g/l Sigma Meersalz) getestet. Die Testansätze der Brackwassersedimente erfüllen dann in der Regel die erforderliche Test-Salinität. Die Salinität darf sich über den Testzeitraum maximal um ± 4 verändern (Roddie & Thain 2001). Die Testorganismen müssen vor Testbeginn an die voraussichtliche Test-Salinität akklimatisiert

werden, wobei eine Differenz von maximal 3/ Tag nicht überschritten werden sollte (Roddie & Thain 2001).

6.3.7. Natürliches Kontrollsediment/ Referenzsediment

Bei jedem Test werden zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Testsystems und der Fitness der Testorganismen negative Kontrollen mitgeführt. An das Kontrollsediment (Referenzsediment) werden folgende Anforderungen gestellt:

1. Das Kontrollsediment kann an der *Corophium*-Probenahmestelle genommen werden, die Schadstoffbelastung sollte geringer oder gleich groß wie die Hintergrundkonzentration des Referenzgebietes sein (Roddie & Thain 2001; ISO DIS 16712).
2. Der organische Gehalt sollte zwischen 0,5 und 4% (Trockengewicht),
3. die Fraktion < 63 µm sollte zwischen 5 und 20% und
4. die mittlere Korngröße sollte zwischen 90 – 125 µm (Roddie & Thain 2001) liegen.

Als Kontrollsediment wurde das Sediment der *Corophium*-Probenahmestelle aus der Surfbucht auf Norderney verwendet. Die chemische Analyse des Kontrollsediments wurde bereits dargestellt (Tabelle 16 und Tabelle 17). Der organische Gehalt betrug 4% (Bestimmung nach DIN 38 414-2), die mittlere Korngröße war 60 µm und der Anteil der Fraktion < 63 µm betrug 53% (lasertechnische Partikelgrößenanalyse (HELOS)).

Damit war das Sediment feinpartikulärer als von Roddie & Thain (2001) empfohlen. Jedoch wurde von uns in Sedimenten, die der Korngrößenverteilung nach Roddie & Thain entsprachen, stets *Corophium arenarium* nicht aber *C. volutator* gefunden.

Ausschlaggebend für die Verwendung des Sediments als Kontrollsediment war die Einhaltung der Kontrollmortalität (Environment Canada 1995). Die Mortalität in der Kontrolle erfüllte in allen Tests das Gültigkeitskriterium.

Der organische Anteil, die Partikelgrößenverteilung und die chemische Vorbelastung des Kontrollsediments sind von großer Bedeutung bei der Nutzung des Kontrollsediments als Matrix für das Dotieren mit Einzelstoffen. Diese Parameter haben einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe und die Mischtoxizität. Sie waren im Rahmen des Projekts bei der Etablierung von Referenzsubstanzen von Bedeutung (siehe Kapitel 6.3.9).

6.3.8. Synthetisches Kontrollsediment

Ein unkontaminiertes, standardisiertes Kontrollsediment, das international jederzeit verfügbar ist, kann nur in Form eines synthetischen (künstlichen) Sediments gewonnen werden. Bei einem synthetischen Sediment sind alle Bestandteile käuflich erhältlich, es enthält keine biologisch aktiven Bestandteile.

Bisher gibt es verschiedene Untersuchungen mit künstlichen Sedimenten für Süßwasser-Sediment-Tests (Pascoe et al. 1990; Walsh et al. 1990; Environment Canada 1992; Walsh et al. 1992; Suedel & Rodgers 1994; Weber et al. 1996; Fleming et al. 1998; Gratzner & Ahlf 2001), jedoch wurde bisher international noch kein künstliches Sediment für marine Sedimentbiotests entwickelt (auch Environment Canada 1992). Die Entwicklung künstlicher Sedimente ist mit folgenden Schwierigkeiten verbunden:

- Aufgrund der Variabilität natürlicher Sedimente ist es nicht möglich ein künstliches Kontrollsediment zu entwickeln, das für alle limnischen bzw. alle marinen Sedimente repräsentativ ist.
- Synthetische Sedimente können nicht die komplexen biologischen und physikalisch-chemischen Gradienten natürlicher Sedimente simulieren (Fleming et al. 1998).

- Die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen ist von den Sedimenteigenschaften abhängig und kann somit einen Einfluss auf die Toxizität haben. Für die Bioverfügbarkeit spielen u.a. die Partikelgrößenverteilung, der organische Anteil (Höss et al. 1997, Fleming et al. 1998) sowie das Redoxpotential (Fleming et al. 1998) eine große Rolle.
- Die käuflichen Bestandteile sind natürlichen Ursprungs und bedürfen z. T. ebenfalls einer Behandlung zur Dekontamination (Bias 1981) und zur Sterilisation. Diese Behandlungen können einen Einfluss auf die Matrix haben (Deans et al. 1982).
- Bei synthetischen Sedimenten ist keine Mikroflora vorhanden, so dass in Abhängigkeit von der Testspezies und der Testdauer zusätzlich gefüttert werden muss. Der Zusatz von Futter kann einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe und der Exposition der Testorganismen gegenüber den Schadstoffen haben (Pascoe et al. 1990).

Für die Entwicklung eines künstlichen Sediments für den akuten marinen Amphipodentest kommen weitere Aspekte hinzu:

- Marine Amphipoden gelten als schwierig zu kultivieren und haben spezifische Anforderungen an die Sedimenteigenschaften (Environment Canada 1995).
- *Corophium volutator* kann sich zwar in Sedimente einer Partikelgrößenverteilung von feinstem Schlick bis groben Sand (44 µm – 1539 µm) eingraben (Meadows 1964), jedoch bevorzugt er sowohl im Freiland als auch in Laborversuchen feinpartikuläre Sedimente mit einem Anteil von ca. 37% Silt oder Ton (Mc Lusky 1967) und einem hohen organischen Anteil (Meadows 1964). Beide Charakteristika sind gerade für die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen von Bedeutung.
- Die Bevorzugung derartiger Sedimente ist vermutlich sowohl auf den Bau von Wohnröhren als auch auf die Ernährungsweise von *Corophium volutator* zurückzuführen (Meadows 1964). In Untersuchungen zur Cadmium-Akkumulation wurde *C. volutator* bis zu 32 Tagen in Quarzsand

unterschiedlicher Korngröße gehalten, wobei keine Angaben zur Fütterung gemacht wurden. Der Röhrenbau war bei Quarzsand mittlerer bis grober Korngröße aufgrund des Kollabierens der Wohnröhren erschwert (Bias 1981).

- *C. volutator* gilt als selektiver Detritus-Fresser, der hauptsächlich Diatomeen, Mikroalgen und Bakterien (Meadows 1964; Fenchel et al. 1975; Smith et al. 1996) angeheftet an Sedimentpartikeln zwischen 4 - 63 µm (Fenchel et al. 1975) frißt. Neben der morphologisch bedingten Selektion von feinen Partikeln als Nahrungsquelle (Fenchel et al. 1975) führt diese Selektion auch zur Aufnahme eines relativ hohen Anteils von Bakterien (Fenchel et al. 1975); denn je feiner das Sediment, desto größer ist die Partikeloberfläche und damit auch die Adsorptionsfläche für Bakterien und somit der organische Gehalt (Meadows et al. 1964). Darüber hinaus wird vermutet, dass die Aufnahme von Detritus auch für den Ionenhaushalt von *Corophium* von Bedeutung ist (Mc Lusk 1967).

Bei der Entwicklung eines geeigneten künstlichen Sediments für den akuten Amphipodentest mit *C. volutator* sind folglich wichtige Aspekte zu beachten, die zugleich einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen haben.

Synthetische Kontrollsedimente sind vor allem für die Einzelstoffprüfung und für die Herstellung einer Verdünnungsreihe kontaminierter (natürlicher) Sedimente von Bedeutung (Nelson et al. 1993, Suedel & Rodgers 1994). Da jedoch das Hauptziel des Projekts die Implementierung mariner Biotests für die Bewertung von Meer- und Brackwasser Sedimenten war, kam die Entwicklung eines künstlichen Sediments nur für den Einsatz der Referenzsubstanz in Betracht. Aufgrund der Komplexität des Themas und der zusätzlichen Schwierigkeit des reproduzierbaren Dotierens von Sedimenten (siehe dazu Kapitel 6.3.9) wurde von der Entwicklung eines künstlichen Sediments Abstand genommen. Es wurde lediglich ein Fütterungsversuch mit *C. volutator* und Quarzsand unternommen (siehe Kapitel 6.4.1).

6.3.9. Referenzsubstanz - Tests mit dotiertem Sediment

Zur Kontrolle des Testaufbaus und der Sensitivität der Testorganismen sollte bei jedem Test eine Referenzsubstanz mitgeführt werden. Da in den Testvorschriften (ISO DIS 16712, Roddie & Thain 2001) keine Referenzsubstanz mit ihrem Sensitivitätsbereich festgelegt ist, war die Prüfung einer geeigneten Referenzsubstanz im Rahmen des Projekts zu erarbeiten. An eine Referenzsubstanz für Sedimentbiotests werden folgenden Anforderungen gestellt (ergänzt nach Environment Canada 1995):

- Die Referenzsubstanz sollte leicht ins Sediment eingebracht und homogen verteilt werden können.
- Der Zeitraum, der zur Einstellung des Equilibriums benötigt wird, sollte angemessen sein (Stunden bis Tage).
- Die Dosis-Wirkungskurve sollte für den ausgewählten Testorganismus und Endpunkt geeignet sein.
- Der analytische Nachweis der Substanz sollte im Wasser, Sediment oder Testorganismus leicht und präzise möglich sein.
- Die Humantoxizität sollte möglichst gering sein.
- Eine hohe Stabilität gegenüber Licht, Luft und der Labor-/ Testtemperatur sollte gegeben sein.
- Sie sollte einen hohen Reinheitsgrad aufweisen.
- Die Anwendung von Lösungsmitteln /Trägerstoffen sollte minimiert werden.

Eine Auswahl möglicher Referenzsubstanzen wurde unter diesen Gesichtspunkten von Environment Canada (1995) einem Ranking unterzogen. Dieser Empfehlung und dem OSPAR-Ringtest 1993 (Bowmer 1994) folgend wurde zunächst Fluoranthen (auch Schipper et al. 1999; Roddie & Thain 2001) ausgewählt und für die Dotierung von natürlichen Kontrollsedimenten eingesetzt.

Um eine vergleichende Bewertung der Testergebnisse vornehmen zu können, wurde sich sowohl für das Dotieren der Sedimente (*Spiking*) mit Fluoranthen als auch bei der Testdurchführung an die OSPAR-Ringtest-Anleitung (Bowmer 1994) gehalten. Als Sediment wurde das Kontrollsediment aus Norderney (Surfbucht) eingesetzt. Die Sedimenteigenschaften lagen bezüglich der Korngrößenverteilung zwar außerhalb der empfohlenen Richtlinien-Werte, jedoch in der Spannbreite der Referenzsedimente der damaligen Ringtest-Teilnehmer (siehe Tabelle 19). Bezüglich des organischen Anteils erfüllte das Kontrollsediment die Richtlinien-Empfehlung, er war jedoch im Vergleich zu den anderen Laboratorien am höchsten.

Tabelle 19: Gegenüberstellung der Kontrollsedimenteigenschaften: OSPAR-Ringtest-Richtlinie (Bowmer 1994), Norderneyer Kontrollsediment und Kontrollsedimente der OSPAR-Ringtest Teilnehmer 1993 (Bowmer 1994)

	Empfohlener Wert in Richtlinie	Norderneyer Kontrollsediment	OSPAR-Ringtest 1993 Min.-Max. Werte Kontrollsediment 9 Laboratorien
TOC [%] (TG)	0,5 – 4	4	0,3 – 3,5
Anteil Fraktion < 63 µm [%]	5 – 20	53	5,4 – 81,9
Mittlere Korngröße [µm]	90 – 125	60	37 - 176

Als Testtiere wurden in getrennten Testreihen sowohl Norderneyer-Freilandtiere als auch die Tiere aus eigener Labor-Zucht (siehe Kapitel 6.4) verwendet. Es wurde eine Fluoranthen-Konzentrationsreihe von: 1, 4, 10, 40 und 100 mg/kg TG eingesetzt (3 Parallelen á 10 Tiere). Bei beiden Testreihen wurde ein maximale Mortalität in den (gemittelten) Testansätzen von 10% ermittelt. Sie lag im Bereich der Testvariabilität, so dass selbst bei der höchsten Konzentration kein toxischer Effekt festgestellt wurde. Dagegen wurde beim OSPAR-Ringtest für Fluoranthen im akuten Amphipodentest mit *Corophium volutator* ein LC₅₀-Wert von 4,1 – 33,1 mg/ kg TG (Min.-Max.) ermittelt (Mittelwert von 9

Laboratorien: 19,9 mg/kg TG; Standardabweichung: 10,3; Variationskoeffizient: 51,9%) (Bowmer 1994).

Für die Abweichung unserer Testergebnisse wurden folgende Gründe in Betracht gezogen:

1. Das Dotieren der Sedimente war nicht erfolgreich.
2. Die Sedimenteigenschaften, der hohe Anteil < 63 µm und der hohe organische Anteil, setzten die Bioverfügbarkeit von Fluoranthen herab.
3. Die Testorganismen waren nicht sensitiv gegenüber Fluoranthen.

Die OSPAR-Anleitung für das Dotieren von Referenzsedimenten stellte sich als nicht geeignet für feinputikuläre Sedimente mit einem hohen organischen Anteil (Schlick) heraus. Es sollte für jede Konzentration eine Sedimentunterprobe zu 98% getrocknet werden, die dann mit dem in Aceton gelöstem Fluoranthen dotiert, als Stock-Sediment mit dem restlichen Sediment des Testansatzes homogenisiert und für 4h- 24h horizontal geschüttelt werden sollte. Unser schlickiges Referenzsediment war jedoch nach 98%iger Trocknung steinhart, so dass es zunächst mechanisch aufbereitet werden musste, bevor es als Stock-Sediment zur Verfügung stand. Aufgrund der starken thermischen und mechanischen Manipulation des Stock-Sediments im Vergleich zum restlichen Sediment des jeweiligen Testansatzes ist nicht auszuschließen, dass keine homogene Verteilung des Fluoranthens im gesamten Sediment erreicht werden konnte.

Darüber hinaus ist aufgrund der im weiteren detektierten, relativ hohen Fluoranthen Standort-Vorbelastung von 225 µg/kg TG eine Toleranz der Testorganismen gegenüber Fluoranthen nicht auszuschließen.

Es wurden daraufhin folgende Konsequenzen gezogen:

1. Für die Untersuchung von natürlichen Brackwasser/Meerwasser-Sedimentproben wurde im Folgenden routinemäßig aufgrund der möglichen Fehlerquellen des Dotierens und des Zeitaufwandes kein

dotierter Sediment-Referenztest mitgeführt. Stattdessen wurde ein Wasserphase-Test mit der Referenzsubstanz Ammoniumchlorid in die Routine aufgenommen. Er diene der Überwachung der Sensitivität der Testorganismen. Der Testaufbau des Wasserphase-Tests unterscheidet sich vom Sedimenttest durch das Fehlen des Sediments und durch die Dauer von 72h anstelle von zehn Tagen (siehe Kapitel 6.3.12). Die weitere Überwachung der Funktionsfähigkeit des Testaufbaus wurde durch chemisch-physikalische Parameter vorgenommen.

2. Der akute Amphipodentest mit dotierten Sedimenten wurde im Folgenden auf internationale Kalibrierungen im Rahmen des EU-Projektes BEQUALM "Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes" fokussiert.

6.3.10. BEQUALM-Ringtest mit Bioban dotiertem Sediment

Das BEQUALM-Projekt - "Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes" - war von der Europäischen Kommission im Rahmen des *Standards, Measurement and Testing (SMT) Programme* gefördert. Das Ziel des Projekts war die Entwicklung von Qualitätssicherungs- und Kontrollverfahren für marine biologische Verfahren, die in internationalen Monitoring Programmen wie z.B. im OSPAR JAMP (*Joint Assessment and Monitoring Programme*) angewendet werden.

In *Workpackage 2* des Projekts (Koordination: Herr J. Thain und Frau Dr. Y. Allen, CEFAS, UK) war neben anderen Biotests der Gesamtsedimenttest mit *Corophium volutator* Gegenstand der Qualitätssicherung. Da das BEQUALM-Projekt bereits ein Jahr vor unserem Projekt begann, waren wir an einem einführenden methodischen Workshop nicht beteiligt. Dieser Rückstand wurde jedoch durch einen Besuch bei CEFAS aufgeholt. Im Rahmen von BEQUALM wurden zwei Ringtests mit dotierten Sedimenten durchgeführt, an denen wir mit dem akuten Amphipodentest teilgenommen haben.

Bei dem ersten Ringtest (Februar 2001) wurde das Breitband-Bakterizid Bioban P1487 als Referenzsubstanz eingesetzt. Bioban wird zur Konservierung und Lagerung von Öl angewendet und besteht aus ca. 80% 4-(2-Nitrobutyl) Morpholine, ca. 10% 4,4' –(2-Ethyl-2Nitrotrimethylen) Dimorpholine, ca. 4% 1-Nitropropane, ca. 5% inaktive Destillations-Rückstände (Bjørnstad et al. 1993). Es wurde von CEFAS ausgewählt, da es stabil ist und im Rahmen eines OSPAR–Ringtests (1993) gute Ergebnisse erzielte (CEFAS 2002).

Es wurde von CEFAS Kontrollsediment (Shoebury Sands, Essex) und eine Konzentrationsreihe von mit Bioban dotiertem Referenzsediment (96; 128; 160; 192; 223 und 255 mg/kg TG Bioban) sowie eine unbekannte Konzentration (dem EC_{50} -Wert entsprechend) an 11 Ringtest-Teilnehmer (ungekühlt) verschickt. Die Proben sollten bei 4°C gelagert und innerhalb von 4 Wochen im Test eingesetzt werden. Die Ringtest-Auswertung wurde von CEFAS vorgenommen.

Die meisten Ringtest-Teilnehmer ermittelten bei der Bioban-Sediment-Konzentrationsreihe einen deutlich geringeren Effekt als erwartet, so dass vielfach selbst bei der höchsten Konzentration kein EC_{50} -Wert erreicht wurde (siehe Abb. 15 (CEFAS 2002)). Unser Labor (Nummer 15) erzielte ebenfalls bei der höchsten Konzentration keinen EC_{50} -Wert (Abb. 16). Für die Konzentrationsreihe wurde der erwartete EC_{50} -Wert von 167 mg/kg TG von einem mittleren EC_{50} -Wert von 181 mg/kg TG überschritten (mittlerer CV innerhalb eines Labors: 6,6%; Laborübergreifender CV: 36,2%). Die unbekannte Konzentration sollte 50% Effekt erzielen, erreichte aber einen mittleren Effekt von 62,2% (mittlerer SD innerhalb eines Labors: 7,9%; Laborübergreifender CV: 24,2%) bei einer mittleren Kontrollmortalität von 2,7% (CEFAS 2002).

Der Grund für die abweichenden Ringtest-Ergebnisse ist bisher nicht geklärt. In Voruntersuchungen von CEFAS wurde eine signifikante Zunahme des EC_{50} -Werts gegenüber des vorangegangenen Ringtests festgestellt. Dies wurde jedoch in der zu untersuchenden Konzentrationsreihe berücksichtigt. Die Ergebnisse der unbekannten Konzentration weisen nicht auf eine Abnahme der Sensitivität der Testorganismen hin, sondern eher auf eine Variabilität der dotierten Sedimentproben.

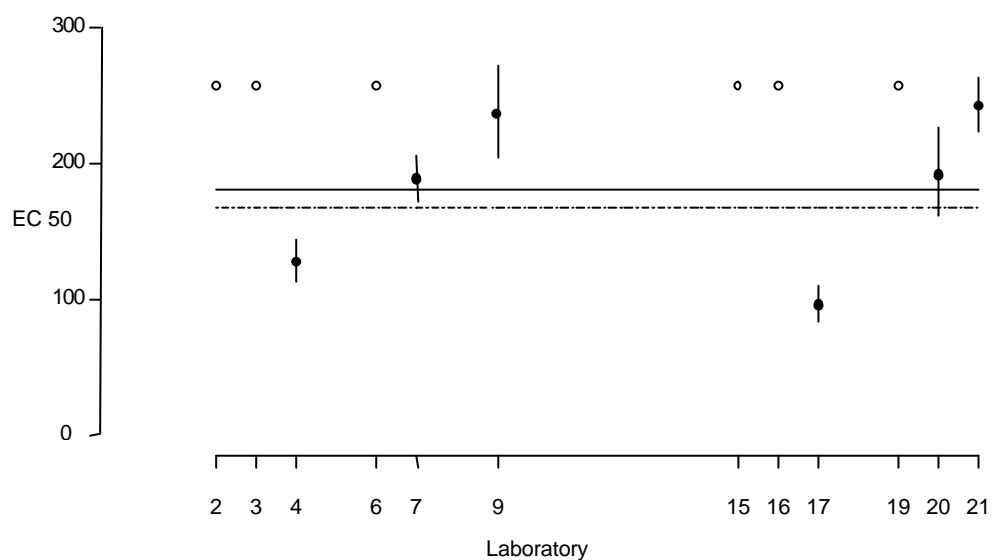


Abb. 15: Labor- EC_{50} -Werte (\pm 95% Konfidenzintervall) für den *Corophium* BEQUALM-Ringtest-1 mit Bioban (CEFAS 2002)

Legende:

—	Gesamtmittelwert
----	erwarteter Referenzwert des leitenden Laboratoriums (CEFAS)
o	höchste Konzentration der Laboratorien, die keinen EC_{50} -Wert erreichten

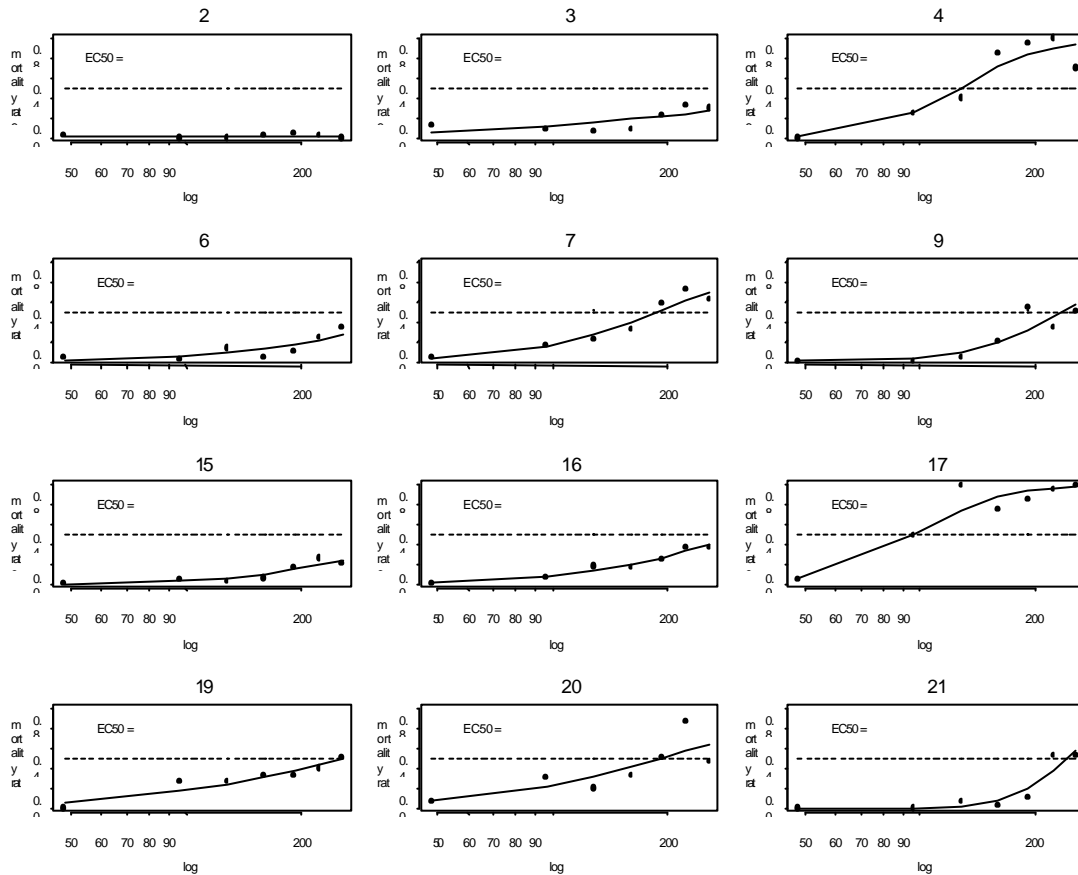


Abb. 16: Dosis-Wirkungskurven für den *Corophium* BEQUALM-Ringtest-1 mit Bioban (CEFAS 2002). Die gepunktete Linie gibt 50% Mortalität an.

6.3.11. BEQUALM-Ringtest mit Ivermectin dotiertem Sediment

Aufgrund der Schwierigkeiten mit Bioban wurde ein zweiter Ringtest mit der von CEFAS ausgewählten Referenzsubstanz Ivermectin durchgeführt. Ivermectin wird als Antihelminthikum in der Schweine- und Rindermast (CEFAS 2002) sowie in Fischfarmen gegen die ectoparasitischen See-Läuse eingesetzt (Davies et al. 1998; Collier & Pinn 1998). Es gilt als sehr toxisch gegenüber Sedimentbewohnern (Collier & Pinn 1998; Davies et al. 1998; CEFAS 2002).

Ivermectin (22,23-Dihydroavermectin B1) ist ein Substanz-Gemisch, das mit einer Reinheit von 95% produziert wird. Das im Ringtest eingesetzte Ivermectin

wurde bereits vom Hersteller Getreide untermengt (Präparat für die Schweinezucht), was zwar den Umgang mit der hochtoxischen Substanz erleichtern, jedoch langfristig zu Ungenauigkeiten führen kann.

Die 14 Ringtest-Teilnehmer erhielten von CEFAS ein mit Ivermectin dotiertes Stamm-Sediment (100 mg/kg TG), mit dem sie die Konzentrationsreihe mit ihrem eigenen Referenzsediment nach Anleitung herstellen sollten. Somit kamen im Vergleich zum ersten Ringtest zwei Variable hinzu: unterschiedliche Referenzsedimente und das Verfahren des Dotierens der Sedimente. Aufgrund der bereits beschriebenen Eigenschaften unseres Kontrollsediments, nahmen wir an dem Ringtest mit dem Referenzsediment von CEFAS (Shoebury Sands, Essex) teil. Ferner wurden von CEFAS zwei Sedimente mit unbekannter Ivermectin-Konzentration (dem EC_{50} -Wert und EC_{100} -Wert entsprechend) versandt. Die Proben sollten bei 4°C gelagert und binnen 4 Wochen untersucht werden.

In Tabelle 20 sind die aufgrund von Voruntersuchungen und Literaturangaben von CEFAS erwarteten EC_{50} -Werte sowie die im Ringtest anhand der Konzentrationsreihe erzielten, gemittelten EC_{50} -Werte dargestellt (nach CEFAS 2002). Der Variationskoeffizient hat zwischen dem Ringtest 1 und 2 von 36,2 % auf 95% deutlich zugenommen. Die Heterogenität der Testergebnisse wurde auch in den unterschiedlichen Dosis-Wirkungskurven der Ringtestteilnehmer deutlich (siehe Abb. 18). Vermutlich war dies auf den Einsatz unterschiedlicher Referenzsedimente und auf das Dotieren der Sedimente zurückzuführen. CEFAS hatte zur Beschreibung des Referenzsedimentes nur den Parameter Trockengewicht eingefordert. Wichtige Parameter wie der organische Anteil und die Korngrößenverteilung fehlten. Das Referenzsediment von CEFAS hatte folgende Eigenschaften:

- Trockengewicht von 79,8%,
- organischer Anteil (TOC) von 1,7%,
- der Anteil der Fraktion < 62,5 µm betrug 4,94% und

➤ die mittlere Korngröße 146 µm.

Das Referenzsediment war somit sandiger als in der Richtlinie (Roddie & Thain 2001) empfohlen. Aufgrund der fehlenden Angaben zu den Sediment-eigenschaften der anderen Ringtest-Teilnehmer ließ sich das Ringtest-Ergebnis nicht weiter analysieren.

Tabelle 20: *Corophium* BEQUALM Ringtest 1 (Bioban) und 2 (Ivermectin) nach CEFAS 2002. L = Anzahl Ringtestteilnehmer; CV = Variationskoeffizient.

Test	L	Erwarteter EC ₅₀ -Wert [mg/kg TG]	Erzielter, gemittelter EC ₅₀ -Wert [mg/kg TG]	Mittlerer CV laborintern [%]	CV labor- übergreifend [%]
Ringtest 1 Bioban	6	167	181	6,6	36,2
Ringtest 2 Ivermectin	12	0,0280	0,0457	28,6	95,0

Von uns (Labor 15) wurde ein EC₅₀-Wert von 0,0493 ermittelt, der nur 8% von dem Gesamtmittelwert abweicht (siehe Abb. 17).

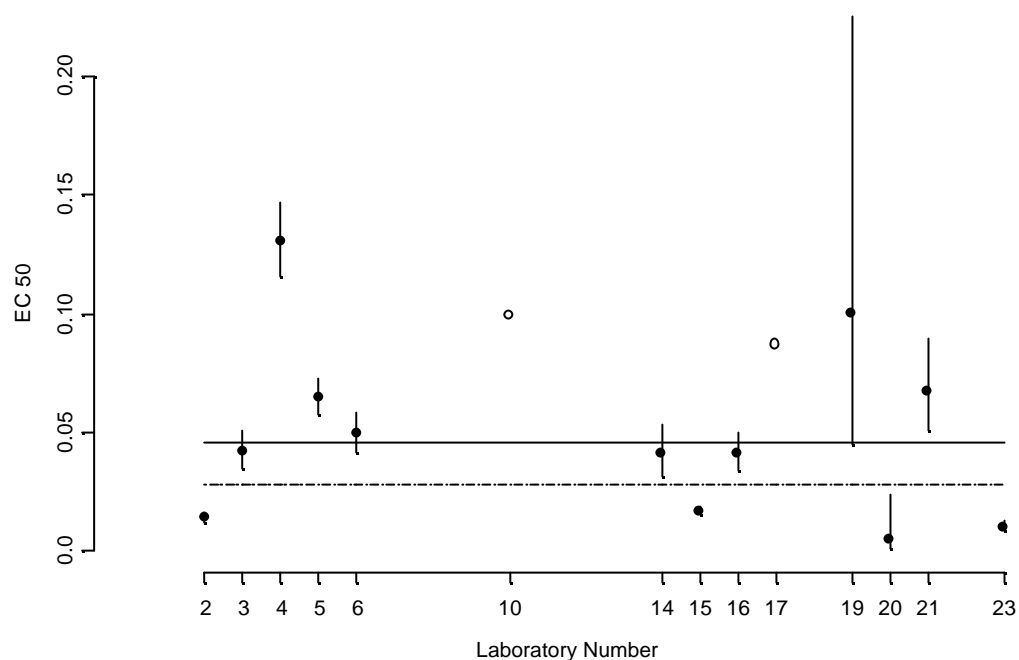


Abb. 17: Labor-EC₅₀-Werte (\pm 95% Konfidenzintervall) für den *Corophium* BEQUALM-Ringtest-2 mit Ivermectin als Referenzsubstanz (CEFAS 2002)

Legende:

—	Gesamtmittelwert
----	erwarteter Referenzwert des leitenden Laboratoriums (CEFAS)
o	höchste Konzentration der Laboratorien, die keinen EC ₅₀ -Wert erreichten

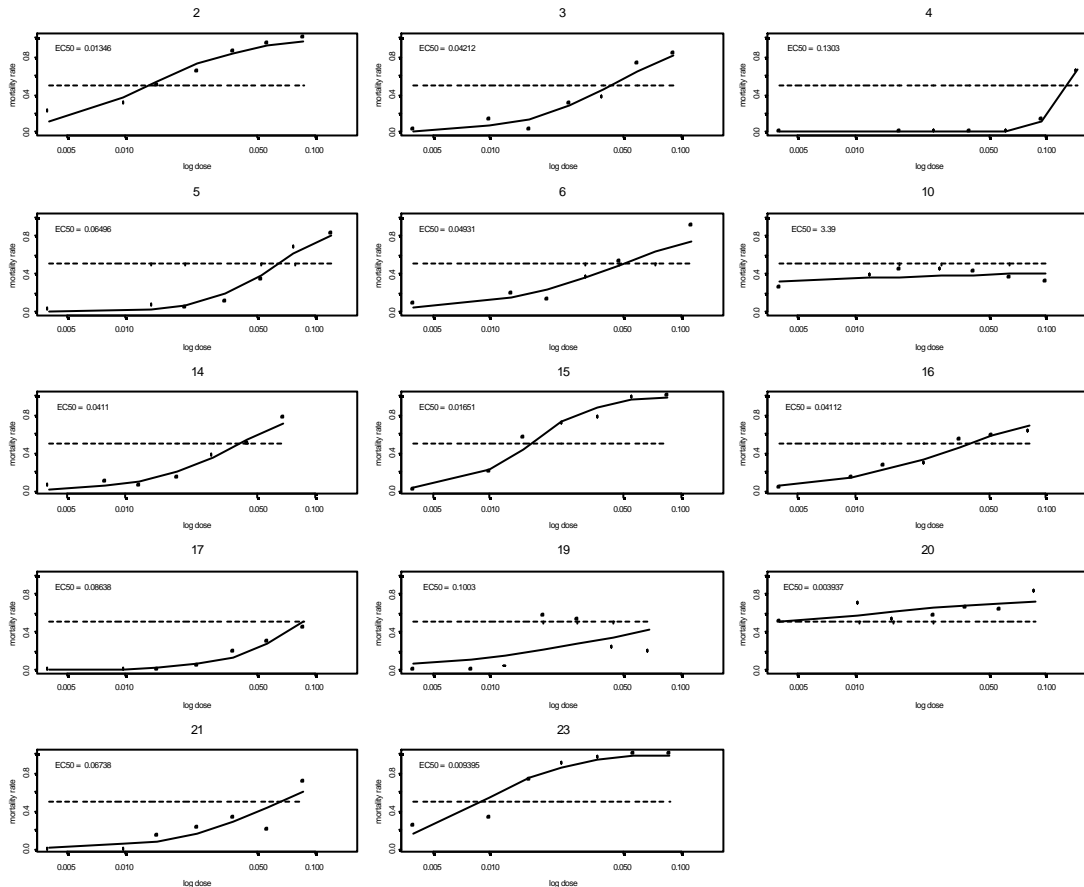


Abb. 18: Dosis-Wirkungskurven für den *Corophium* BEQUALM-Ringtest-2 mit Ivermectin. Die gepunktete Linie gibt 50% Mortalität an (CEFAS 2002).

Die Vermutung, dass der hohe Variationskoeffizient zwischen den Laboratorien beim Ringtest 2 auf die unterschiedlichen Referenzsedimente und das Dotieren der Sedimente zurückzuführen war, wurde auch durch die Testergebnisse der unbekannten Konzentrationen bestätigt. So betrug im Ringtest 2 der Variationskoeffizient zwischen den Laboratorien ebenfalls 20 – 28%. Dies entspricht einem für Biotest-Ringtests üblichen Variationskoeffizienten.

Tabelle 21: Vergleich der erwarteten und erzielten Effekte der unbekannten Konzentrationen in Ringtest 1 (Bioban) und Ringtest 2 (Ivermectin).
L = Anzahl Ringtestteilnehmer, CV = Variationskoeffizient (nach CEFAS 2002)

Test	L	Erwarteter Effekt [%]	Erzielter, gemittelter Effekt [%]	Mittlerer CV laborintern [%]	CV labor-übergreifend [%]
Ringtest 1 (Bioban)					
Kontrolle	12		2,7	3,5	1,9
Unbekannte 1	12	50	62,2	7,9	24,2
Ringtest 2 (Ivermectin)					
Kontrolle	14		2,7	4,8	14,0
Unbekannte 1	14	100	88,3	6,7	28,0
Unbekannte 2	14	50	47,3	8,8	20,2

Die Streuung der Laboratorien für die Unbekannte 1 und Unbekannte 2 des Ringtests 2 (Ivermectin) ist in Abbildung 19 und 20 grafisch dargestellt. Unser Labor (Nr. 15) lag bei beiden Unbekannten im Bereich der erwarteten Mortalitätsrate. Das heißt, dass unsere Testorganismen (*Corophium volutator* - Freilandpopulation) und unser Testaufbau die gewünschte Sensitivität aufzeigten und die Anforderungen internationaler Kalibrierung und Qualitätssicherung erfüllten.

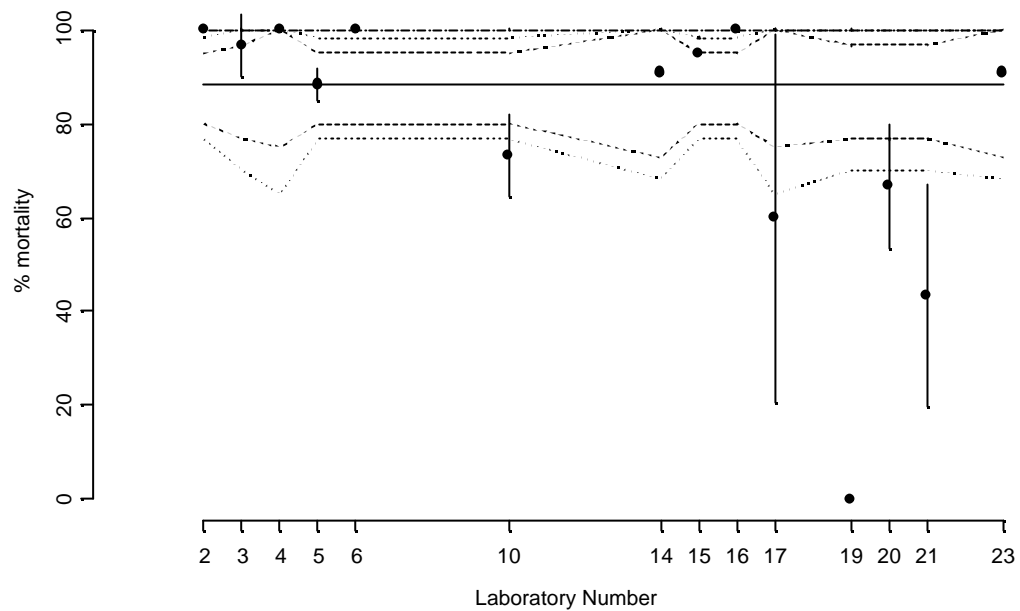


Abb. 19: Labor-Mittelwerte der 1. unbekannten Probe (\pm 95% Konfidenzintervall) für *Corophium* BEQUALM-Ringtest-2 mit Ivermectin als Referenzsubstanz (CEFAS 2002)

Legende:

—	Gesamtmittelwert
.....	erwartete Mortalität (100%) (CEFAS)
----	95 und 99 % Referenzband für jedes Laboratorium in Abhängigkeit des Test-Designs (Anzahl Testorganismen, Anzahl Parallelen)

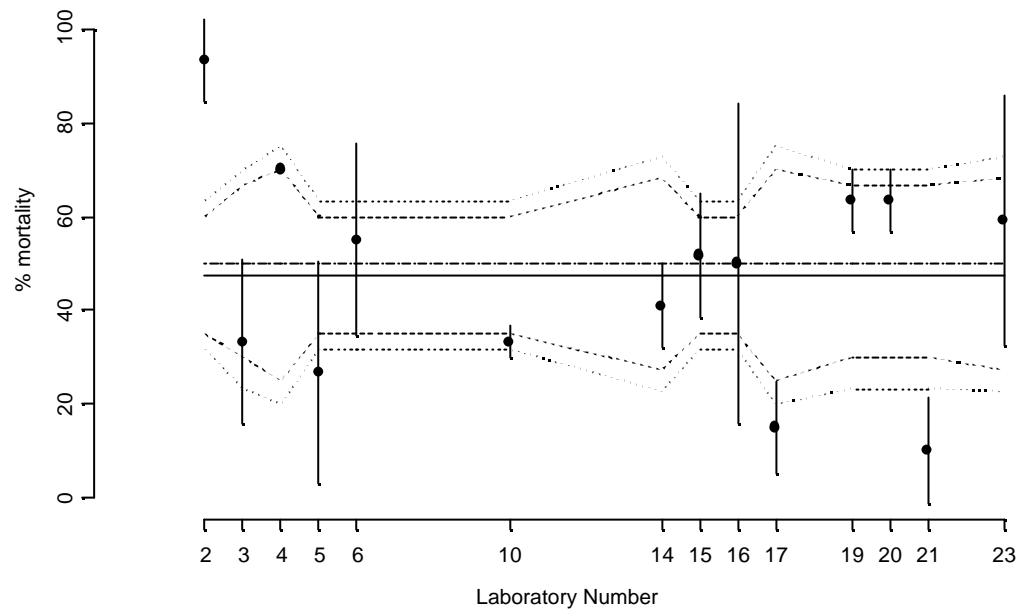


Abb. 20: Labor-Mittelwerte der 2. unbekannten Probe (\pm 95% Konfidenzintervall) für *Corophium* BEQUALM-Ringtest-2 mit Ivermectin als Referenzsubstanz (CEFAS 2002)

Legende:

—	Gesamtmittelwert
.....	erwartete Mortalität (50%) (CEFAS)
-----	95 und 99 % Referenzband für jedes Laboratorium in Abhängigkeit vom Test-Designs (Anzahl Testorganismen, Anzahl Parallelen)

6.3.12. Ammoniumchlorid als Referenzsubstanz

Nachdem Versuche zum Dotieren von Kontrollsedimenten mit Referenzsubstanzen und Wasserphase-Tests mit verschiedenen Referenzsubstanzen (u.a. auch mit Kupfer) durchgeführt worden waren, wurde ein 72 Stunden Wasserphase-Test mit Ammonium (Ammoniumchlorid) als Referenzsubstanz eingeführt. Dieser Test wird in den Niederlanden seit einigen Jahren routinemäßig mitgeführt (Schipper et al. 1999) und wurde aufgrund unseres Engagements auch im Entwurf des ISO Standards berücksichtigt (ISO DIS 16712). Der Vorteil dieser Referenzsubstanz und dieses Aufbaus ist:

1. Es handelt sich um eine Reinsubstanz, deren Humantoxizität auch bei einem großen Testvolumen von 900 ml je Testgefäß handhabbar ist.
2. Es kann auf die langjährigen Erfahrungen aus den Niederlanden bei der Ermittlung der Signalwerte und Alarmwerte (tolerierte Schwankungsbreite der EC₅₀-Werte) von Ammoniumchlorid gegenüber *Corophium volutator* zurückgegriffen werden.
3. Das Dotieren von Kontrollsedimenten (*Spiken*) ist ein zeitaufwendiges Verfahren, das langfristig aufgrund der Heterogenität der natürlichen Kontrollsedimente mit einer gewissen Variabilität verbunden ist. Bei der Wahl von Ammoniumchlorid als Referenzsubstanz wird der Test ohne Sediment durchgeführt, so dass das aufwendige Dotieren des Kontrollsediments entfällt. Da *Corophium* nicht stressfrei 10 Tage ohne Sediment leben kann, ist der Wasserphase-Test auf 72 Stunden (maximal 96 Stunden) begrenzt.
4. Der direkte Vergleich und somit die Überwachung der Sensitivität der Testorganismen ist einfach.
5. Mögliche negative Störungen (Belüftung, Temperatur etc.) während des 10-Tage-Tests werden über die negativen Kontrollen mit unkontaminiertem Sediment überwacht.

Je Test wurden drei Konzentrationen Ammoniumchlorid à zwei Replikate und zwei Kontrollen für die Wasserphase mit je zehn Tieren mitgeführt. Innerhalb eines Jahres (September 2001 bis September 2002) wurden von uns 7 Wasserphase-Tests mit der Referenzsubstanz Ammoniumchlorid durchgeführt. Es wurde ein EC₅₀-Wert zwischen 40 mg/l bis 85 mg/l Ammonium (pH 8 ± 0,5) ermittelt.

Aus den Niederlanden wurde folgender Signal- und Alarmbereich für den EC₅₀-Wert (Kontrollkarte) bei pH-Wert 8 (72 Stunden) empfohlen (schriftl. Mitteilung Dr. K. Kaag, TNO):

- Signalbereich: 47,4 – 164,6 mg/l
- Alarmbereich: 18,1 – 193,9 mg/l

Damit liegen die von uns ermittelten EC₅₀-Werten im unteren bis mittleren Signalbereich.

Es ist darauf hinzuweisen, dass bei Anwendung des Amphipodentests für eine Einzelstoffprüfung zusätzlich zum (oder anstelle des) Ammoniumchlorid-Wasserphase-Tests ein mit einer Referenzsubstanz (z.B. Fluoranthen) dotierter Gesamtsedimenttest mitgeführt werden sollte, um auch den Vorgang des Dotierens der Sedimente zu überwachen.

6.3.13. Tests mit Meer-/ Brackwasser-Sedimenten

Der Amphipodentest wurde erfolgreich auf natürliche Sedimente angewendet. Bisher wirkten nur wenige natürliche Sedimente auf *Corophium* toxisch in Bezug auf die prozentuale Mortalität. Im Testverfahren werden die subletalen Parameter „Sedimentmeidung“ und „Wiedereingrabeverhalten“ ins Kontrollsediment“ am Testende erhoben, sie wurden jedoch international bisher nicht zur Bewertung von Sedimenten herangezogen. Eine Bewertung erfolgte lediglich aufgrund der Mortalität. Im Rahmen des Projekts wurde versucht, die Verhaltens-Parameter in standardisierter Weise zu erheben und in die Bewertung zu integrieren, um die Aussagekraft und Sensibilität des Tests zu steigern. Darüber hinaus wurde der Zustand der Tiere bei Testende differenziert als „tot“, „moribund“ und „fit“ (siehe Anhang).

6.3.14. Implementierung des akuten Amphipodentests

6.3.14.1. Short Course

Anfang April 2001 gaben wir den PraktikerInnen (Frau S. Pfitzner, BfG, Herrn Dr. U. Noack und Frau S. Becker, Dr. U. Noack Laboratorium für Angewandte Biologie) eine theoretische und praktische Einführung in den akuten Amphipodentest mit *C. volutator*. Sie umfasste einen Seminar zur Ökologie, Probenahme, Testdurchführung und Auswertung sowie eine praktische Anleitung im Umgang mit den Tieren bei der Probenahme, Hälterung und Testung. Die taxonomische Bestimmung von *C. volutator*, insbesondere im Vergleich zu *C. arenarium* wurde an konservierten Tieren gezeigt. Umfangreiche Materiallisten, Protokolle zur Probenahme, Hälterung und Testdurchführung wurden verteilt und besprochen. Dies ermöglichte den KursteilnehmerInnen einen schnelleren Aufbau des Testsystems und harmonisierte die Testdurchführung in den verschiedenen Laboratorien.

6.3.14.2. Gemeinsame Probenahme zur Beschaffung von *Corophium volutator*

Nachdem das Dr. U. Noack-Laboratorium alle Vorbereitungen für die Hälterung von *C. volutator* getroffen hatte, wurde im April 2001 eine gemeinsame Probenahme für *Corophium* (einschl. Meerwasser und Sediment) auf Norderney durchgeführt. Die gemeinsame Probenahme hatte zum Ziel: Hilfestellung und Harmonisierung der Vorgehensweise vor Ort (insbes. Auffinden, Sieben und Dekantieren der Organismen), Versorgung der Tiere für den Transport, Beschaffung einheitlichen Tiermaterials für beide Institute sowie Kostenreduzierung.

6.4. Kultivierung und Reproduktion von *Corophium volutator* im Labor

Alle Testvorschriften zum akuten Amphipodentest sehen ursprünglich Wildfänge von *Corophium volutator* vor. Die Freilandentnahme von Testorganismen ist allerdings mit gravierenden Nachteilen verbunden:

- Freiland-Testorganismen unterliegen natürlichen Variationen einer Population, den Jahreszeiten und der Schadstoff-Vorbelastung des Standorts, die zu unerwünschten Effekten im Test führen können (Traunspurger & Drews 1996; Kater et al. 2000).
- Damit ist die Standardisierung der Testorganismen und somit die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit des Tests nicht gegeben.
- Die Tiere sind möglicherweise nicht das ganze Jahr über verfügbar.
- Freilandentnahme kann, in Abhängigkeit von der Entfernung des Labors von der Probenahmestelle und der Verfügbarkeit der Testorganismen, zeit- und kostenintensiv sein.
- Eine Freilandentnahme ist ein Eingriff ins Ökosystem, insbesondere in unter Naturschutz stehenden Referenzgebieten (in Deutschland: Nationalpark Wattenmeer).

Aus diesen Gründen, die auch für die Implementierung des *Corophium*-Tests innerhalb Deutschlands von großer Bedeutung sind, wurde beschlossen, *Corophium volutator* im Labor in Kultur zu nehmen. Nach unseren Literatur-Recherchen wurde das Reproduktionsverhalten von *C. volutator* über den gesamten Lebenszyklus im Labor bisher nicht untersucht. Es gibt lediglich Untersuchungen an Freilandpopulationen und Untersuchungen zur Reproduktion im Labor über einen kürzeren Zeitraum (eine Brut) (Conradi & Depledge 1998). In den Niederlanden (u.a. Frau Dr. B. Kater, RIKZ) und Großbritannien (u.a. Herr Dr. J. Thain, CEFAS) wurden Versuche zur Reproduktion vorgenommen, die jedoch nicht den erwarteten Erfolg brachten.

6.4.1. Fütterungsversuch mit *C. volutator*

Für eine kontinuierliche Hälterung und Zucht von *C. volutator* ist eine optimale Fütterung von Bedeutung. *C. volutator* gilt als selektiver Detritusfresser, der hauptsächlich Diatomeen und Bakterien (Meadows 1964; Fenchel et al. 1975; Murdoch et al. 1986; Gerdol & Hughes 1994a; Smith et al. 1996) angeheftet an Sedimentpartikeln zwischen 4 - 63 µm (Fenchel et al. 1975) frisst. In Laborversuchen wurde *C. volutator* mit dem käuflichen, synthetischem Präparat „Liquifry marine“ (Interpret, Prod. 0308, Label 03030) (Conradi & Depledge 1998) gefüttert.

Da für die Kultivierung von *C. volutator* eine optimale Fütterung gewährleistet sein muss, wurde ein Futter-Wahl-Versuch mit *Corophium* durchgeführt. Als alternative Futterquellen wurden eine benthische Kieselalge und „Liquifry Marine“ angeboten. Die benthische Alge *Navicula salinicola* wurde nach folgenden Kriterien ausgewählt: geeignete Fraß-Größe (Länge: 7-20 µm; Breite 2-4,5 µm), gutes Wachstum, im Wattenmeer von Nordsee und auch in der Ostsee vorkommend, und somit möglicherweise zum natürlichen Nahrungsspektrum von *Corophium* gehörend, gute Exopolymer-Bildung, die möglicherweise außer als Nahrungsquelle (Gerdol & Hughes 1994 b) auch für den Röhrenbau von Vorteil ist.

Es wurden drei Mikrokosmen (ca. 20 cm Durchmesser) mit 3 cm Quarzsand (Millisil-Mehle W3, mittlere Korngröße: 90 µm) befüllt. Die Grundfläche wurde gedrittelt: Auf einem Drittel wurde *Navicula salinicola* angeimpft und eine Algenrasenbildung abgewartet. Die verbleibende Grundfläche wurde zunächst abgedeckt. Zu Versuchsbeginn wurde ein weiteres Drittel mit einer Quarzsand – „Liquifry Marine“ Mischung ausgestrichen. Das letzte Drittel diente als Kontrolle. Es wurden je Mikrokosmos 20 Tiere eingesetzt. Die Tiere wurden in regelmäßigen Abständen beobachtet. Nach 27 Stunden wurde der Quarzsand nach Nahrungsbereichen getrennt ausgesiebt. Dabei wurde festgestellt, dass die Tiere sich in zwei der drei Mikrokosmen eindeutig in dem Bereich erhöhter

Algendichte angesammelt hatten (15- 18 von 20 Tieren). Von den 60 eingesetzten Tieren war kein Tier während des Versuchs gestorben.

6.4.2. Lebenszyklus von *Corophium volutator*

Der Lebenszyklus von *Corophium volutator* wurde anhand von zahlreichen Freilanduntersuchungen an den Küsten von Nordsee und Ostsee sowie der nordamerikanischen Ostküste beschrieben. *C. volutator* hat eine Lebensdauer von ca. einem Jahr. Sein Lebenszyklus ist durch eine Reproduktionsphase vom Frühjahr bis Herbst und eine Ruhephase im Winter gekennzeichnet ist (u.a. Hart 1930; Watkin 1941; Möller & Rosenberg 1982; Sergerstråle 1940, 1959; Peer et al. 1986). Es wurden ein bis zwei Generationen pro Jahr beobachtet: Eine Überwinterungsgeneration, die sich im Frühjahr (Februar – Juni) reproduziert und im Juni/ Juli abstirbt und eine Sommergeneration die sich im Sommer/ Herbst reproduziert und dessen Herbstbruten die Überwinterungsgeneration bereitstellt. Die Anzahl der Bruten pro Weibchen beträgt 2 – 5 (Sergerstråle 1959) (max. 8 (Watkin 1941)). Die Weibchen bilden ab einer Größe von 3-4 mm Oostegite und können ab einer Größe von 5 mm Eier tragen (Watkin 1941; Peer et al. 1986). Die Anzahl der Eier und Nachkommen ist von der Größe der Weibchen abhängig (Sergerstråle 1940; Watkin 1941; Peer et al. 1986). Je Brut können 10 bis 172 Eier (Peer et al. 1986) gebildet werden, jedoch kommt es während der Tragzeit (und evtl. Probenahme) zu einem Verlust von Eiern/ Embryonen (Sergerstråle 1940; Peer et al. 1986). Es wird im Mittel eine Anzahl von 10 - 40 Nachkommen gebildet (Hart 1930; Fish & Mills 1979; Peer et al. 1986; Bowmer 1994).

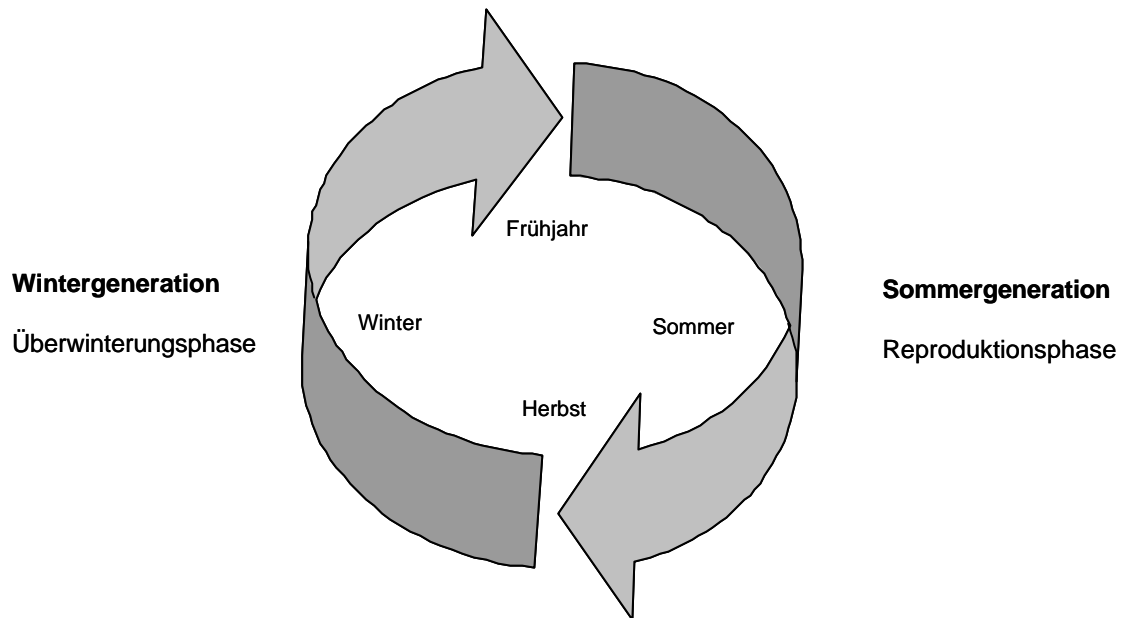


Abb. 21: Schematischer Lebenszyklus von *Corophium volutator* im Freiland

Es gibt Hinweise darauf, dass der Beginn der Reproduktion (Februar - Juni) (Sergerstråle 1940) und die Anzahl der Generationen (ein bis zwei) (Wilson & Parker 1996) sowie die Anzahl der Bruten pro Weibchen (1 - 8) (Flügge 1978) von der Standorttemperatur abhängen. Dabei wurde insgesamt eine frühere/ höhere Reproduktion in wärmeren Untersuchungsgebieten/ Jahren festgestellt. Von anderen Amphipodenarten ist bekannt, dass sowohl die Temperatur als auch die Tageslänge die Reproduktion beeinflussen (Sergerstråle 1970; Steele & Steele 1986; Borowsky 1991). So wurde z.B. für die Induktion der Reproduktion des marinen Amphipoden *Talitrus saltator* eine „kritische Tageslänge“ - Licht: Dunkel von 14: 10 Stunden - festgestellt (Williams 1985). Unter konstanten Laborbedingungen konnte bei verschiedenen Amphipodenarten die Reproduktion kontinuierlich, unabhängig von der Saisonalität fortgeführt werden (Borowsky 1991). Über die genaue Induktion der Reproduktion bei *C. volutator* gibt es keine Informationen, lediglich dass die Reifung der Gonaden bereits bei 7°C erfolgen kann (Sergerstråle 1940).

Ethologische Temperaturversuche haben gezeigt, dass der Schlickkrebs bei einem Temperaturangebot von 0 - 35 °C den Bereich von 15 und 20° C bevorzugt (Meadows & Ruagh 1981).

Weitere abiotischen Faktoren, die für die Reproduktion von Bedeutung sein könnten, sind Salinität und Tide. Mills & Fish (1980) stellten in Laborexperimenten fest, dass *C. volutator* Weibchen mindestens eine Salinität von 20 für die Eiablage benötigen. Weiter wurde in Laborversuchen ein endogener circatidaler Rhythmus der Schwimmaktivität festgestellt (Holmström & Morgan 1983; Harris & Morgan 1984), der vermutlich auch von der Temperatur beeinflusst wird (Holmström & Morgan 1983). Da *C. volutator* jedoch in der Ostsee bis zu 50 m Tiefe vorkommt (Schellenberg 1942) und überwiegend durch Drift verbreitet wird (max. Schwimmdauer 3h (Wilson & Parker 1996)), kann er sich vermutlich auch in diesem Bereich reproduzieren. Damit käme der Tide vermutlich keine bedeutende Rolle bei der Produktion der Reproduktion zu. Möglicherweise ist das Entlassen der Jungtiere aus dem Marsupium (nach erster Häutung, ca. 1 mm Länge) an eine lunare Periodizität gekoppelt (Watkin 1941).

Zu den stimulierenden Faktoren für die Kopulation zählen zumindest bei anderen Amphipodenarten neben den Umweltfaktoren auch verschiedene Pheromone, Verhalten und Morphologie der Weibchen (Borowsky 1991). Beim Schlickkrebs sucht das Männchen die Wohnröhren des Weibchens auf (Borowsky 1983), wobei die Auswahl des Weibchens wohl von dem Stadium der Rezeptivität abhängt (Forbes et al. 1996). Die Kopulation von *C. volutator* findet in der Wohnröhre im Sediment statt (Fish & Mills 1979). Es wurde oftmals im Freiland bei den Schlickkrebsen (> 4,2 mm) eine größere Anzahl an Weibchen als Männchen vorgefunden (Verhältnis Weibchen : Männchen ca. 3:1 (Watkin 1941; Peer et al. 1986)). Dies wurde z.T. auf eine kürzere natürliche Lebenszeit der Männchen (Sergeystråle 1940) oder auf einen größeren Prädationsdruck aufgrund der Migration der Männchen zu den Wohnröhren der

Weibchen (Peer et al. 1986) zurückgeführt. Vereinzelt treten intersexuelle Tiere auf (Watkin 1941).

6.4.3. Versuchsaufbau: Kultivierung und Reproduktion von *C. volutator* im Labor

Ziel der Laborversuche war es, *C. volutator* unter standardisierten Bedingungen zu vermehren, um einen möglichst standardisierten Testorganismus das ganze Jahr über zur Verfügung zu haben. Entsprechend sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Ist die Reproduktion von *C. volutator* im Labor möglich?
2. Wie viele Bruten hat ein Weibchen im Labor?
3. Ist die Reproduktion das ganze Jahr über, d.h. auch im Winter möglich?
4. Wie viele Nachkommen werden gebildet?
5. Bei welcher Temperatur - bei 15° C, 19 °C oder 23°C - ist der Bruterfolg am größten?
6. Welche Längen-Wachstumsrate hat *C. volutator*? (Nach welchem Zeitraum haben sie die Testgröße erreicht?)

Je Temperatur (15, 19 und 23°C) wurden 6 Aquarien als semi-statisches System (Wasser-Recycling-System) eingerichtet. Die insgesamt 18 Aquarien unterschieden sich bezüglich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften nur durch die Temperatur. Die Wahl der Temperaturregime, des Sediments, des Meerwassers (inkl. Salinität), der Lichtqualität und des Lichtrhythmus sowie der Fütterung sind in Tabelle 22 zusammengefasst und wurden bereits in anderen Abschnitten des Berichts erläutert.

Tabelle 22: Übersicht über den Versuchsaufbau zur Kultivierung und Reproduktion von *C. volutator*

Parameter	Versuchsaufbau
Herkunft Elterntiere	Norderney, Surfbucht (Probenahme 06.02.2001)
Herkunft Sediment	<i>Corophium</i> standorteigenes Sediment, Norderney, Surfbucht (Probenahme 06.02.2001)
Sedimenteigenschaften	TOC: 4 % Anteil Fraktion < 63 µm: 53 % Mittlere Korngröße: 60 µm
Vorbereitung Sediment	Zum Ausschluss von <i>C. volutator</i> und Prädatoren: durch 400 µm Sieb gesiebt bei –20°C mindestens für 24 Stunden eingefroren (Abtöten von Jungtieren)
Meerwasser	Synthetisches Meerwasser, Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Produkt No. S 9883)
Aquariengröße	30 x 20 x 20 cm
Verhältnis Sediment: Wasser	ca. 1,5 kg Sediment (NG), ca. 6 l Meerwasser je Aquarium entsprach einer Höhe von ca. 2-3 cm Sediment und ca. 10 cm Wasser
Filter	Junior Bodenfilter Fa. Hagen, Filtermaterial: EHFI biologisches Filtersubstrat (Quarz) Fa. Eheim, Nitrifikantenstarthilfe: Duplabacter
Licht Qualität: Intensität [lux]: Rhythmus [h]:	warmes, weißes Fluoreszenzlicht (Kinne 1976) Dämmerung: 300 – 800; Vollbeleuchtung: 800 – 1700 Dämmerung : Licht : Dämmerung : Dunkel: 0,5 : 15 : 0,5 : 8
Wassertemperatur [°C]	mittlere (min. – max.) 15 (14 – 17) 19 (17 – 19) 23 (20 – 25)
Salinität	30 – 32
Sauerstoffsättigung	> 80%
pH-Wert	7,9 – 8,5
Futter	<i>Navicula salinicola</i> (benthische Bacillariophyceae)

Je Temperatur wurden zwei Versuchsansätze (A und B) (siehe Tabelle 23) á 3 Parallelen aufgebaut. Alle Versuchstiere stammten von den Freilandtieren ab, die am 06. Februar 2001 von Norderney (Surfbucht) geholt worden waren. Sie bildeten Anfang April 2001 die ersten Nachkommen in den Hälterungsaquarien, die als 1 mm Tiere am 12.04.01 von den Elterntieren getrennt wurden. Sie waren zu Versuchsbeginn (08. Juni 2001) auf 4 – 5 mm herangewachsen und stellten die Ausgangstiere für den Ansatz A (sog. G1) dar. Es wurde von ihnen je Aquarium 10 Weibchen und 5 Männchen eingesetzt (A-Ansatz). Für den B-Ansatz wurde eine spätere Brut aus den Hälterungsaquarien (sog. G2) eingesetzt. Die Tiere waren zwischen 2-4 mm groß, so dass die Geschlechter noch nicht differenziert werden konnten. Es wurden 10 Tiere je Aquarium eingesetzt (B-Ansatz).

Tabelle 23: Besatz in den beiden Ansätzen A und B zu Versuchsbeginn (08.06.01)

	Ansatz A	Ansatz B
Beschreibung Besatz	1. Brut im Labor, die am 12.04.01 ca. 1 mm groß war.	Spätere Brut im Labor.
Generation	G1	G2
Anzahl Weibchen	10	?
Anzahl Männchen	5	?
Gesamtanzahl	15	10
Größe	4-5	2-3(4)

Die benthische Bacillariophyceae *Navicula salinicola* wurde als Futter angeimpft (siehe Futtermittelversuch Kapitel 6.4.1), wobei sich die Alge unter den gegebenen Bedingungen in den Aquarien vermehren konnte. Sobald der Diatomeenrasen aufgrund des Fraßdruckes unterhalb der makroskopisch sichtbaren Dichte war, wurde er mit einer frischen Algenkultur angereichert. Der makroskopische Zustand der Aquarien sowie die chemischen und physikalischen Parameter wurden wöchentlich überprüft.

Der erste Reproduktionserfolg (Bilanz 1) wurde nach 71 Tagen (August 2001) durch Sieben des Sediments (250 μm Sieb) konstatiert (siehe Abb. 22). Frühzeitiges Sieben des Sediments stört das Paarungsverhalten, insbesondere da das zeitliche Fenster zur Kopulation direkt nach der Häutung der Weibchen vermutlich sehr eng ist (vgl. Borowsky 1991). Deshalb wurde der Zeitpunkt der Bilanz nach zunehmender Anzahl an Wohnröhren-Öffnungen und nach dem Grad der Trübung der Aquarien als Indiz zunehmender Individuen-Dichte (Bioturbation) gewählt.

Es wurden die Elterntiere anhand ihrer Größe selektiert und für den zweiten Besatz genutzt (siehe Abb. 22 und Abb. 23). Da beim Ansatz A bereits ca. ein Drittel der Elterntiere (G1) gestorben war, wurden zwei Aquarien mit G1 und ein Aquarium mit den größten Nachkommen (F1) neu besetzt. Von den übrigen Nachkommen wurden zwei der drei parallelen Versuchsansätze konserviert (in einer Lösung aus: 80% Ethanol, 10% Glycerin und 10% destilliertem Wasser). Die Nachkommen der dritten Parallele wurden bei 15°C gehältert, um die Labor-Kultur aufzubauen und ihre Fitness und Sensitivität in Tests zu überprüfen.

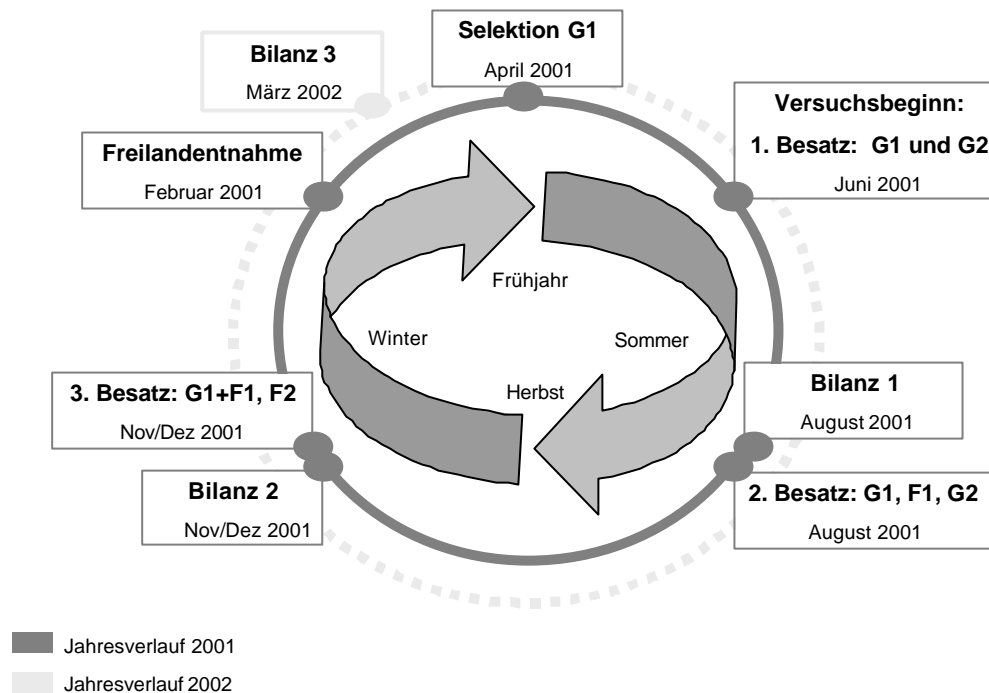


Abb. 22: Versuchsdurchführung *Corophium* Reproduktion bezogen auf den Jahresverlauf

Nach demselben Prinzip wurde die zweite Bilanz nach 112 Tagen (November/Dezember 2001) erhoben (siehe Abb. 22 und Abb. 23). Da nach Bilanz 2 der überwiegende Teil der G1 gestorben war und G2 nur schwer von ihrem Nachwuchs (F2) zu unterscheiden war, erfolgte der dritte Besatz unter Einbeziehung der Nachkommen (F1 und F2). Die dritte Bilanz wurde nach 85 Tagen (März 2002) vorgenommen (siehe Abb. 22 und Abb. 23). Die Anzahl der Elterntiere eines jeden Besatzes variierte zwischen 10 bis 20 Tieren, wobei bei allen Ansätzen unterschiedlicher Temperatur die gleiche Anzahl eingesetzt wurde (direkte Vergleichbarkeit).

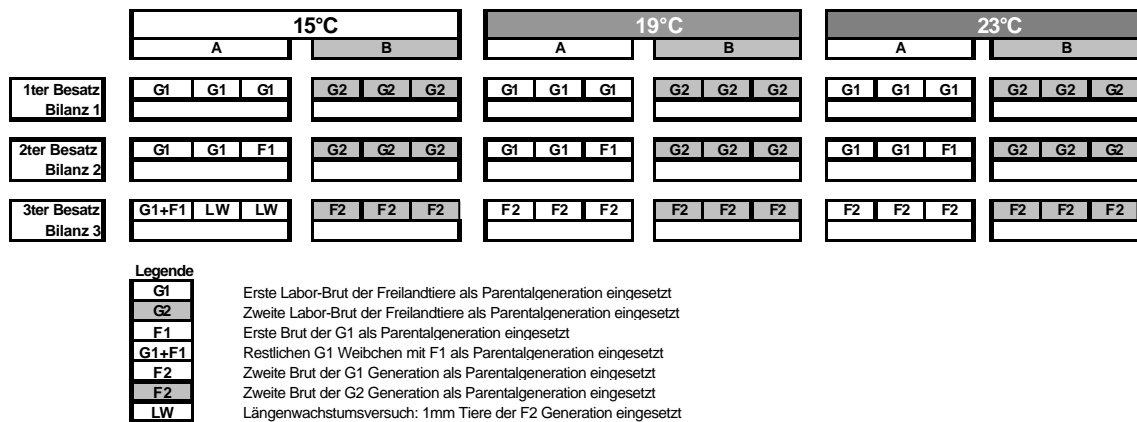


Abb. 23: Schematische Übersicht über die Versuchs-Ansätze zur Reproduktion von *Corophium volutator*

Bei den konservierten Proben der Bilanz 1 mußten zunächst die Tiere, die < 500 µm Maschenweite (1-2 mm Tiere) waren, durch gestaffeltes Aufspülen mit Meerwasser, Sedimentieren und Dekantieren vom Sediment getrennt werden. Es wurden die Anzahl der Nachkommen, Körperlänge (von Rostrum bis Telson) (1 mm Klassen) und Antennenlänge (Binokular, Bogorov-Schale mit Millimeter-Papier) sowie ihre Geschlechter bestimmt (anhand der Oostegite, des primären Merkmals der Weibchen). Es wurden mindestens 200 Tiere je Probe auf diese Weise erfaßt. Waren die Proben umfangreicher, so wurden mit dem Folsom-Planktonteiler Unterproben genommen.

6.4.4. Ergebnisse und Diskussion der *C. volutator* Reproduktionsversuche im Labor

Die wesentlichen Ergebnisse der Reproduktionsversuche mit *Corophium volutator* lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Reproduktion und Hälterung der Tiere ist das ganze Jahr über möglich. Der allen Versuchsansätzen gemeine Aufbau ist für eine kontinuierliche Hälterung und Zucht grundsätzlich geeignet. Es gab lediglich bei einem von 54 Ansätzen (1,85 %) Ausfall durch Pilzbefall. Entsprechend können

die in Tabelle 22 zusammengefassten Halterungsbedingungen empfohlen werden.

2. Bei allen drei Ansätzen (15°C, 19°C und 23°C) haben sich die Tiere im Sommer und im Winter im Labor reproduziert. Unter Berücksichtigung aller konservierter Versuchsansätze wurde eine mittlere Anzahl von 913 Nachkommen pro Versuchsansatz (Aquarium) ermittelt. Es wurden maximal 2344 und minimal 66 Nachkommen pro Versuchsansatz gebildet.

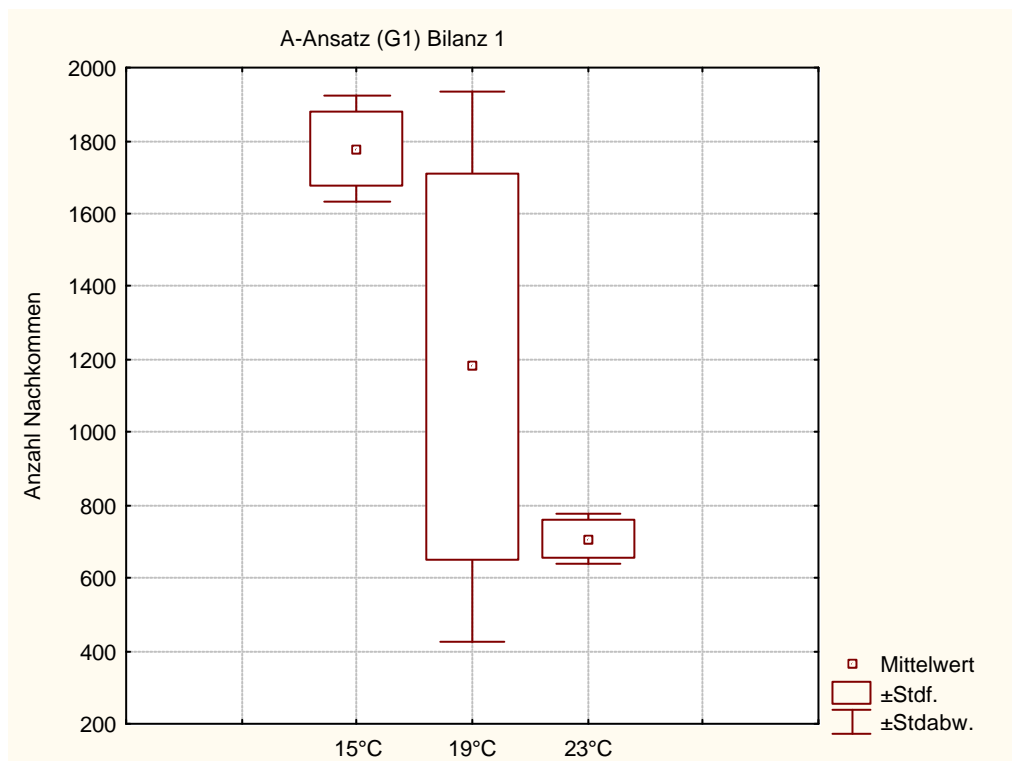


Abb. 24: Anzahl der Nachkommen im A Ansatz (G1) Bilanz 1 bei 15° C, 19° C und 23°C

3. Bei dem A Ansatz war der Reproduktionserfolg nach der ersten Bilanz bei 15°C mit einer mittleren Gesamtanzahl von 1778 Nachkommen signifikant größer als bei 23°C mit 708 Nachkommen (t-Test) ($p = 0,01$) (siehe Abb. 24). Bei den weiteren Datensätzen konnte aufgrund der geringen Anzahl an Parallelen und der Streuung der Ergebnisse kein

signifikanter Unterschied zwischen den Temperaturen festgestellt werden.

4. Es war kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der Nachkommen zwischen Bilanz 1 bis 3 (Sommer bis Winter), oder zwischen G1 und G2 (A- Ansatz und B- Ansatz) oder folgenden Parentalgenerationen (F) zu konstatieren.
5. Bei dem A-Ansatz war in allen Aquarien die Größenverteilung der Nachkommen monomodal verteilt (Bilanz 1 und Bilanz 2). Dies deutet daraufhin, dass die Weibchen eine Brut pro Bilanz hatten und dass die Reproduktion innerhalb eines Aquariums relativ synchron erfolgte (bei der hier zugrunde gelegten Präzision von 1 mm Klassen, siehe Abb. 25).
6. Unter Berücksichtigung aller Ansätze, bei denen 10 Weibchen und 5 Männchen (> 4mm) eingesetzt wurden, wurde eine mittlere Anzahl von 102 Nachkommen pro Weibchen und pro Brut gebildet (rechnerisch ermittelt: Anzahl Nachkommen/ Anzahl Weibchen, $N = 289$). Es wurden maximal 234 und minimal 28 Nachkommen pro Weibchen und pro Brut gebildet. Es konnte hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen Sommer und Winter festgestellt werden.
7. Ein Vergleich aller Datensätze zeigte, dass der Reproduktionserfolg am größten war, wenn alle eingesetzten Adulten aus einer Brut(folge) stammten. Dies scheint eine Voraussetzung zur Synchronisation und Kopulation von Männchen und Weibchen zu sein.
8. Das Verhältnis von Weibchen: Männchen von 10:5 war erfolgreich.
9. Beim B- Ansatz waren die Geschlechter zu Versuchsbeginn nicht differenzierbar (2– 3 mm). Der Einsatz von 10 Tieren führte zu einer

mittleren Anzahl von 83 Nachkommen pro Tier und pro Brut (Bilanz 1). Es wurden maximal 168 und minimal 9 Nachkommen pro Brut und pro Tier gebildet. Die geringe Anzahl von 9 Nachkommen pro Brut und pro Tier ist auf das ungünstige Verhältnis von 2 Weibchen und 8 Männchen zurückzuführen.

10. Die Weibchen der G1 (A Ansatz) haben bei 15, 19 und 23°C zwei Bruten gebildet (eine je Bilanz 1 und Bilanz 2). Weitere Bruten waren nicht möglich, da alle 45 G1-Männchen nach der zweiten Brut verstorben waren. Von den insgesamt 90 G1-Weibchen lebten nach der zweiten Brut nur noch 9 (10%). Alle überlebenden Weibchen stammten aus den 15°C Ansätzen. Dies deutet darauf hin, dass selbst bei einem Angebot von Männchen maximal eine weitere Brut möglich gewesen wäre. Die Tiere stellten die Sommergeneration dar, deren Individuen nach zwei Bruten starben, also eine Lebensdauer von April bis August hatten. Entsprechendes wird auch für Freilandtiere beschrieben.
11. Die Selektion der G2 (B- Ansatz) von den übrigen Tieren der Hälterung erfolgte erst bei einer Länge von 2- 3 mm. Dadurch war G2 weniger homogen als G1 (A- Ansatz). Dies zeigte sich auch in der Größenverteilung der Brut innerhalb eines Aquariums: Die Größenverteilung der Nachkommen zeigten bei 15°C und 19°C der ersten Bilanz eine bimodale Verteilung, während der A- Ansatz eine monomodale Normalverteilung hatte (siehe Abb. 25 und Abb. 26).

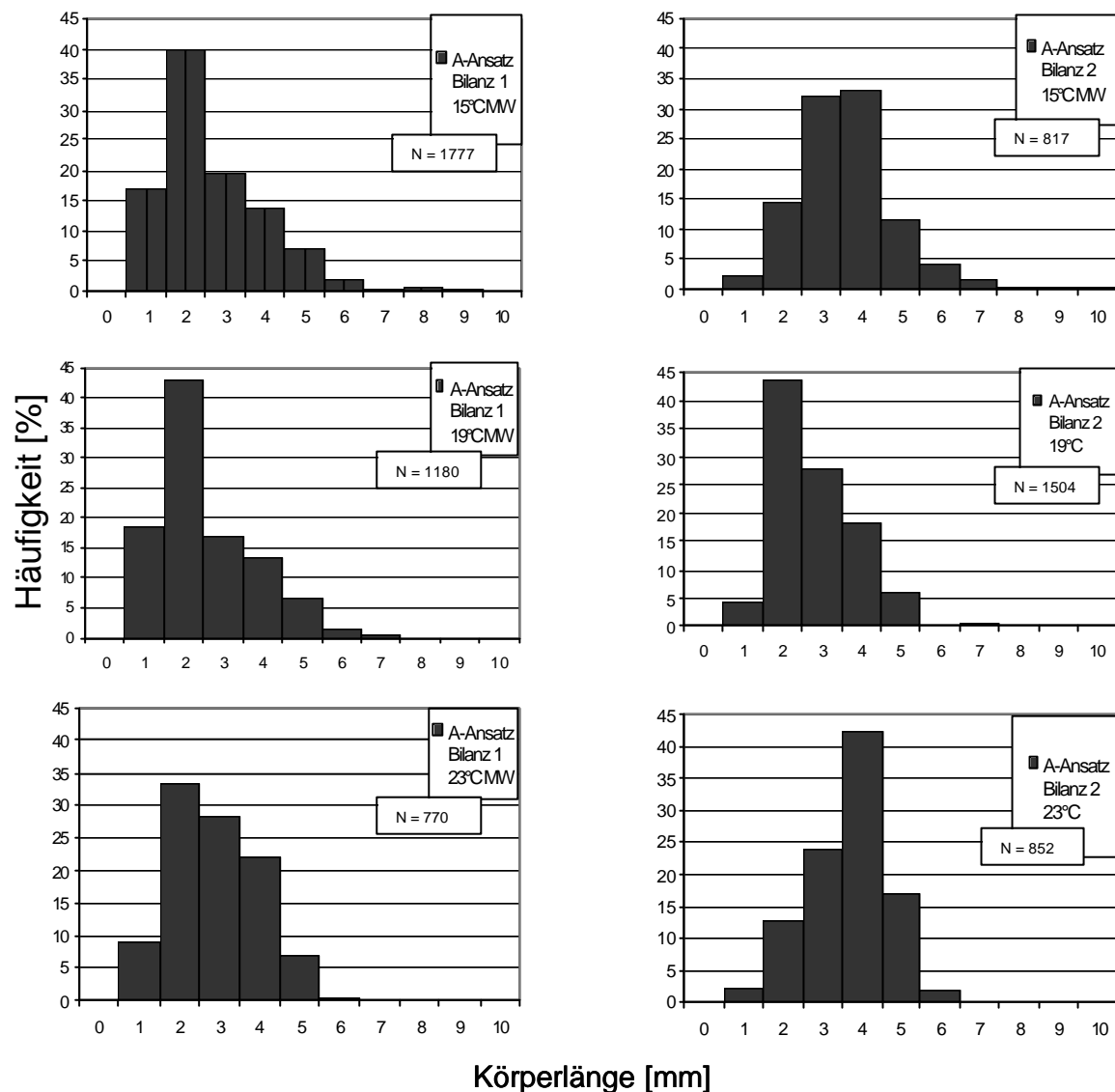


Abb. 25: Längen-Häufigkeitsverteilung der Nachkommen des A-Ansatzes Bilanz 1 und 2 bei 15°C, 19°C und 23°C (MW = Mittelwert aus zwei Parallelen)

12. Die Qualität der Brut ist bei allen Versuchsansätzen als „fit“ zu bewerten.

Es wurde die Ausbeute von einem Drittel aller Versuchsansätze bei 15°C gehäлтert und z.T. für Testzwecke eingesetzt (siehe auch Kapitel 6.4.6). Dabei wurden keine erhöhten Mortalitäten oder andere Anomalitäten festgestellt.

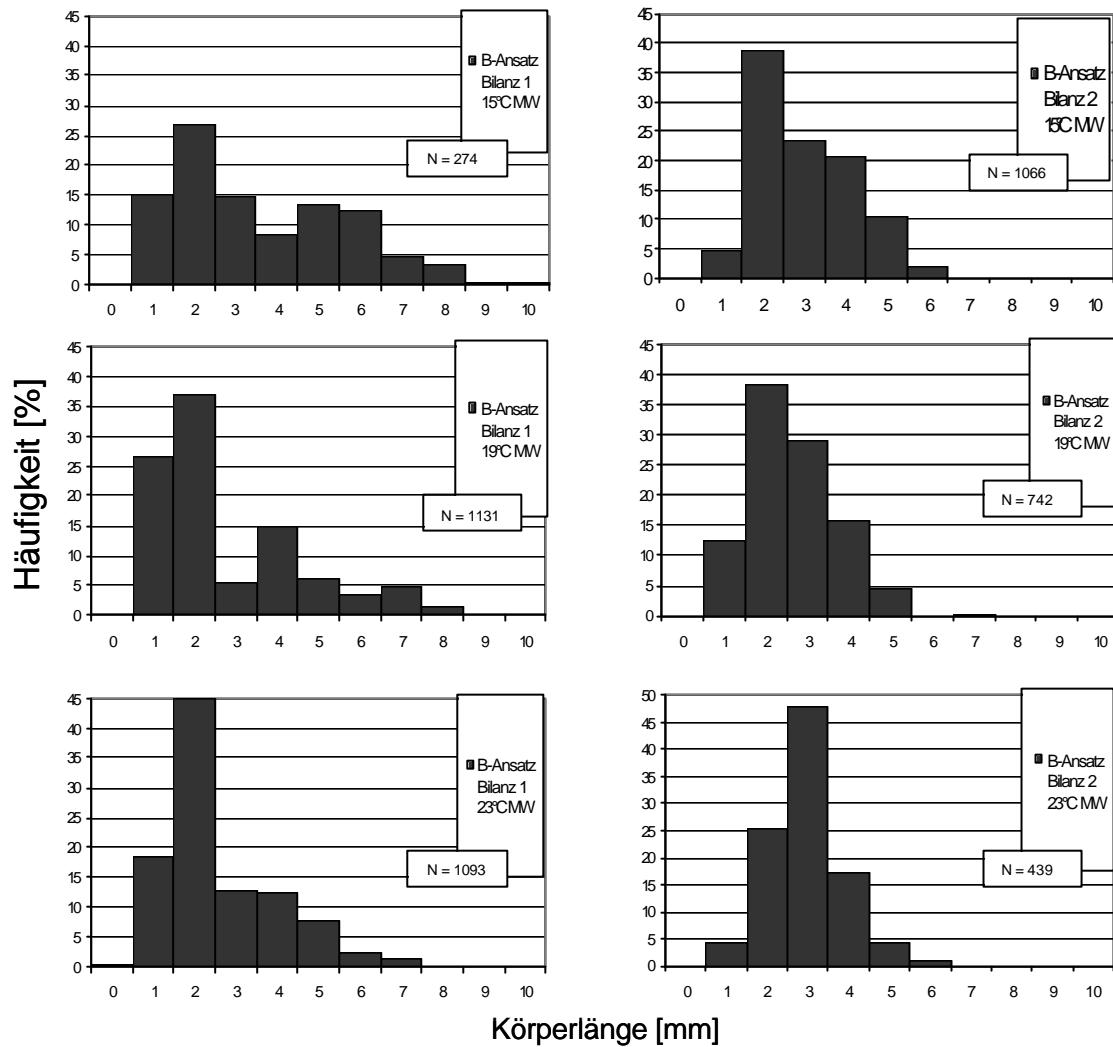


Abb. 26: Längen-Häufigkeitsverteilung der Nachkommen des B-Ansatzes Bilanz 1 und 2 bei 15°C, 19°C und 23°C (MW = Mittelwert aus zwei Parallelen)

13. Ein paralleler Versuch zum Längenwachstum bei 15°C zeigte, dass die Tiere ca. 14,6 Tage für einen Längenzuwachs von 1 mm brauchen (Wachstumsrate 0,07 mm/ Tag) (Berechnung: $d\text{Länge}/dt$). Dieses Ergebnis wurde auch durch die Reproduktionsversuche gestützt: Dazu wurden jeweils die größten Nachkommen von allen 37 Reproduktionsansätzen herangezogen. Es wurde die Körperlänge durch den Untersuchungszeitraum dividiert. Dieses war möglich, da die Individuen lediglich in 2 der 37 Ansätzen bereits eine maximale Größe von 10 mm aufwiesen und deren Wachstum sich somit vermutlich bereits in der stationären Phase befand. Der Untersuchungszeitraum ist nur ein ungenaues Maß, da der Zeitpunkt ihres Schlüpfens (t_0) nicht bekannt ist. Nach dem Schlüpfen sind die Tiere ca. 1 mm groß. Der Mittelwert betrug 16 Tage für den Zuwachs von 1 mm (SD = 5 Tage) und lag damit in der Größenordnung der Ergebnisse aus den Wachstumsversuchen (14,6 Tage).

In der Literatur wurden unterschiedliche Wachstumsraten in Abhängigkeit vom Lebensstadium der Tiere und der Sommer- und Wintergeneration gefunden. Es wurde eine mit unserem Ergebnis übereinstimmende durchschnittliche Wachstumsrate von 0,08 mm pro Tag zwischen Mai und Juni (Möller & Rosenberg 1982) und 0,05 mm pro Tag (Peer et al. 1986) festgestellt.

6.4.5. Empfehlungen für eine kontinuierliche Reproduktion von *Corophium volutator* im Labor

1. Die Kultur sollte zwischen 15°C und 19°C bei den unter Kapitel 6.4.3 beschriebenen Bedingungen (Tabelle 22) aufgebaut werden.

2. Eine homogene Parentalgeneration sollte sichergestellt werden, indem sie bereits als 1 mm Jungtiere ($< 500 \mu\text{m}$ Sieb) von den Freilandtieren getrennt und in relativ geringer Dichte (ca. 1 Tier pro 10 cm^2) gehältert werden.
3. Sind diese Tiere auf 4 mm herangewachsen (nach ca. 42 Tagen), sollten sie als Parentalgeneration in Aquarien zur Reproduktion überführt werden. Dafür sollten Tiere möglichst gleicher Körperlänge im Verhältnis 10 Weibchen zu 5 Männchen eingesetzt werden. Die Geschlechterdifferenzierung sollte dabei nicht nach den Oostegiten, sondern möglichst nach der II. Antenne erfolgen, um die Tiere nicht zu verletzen.

Ist eine Geschlechterdifferenzierung in diesem Stadium makroskopisch nicht möglich, sollten 20 Tiere gleicher Körperlänge eingesetzt werden.

4. Die Aquarien sollten solange mechanisch nicht gestört werden, bis eine hohe Dichte an Wohnröhrenöffnungen und Wassertrübung auf eine erhöhte Individuen-Dichte schließen lässt (ca. 60 Tage). Dann sollte das Sediment durch $200\mu\text{m}$ gesiebt werden. Die Tiere $> 4 \text{ mm}$ können nach den oben genannten Kriterien weiterhin für die Reproduktion oder als Testtiere (5 – 8 mm Größe) eingesetzt werden. Sollten 1 mm Tiere vorhanden sein, wird wieder eine Trennung von den Adulten empfohlen.

6.4.6. Validierung der Sensitivität von gezüchteten *Corophium volutator*

Zur Überprüfung der Sensitivität der im Labor gezüchteten und gehälterten Corophien im Vergleich zu unmittelbar aus dem Freiland entnommenen Tieren wurde die Referenzsubstanz Ammoniumchlorid parallel mit gezüchteten und

wilden Tieren im 72 Stunden-Wasserphase-Test (siehe Kapitel 6.3.12) getestet. Dazu wurden je Herkunft der Tiere fünf Konzentrationsstufen mit je zwei Parallelen á 10 Tieren und fünf negative Kontrollen im Test eingesetzt. Für die gezüchteten Corophien wurde ein EC_{50} -Wert von 85,18 mg/l (95% Konfidenz-Intervall 73,53 – 98,66) (Kontrollmortalität: 4%) und für die wilden von 40,29 mg/l (95% Konfidenz-Intervall 23,66 – 68,63) berechnet.

Damit lagen beide Tests in dem bisher ermittelten Kontrollbereich (siehe Kapitel 6.3.12). Die gezüchteten Tiere waren somit als fit zu bewerten und waren nicht sensibler als die Freilandtiere. Dieser Befund sollte auch mit weiteren Substanzen bestätigt werden.

Optimale Kulturbedingungen sind entscheidend für eine vergleichbare Sensitivität der Kulturtiere mit den Freilandtieren. Dies zeigten auch Biotests mit gehälterten und direkt aus dem Freiland entnommenen marinen Amphipoden der Arten *Rhepoxynius abronius* und *Eohaustorius estuarius*. Die Labor- Tiere waren deutlich sensibler gegenüber Cadmium und Tributylzinn als die Freilandtiere, was auf einen geringeren Lipid- Gehalt der Labortiere aufgrund mangelhafter Fütterung zurückzuführen war (Meador 1993). Der Einfluss der Fütterung auf die Sensitivität war bereits bei verlängerten Amphipodentests über 28 Tagen sichtbar (Allen et al. 2001; Sims et al. 2001).

6.4.7. Parasiten

Aus Freiland- und Laboruntersuchungen ist bekannt, dass *Corophium volutator* als Sekundärwirt für verschiedene digene Trematoden dient (*Microphallus claviformis* und *Maritrema subdolum*, Lauckner 1990). Primärwirt ist die Wattschnecke *Hydrobia ulvae* und als Endwirt fungieren Seevögel. Trematodenbefall kann einen Einfluss auf die Populationsdynamik von *C. volutator* haben und unter Umständen zu einem Zusammenbruch der Population führen (Lauckner 1990; Meißner & Bick 1997). Bisher liegen keine

Untersuchungen zum Einfluss einer Parasitierung auf die Sensitivität von *C. volutator* im Biotest vor und eine Prüfung der Testorganismen auf eine Infestierung wird bisher in keiner Vorschrift gefordert.

An unserem Referenzstandort von *C. volutator* (Surfbucht, Norderney) kommt *Hydrobia* nur in einer sehr geringen Dichte vor. Darüber hinaus wurden von uns *Corophium*- Stichproben auf einen Parasitenbefall geprüft. Dazu wurden die Tiere vor Beginn der Präparation in Milchsäure gelegt. Die Milchsäure bewirkt eine Aufhellung des Präparates (Hartwich 1975) und Parasiten, wie z.B. die Metacercarien von digenen Trematoden, werden von außen sichtbar. Dieses Vorgehen ermöglicht die Zuordnung vorhandener Parasiten in verschiedene Körperbereiche des Wirtes (dorsal / ventral, Segmentnummern). Die anschließende Präparation der Corophien erfolgte in Petrischalen. Die Tiere wurden unter dem Binokular mittels Pinzette und Präpariernadel von caudal nach distal segmentweise zerzupft und nach Parasitenstadien abgesucht. Auf diese Weise wurden stichprobenartig ca. 30 Tiere untersucht, wobei kein Befall mit Parasiten festzustellen war.

6.4.8. Implikationen der Reproduktionserfolge mit *C. volutator* im Labor für die Implementierung des Amphipodentests

Der ganzjährige Reproduktionserfolg mit *C. volutator* im Labor und die Validierung der Sensitivität der gezüchteten Testorganismen ermöglicht die Implementierung des Tests auch in küstenfernen Laboratorien. Ferner wurde daraufhin auch der Einsatz von gezüchteten Tieren im Entwurf des ISO Standards „Akute Toxizität von marinen Amphipoden“ (ISO DIS 16712) berücksichtigt. Damit wurde ein wichtiger Schritt für die nationale Umsetzung der internationalen, rechtlichen Anforderungen gemacht. Darüber hinaus liefert die Reproduktion von *C. volutator* im Labor eine wichtige Basis für die Entwicklung eines chronischen Amphipodentest, der auch im Hinblick auf endokrin wirksamen Substanzen (Depledge & Billinghamurst 1999) von Bedeutung ist.

7. Validierung des Testsets an Nordsee- und Ostsee-Sedimentproben

7.1. Vor-Ringtest: Validierung des Testsets an Nordsee- und Ostsee-Sedimenten

7.1.1. Aufbau und Durchführung

Im August und September 2001 fand ein Vor-Ringtest an Nordsee- und Ostsee-Sedimentproben statt. Dieser Vor-Ringtest hatte zum Ziel, die Anwendung des Testsets auf Brackwasser- und Meerwasser-Sedimentproben zu validieren und den Stand der Harmonisierung zwischen den Laboratorien zu überprüfen. Im Unterschied zu einem Ringtest war die Durchführung nicht anonym und es fand während und nach der Testphase ein Erfahrungsaustausch statt.

Es wurden zwei Ostsee und zwei Nordsee Sedimentproben von den PraktikerInnen des DIN AK 5.3 „Marine Biotests“ mit dem marinen Testset im Vor-Ringtest untersucht (siehe Tabelle 24). Damit wurde sowohl die Brackwasser- als auch die Meerwasser-Variante eines jeden Testverfahrens im Vor-Ringtest geprüft.

Tabelle 24: Übersicht über die TeilnehmerInnen und Biotests des ersten Ringtests an Nordsee- und Ostsee-Sedimenten (LB = Leuchtbakterien)

Test	TUHH	Noack	BfG	NLÖ
Brack-/Meerwasser Leuchtbakterientest	+ flüssig getrockneten LB	+ flüssig getrockneten LB	+ gefrier- getrockneten LB	+ gefrier- getrockneten LB
Mariner Algentest	+	+	+	+
Amphipodentest	+	+	-	-

Die Nordsee-Sedimentproben (siehe Stationskarte Abb. 28) wurden von Herrn Dr. M. Haarich (Bundesforschungsanstalt für Fischerei - Institut für Fischereiökologie, BFA-Fisch) im Rahmen des Biologischen Effektmonitorings (Walter Herwig III, Fahrnummer 231) und die Ostsee-Sedimentproben (siehe

Stationskarte Abb. 27) von Frau Dr. S. Biselli (Bundesamt für Seeschifffahrt und Hydrografie, BSH, Gauss Fahrtnummer 371) genommen. Leider war eine Lagerung der Proben bei 4°C an Bord nicht möglich, so dass die Proben kurzzeitig bei – 35°C bzw. –20 °C aufbewahrt wurden. Vom NLÖ wurde Kontrollsediment aus der Surfbucht von Norderney in einer geschlossenen Kühlkette zur TUHH gebracht. Die Proben und das Kontrollsediment wurden von uns in Unterproben aufgeteilt und an die TeilnehmerInnen gekühlt versandt. Die Proben und das Kontrollsediment waren bei 4°C im Dunkeln zu lagern und innerhalb von vier Wochen nach der Probenahme zu untersuchen.

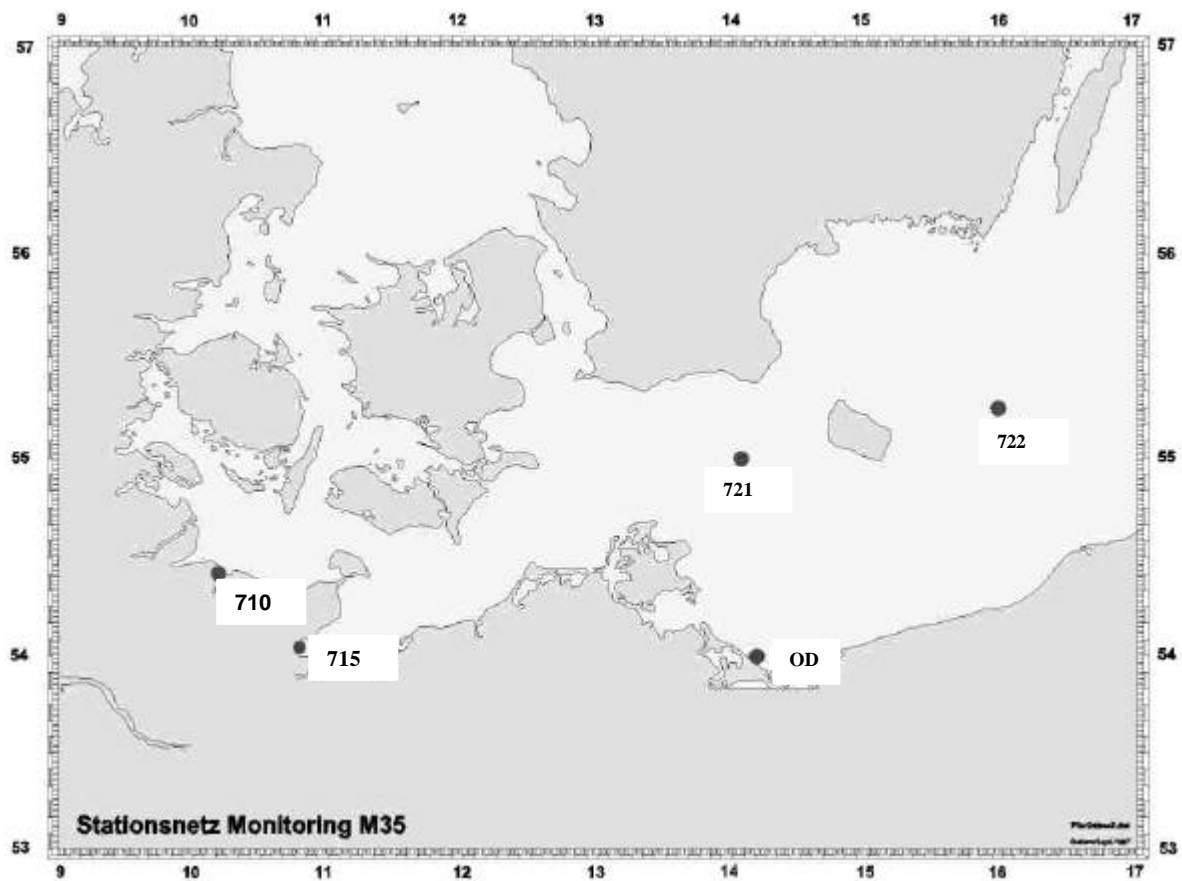


Abb. 27: Stationskarte der von der TUHH untersuchten Ostsee-Sedimentproben (Gauss 371). Die Stationen des Vor-Ringtests sind: 710 und 721 (Karte Biselli, BSH).

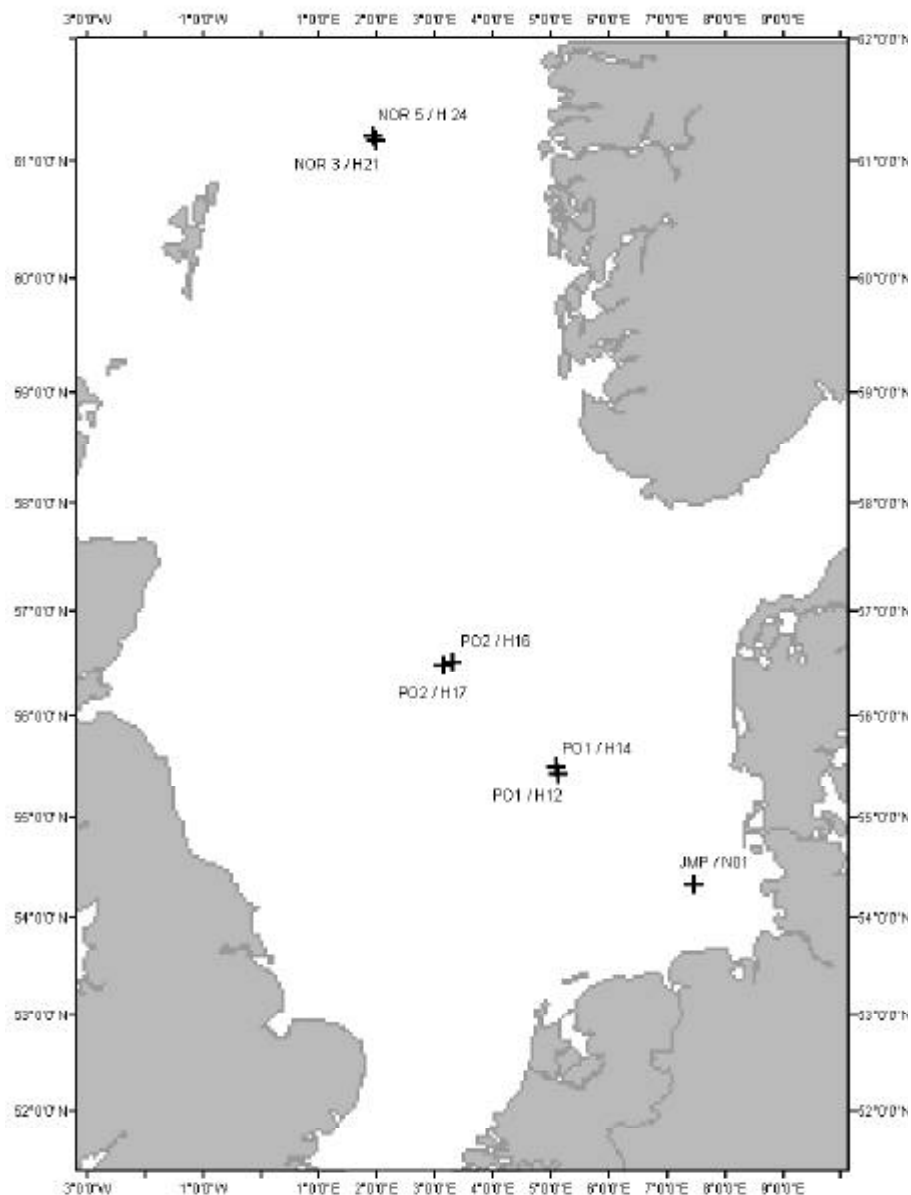


Abb. 28: Stationskarte der von der TUHH untersuchten Nordsee-Sedimentproben (WHIII 231). Die Stationen des Vor-Ringtests sind: NOR5-H24 und PO2-H17.

7.1.2. Ergebnisse und Diskussion des Vor-Ringtests

7.1.2.1. Physikalische Sediment- Eigenschaften

Die Proben repräsentierten ein breites Spektrum bezüglich der Salinität, Korngrößenverteilung und ihres organischen Gehalts (siehe Tabelle 25). Die Ostseesedimente waren schlickig während die Nordseesedimente deutlich sandiger waren.

Tabelle 25: Probenahmestationen und Sedimenteigenschaften

	Ostsee- Sedimentproben		Nordsee- Sedimentproben	
	O-715	O-721	N-NOR5 H24	N-PO2 H17
Gebiet	Neustädter Bucht	Arkona Becken	Nördliche Nordsee, ca. 500 m von Ölplattform entfernt	Zentrale Nordsee
Probenahmegerät	Kasten- greifer	Kasten- greifer	Backen- greifer	Backen- greifer
Sedimenttiefe [cm]	oberen 2	oberen 2	0 - 10	0 – 10
Salinität des Porenwassers	24,5	17	40	40
Trockengewicht (TG) [%]	37,8	28,5	82,3	75,7
Organischer Gehalt (TOC) [%]	8,8	12,4	1,2	1,5
Mittlere Korngröße [µm]	29,16	23,99	351,29	186,81
Anteil < 63 µm [%]	69,68	77,14	8,35	8,96
Anteil < 20 µm [%]	43,1	46,4	6,0	5,4

7.1.2.2. Ergebnisse des Testsets

Die Ergebnisse der Biotests waren entsprechend der Zielsetzung unter zwei Gesichtspunkten zu betrachten: Wie gut sind die Ergebnisse harmonisiert und wie sind die Effekte zu bewerten?

➤ Ergebnisse des Meer-/ Brackwasser- Leuchtbakterientests

Die Harmonisierung des Meer-/ Brackwasser-Leuchtbakterientests war unter Berücksichtigung der beiden Verfahren zu bewerten. Sowohl bei dem Verfahren mit flüssig getrockneten als auch mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien wurde eine gute Übereinstimmung erzielt (siehe Abb. 29). Es wurden von den Laboratorien teilweise unterschiedliche Verdünnungsstufen (G-Stufen) des Eluats eingesetzt. Gleichwohl war eine gute Harmonisierung zwischen den Laboratorien desselben Verfahrens festzustellen. Das Verfahren mit flüssig getrockneten Leuchtbakterien war bei diesen Proben deutlich sensibler als das mit gefriergetrockneten Leuchtbakterien.

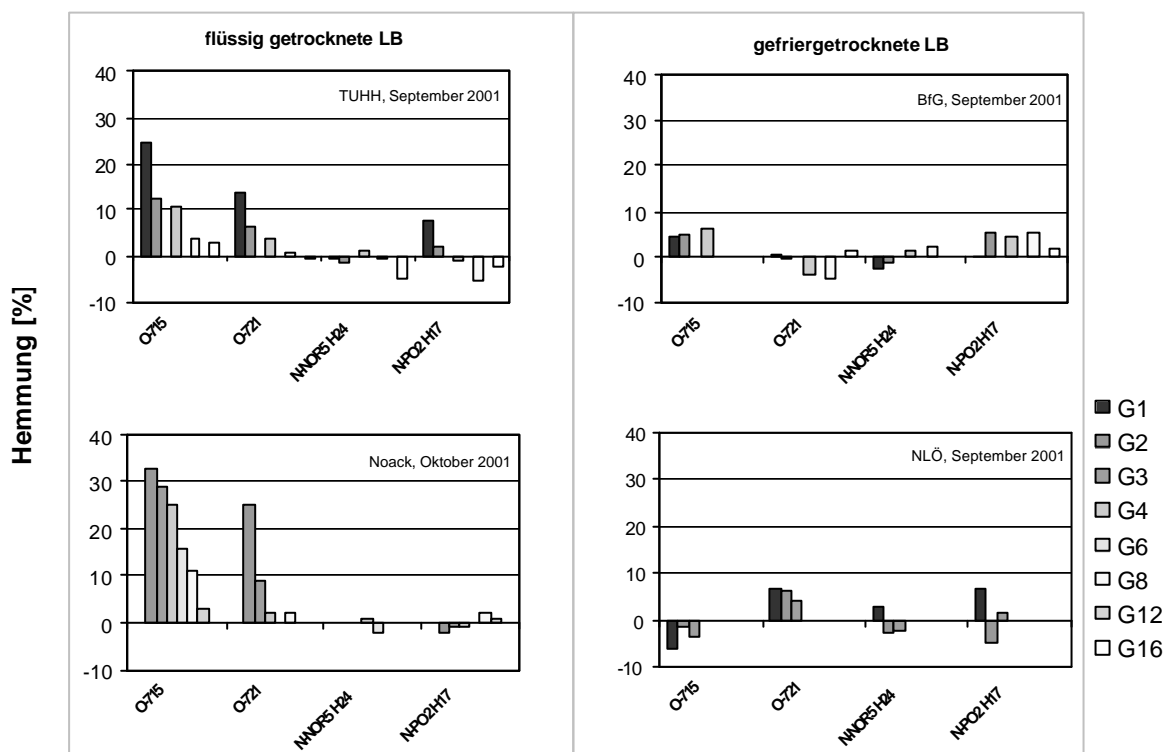


Abb. 29: Testergebnisse der Ostsee- und Nordseesedimentproben (Eluate) im Brack/ Meerwasser-Leuchtbakterientest (Vor-Ringtest)

Der Leuchtbakterientest ist durch eine hohe Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors gekennzeichnet (Abweichung der Parallelen $< 3\%$). Deshalb kann man eine Hemmung $> 10\%$ als einen toxischen Effekt bewerten. Die Ostsee Probe O-715 und O-721 zeigten einen toxischen Effekt im Verfahren mit flüssig getrockneten Leuchtbakterien. Bei dem Verfahren mit gefriergetrockneten wurden keine Effekte nachgewiesen.

➤ Ergebnisse des Meer-/ Brackwasser-Algentests

Im Meer-/ Brackwasser-Algentest zeigten alle Eluate bei allen Laboratorien zumindest in der zweiten Verdünnungsstufe Fördereffekte (siehe Abb. 30). Die Fördereffekte waren bei einem Laboratorium mit bis zu 162% Förderung besonders hoch. Alle Laboratorien hatten die geforderten, testspezifischen Gültigkeitskriterien erfüllt. Da Fördereffekte Hemmungen maskieren können, bestand beim Testaufbau aller Laboratorien Optimierungsbedarf. Es wurde eine „Check-Liste“ von den PraktikerInnen erstellt, um mögliche Ursachen aufzudecken und zu beheben.

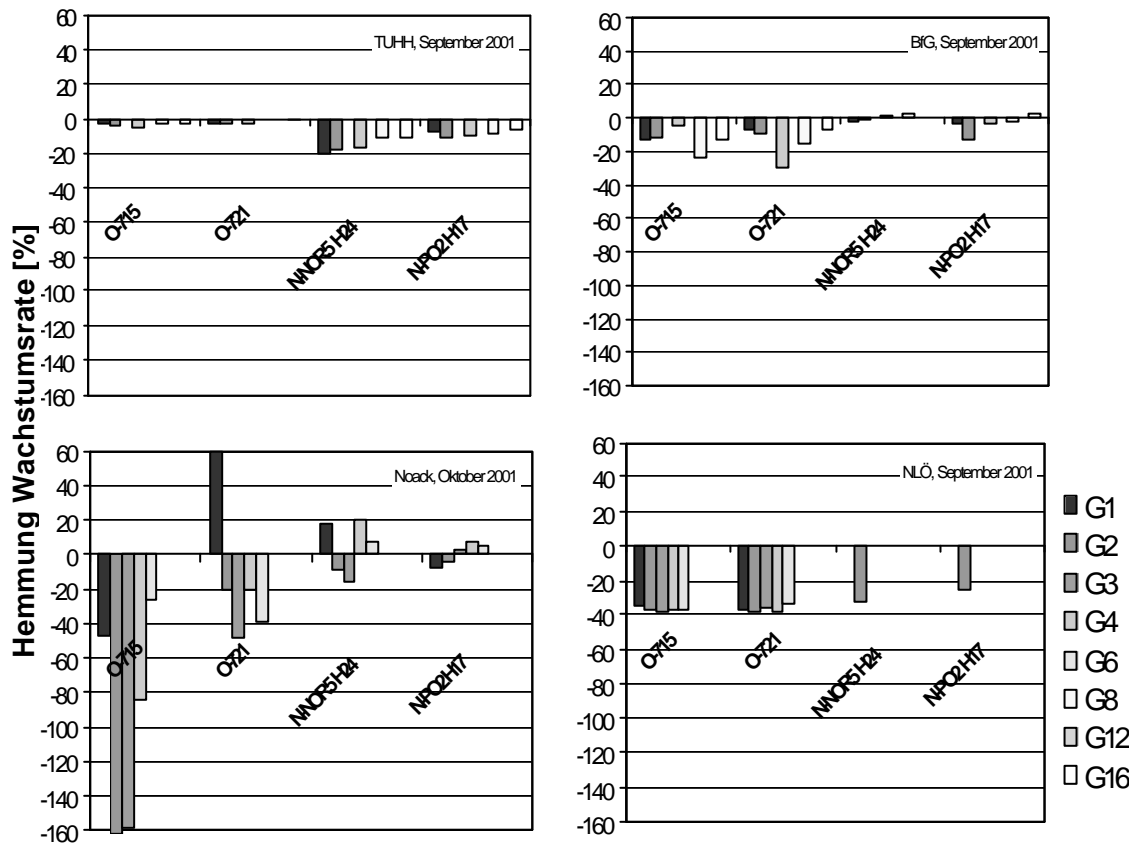


Abb. 30: Testergebnisse der Ostsee- und Nordseesedimentproben (Eluate) im Brack-/ Meerwasser-Algentest mit *Phaeodactylum tricornutum* (Vor-Ringtest)

➤ Ergebnisse des akuten Amphipodentests

Im akuten Amphipodentest wird als Gültigkeitskriterium gefordert, dass die Mortalität in der Kontrolle im Einzelgefäß $< 20\%$ und der Mittelwert aller fünf Kontrollen $< 15\%$ sein muss (ISO DIS 16712; entsprechend auch Roddie & Thain 2001). In einem Labor wurde im Vor-Ringtest mit einer Kontroll-Mortalität von 17% das Gültigkeitskriterium überschritten (siehe Abb. 31). In diesem Labor war auch die Mortalität der Proben höher als in dem anderen Labor, wo die Kontroll-Mortalität gering war ($< 1\%$). Die erhöhte Mortalität könnte möglicherweise auf eine höhere Toxizität der Sedimente aufgrund der längeren Lagerung (Ammonium und Sulfid konnten ausgeschlossen werden) oder auf eine höhere Sensitivität der Testorganismen zurückzuführen sein. Die Testorganismen wurden von beiden Laboratorien auf Norderney (Surfbucht) entnommen.

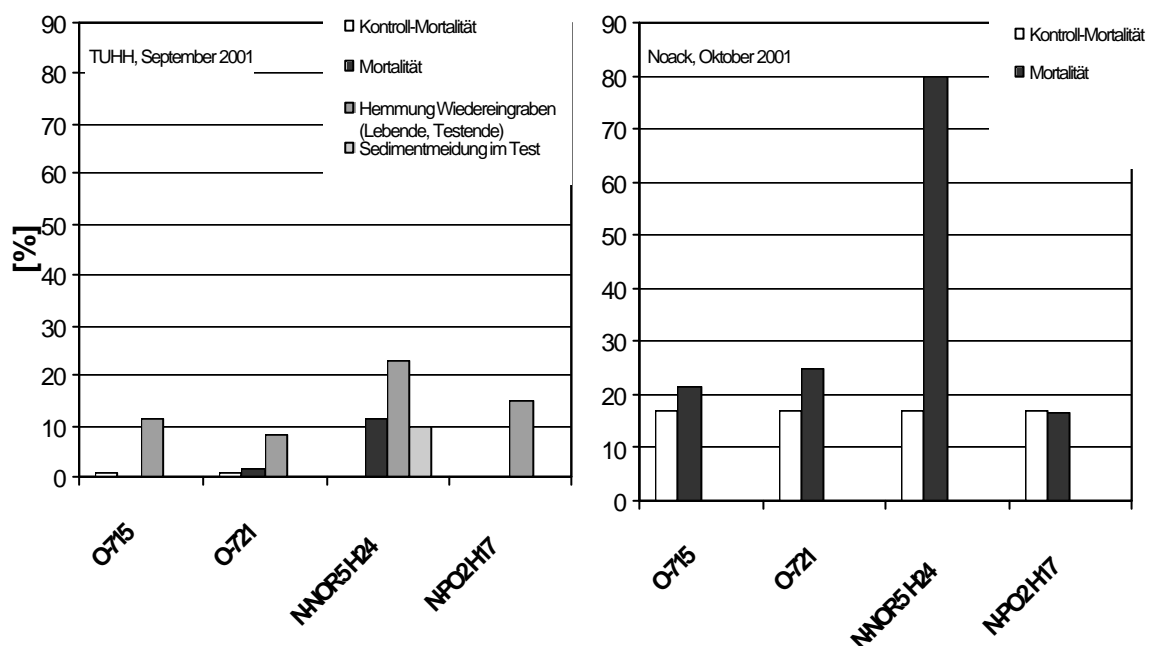


Abb. 31: Testergebnisse der Ostsee- und Nordseesedimentproben im akuten Amphipodentest mit *Corophium volutator* (Vor-Ringtest)

Die höchste Mortalität wurde von beiden Laboratorien im Nordseesediment N-NOR5 H24 festgestellt. Während diese Probe in dem einen Labor mit einer

Mortalität von 63% (nach Korrektur der Proben-Mortalität um die erhöhte Kontroll-Mortalität) eindeutig als toxisch zu bewerten war, betrug die Mortalität in dem anderen Labor nur 11,7%. Auch wenn eine Probe erst ab einer Mortalität > 20% als gesichert toxisch angesprochen werden kann (Stronkhorst 1998), so ist eine Mortalität > 10% bei einer geringen Kontroll-Mortalität (<1%) als kritisch zu betrachten (vgl. Stronkhorst et al. 2001). Die zusätzlich in diesem Labor erhobenen subletalen Parameter zeigten eine 26%ige Hemmung des Wiedereingrabe Verhaltens der lebenden Testtiere am Testende sowie 10% Sedimentmeidung während des Tests, was ebenfalls auf eine Toxizität des Sediments hindeutete.

7.1.2.3. Ergebnisse der chemischen Analyse

Es wurde eine Auswahl polychlorierter Biphenyle (PCB), polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) und Pflanzenschutzmittel von Herrn Dr. M. Haarich (BFA-Fischerei, Nordseesedimente) und Frau Dr. S. Biselli (BSH, Ostseesedimente) chemisch analysiert. Zur Bewertung der chemischen Kontamination wurde ein Großteil der gemessenen Substanzen anhand der HABAK-WSV (BfG 1999) ausgewählt und diese in Abbildung 32 dem Richtwert 1 der HABAK-WSV gegenübergestellt. Der Richtwert 1 (RW 1) basiert auf der Belastung der deutschen Wattenmeer-Sedimente von 1982 – 1992. Nach der HABAK-WSV könnte Baggergut, dessen Schadstoffkonzentration \leq RW 1 ist, aus chemischer Sicht ins Meer verbracht werden. Der RW 1 kann hier lediglich als Anhaltspunkt für den Grad der chemischen Belastung herangezogen werden, da er sich auf die Sedimentfraktion $< 20 \mu\text{m}$ bezieht, die Sedimentproben jedoch ohne Größenfraktionierung chemisch analysiert wurden. Folglich ist bei Betrachtung der Gesamtprobe im Vergleich zur $< 20 \mu\text{m}$ Fraktion eine Verdünnung der Schadstoffkonzentration bezogen auf das Trockengewicht anzunehmen. Richtwerte für Ostseesedimente werden in der HABAK-WSV bisher nicht berücksichtigt (BfG 1999). Der Anteil der Fraktion $< 20 \mu\text{m}$ war in den Ostseesedimenten deutlich höher als in den Nordseesedimenten. Dies ist bei dem Vergleich der Schadstoffbelastung der Ostsee- und Nordseesedimente zu beachten.

Die pp'-DDE Konzentration war in beiden Ostseesedimenten größer als der RW 1. pp'-DDD überstieg im Ostseesediment O-721 den RW 1. Die Summe von 6 PAK (Fluoranthen, Benzo(b)fluoranthen, Benzo(k)fluoranthen, Benzo(a)pyren, Benzo(ghi)perylen, Indeno(1,2,3-cd)pyren) wurde von der Ostseeprobe O-721 ebenfalls überschritten, obwohl die Summe nur aus fünf PAKs gebildet wurde (Benzo(k)fluoranthen wurde nicht bestimmt).

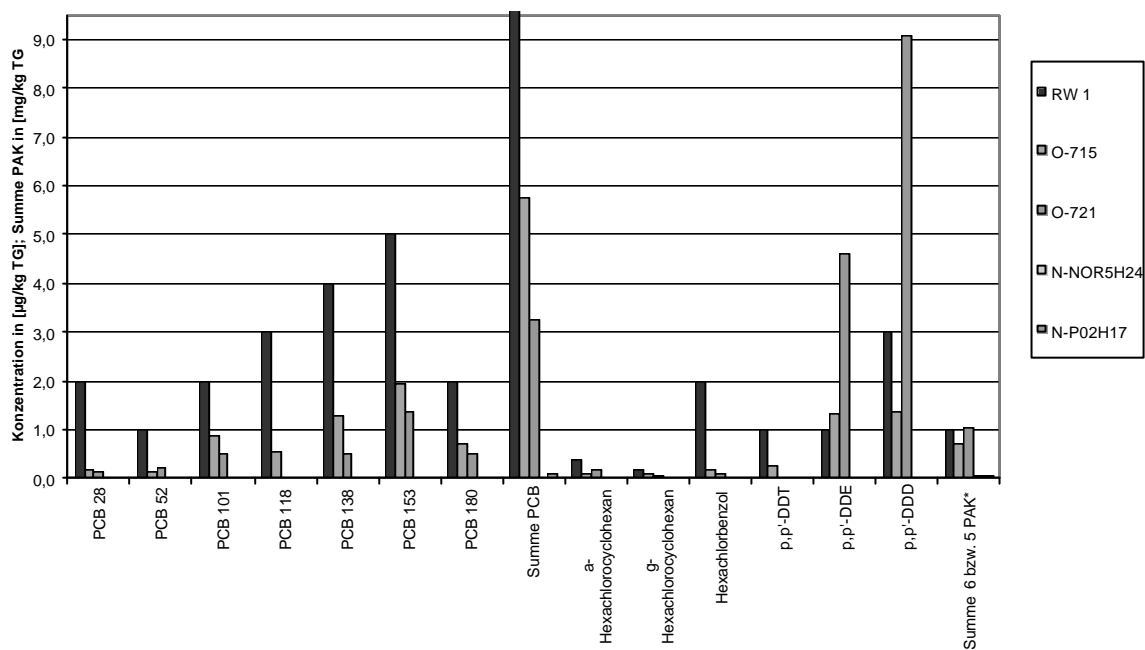


Abb. 32: Chemische Analyse der Vor-Ringtest-Sedimentproben (bez. Trockengewicht des Gesamtsediment) (Daten der BSH u. der BFA-Fischerei) und RW1

7.1.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse des Vor-Ringtests

Mit dem Vor-Ringtest wurden erste Erfahrungen bezüglich der Anwendung des Testsets auf Brack-/ Meerwasser Sedimente und die Harmonisierung der Testverfahren zwischen den Laboratorien gesammelt. Der Vor- Ringtest zeigte, dass das Testset grundsätzlich für die Anwendung natürlicher Brack-/ Meerwasser-Sedimente einschließlich der Eluate geeignet ist. Der Meer-/ Brackwasser-Leuchtbakterientest kann als harmonisiert und validiert betrachtet werden. Bezüglich des Meer-/ Brackwasser-Algentests und des akuten Amphipodentests bestand jedoch noch Optimierungs- und Harmonisierungsbedarf.

Es wurden zwei Ostseeproben (O-715 und O-721) vom Leuchtbakterientest mit flüssig getrockneten LB und eine Nordseeprobe (NOR5 H24) vom Amphipodentest als toxisch identifiziert. Eine grundsätzliche Diskussion zur Bewertung der Toxizität wird unter Kapitel 9.1.4. geführt. Allgemein wären zur Analyse der Varianz zwischen den Laboratorien Sedimentproben mit einer hohen Toxizität besonders geeignet. Andererseits bereiten gerade Sedimente mittlerer Toxizität in der Praxis der Sedimentbewertung die größten Schwierigkeiten.

Nach Harmonisierung des Algentests und des Amphipodentests zwischen Laboratorien wurde ein Ringtest zur Validierung des Testsets auf natürliche Sedimente durchgeführt.

7.2. Ringtest zur Validierung des Testsets auf natürliche Sedimente

7.2.1. Aufbau und Durchführung des Ringtests

Der Ringtest zur Anwendung des Testsets auf natürliche Sedimente hatte zum Ziel, die fortschreitende Harmonisierung der Testverfahren zwischen den Laboratorien zu überprüfen sowie die Anwendung des Testsets auf natürliche (kontaminierte) Sedimente zu validieren.

Nachdem im Vor-Ringtest Sedimentproben geprüft worden waren, die primär einer diffusen Schadstoffbelastung ausgesetzt waren, sollten im Ringtest Sedimente untersucht werden, die primär aufgrund einer Punktquelle belastet waren. Davon hatte man sich die Ermittlung von eindeutig toxischen Signalen versprochen.

Im August 2002 wurden von der TUHH, dem Dr. Noack-Laboratorium und mit Unterstützung der Forschungsstelle Norderney drei Sedimentproben auf Norderney entnommen: Zwei davon stammten von unterschiedlichen Stellen im Hafenbecken und eine vom Fuß einer Kupferhüttenschlacke (siehe Abb. 33). Kupferhüttenschlacken wurden u.a. auf Wangerooge und Norderney zum Inselschutz verbaut. Aufgrund der hohen Anteile potenziell toxischer Schwermetalle im Feststoff, insbesondere Zink, Kupfer und Blei, wird der Einsatz im Seewasserbau, vor allem im Wattenbereich, kritisch gesehen (Bülow & Larm 2002). Zusätzlich wurde in der Surfbucht Kontrollsediment für den Amphipodentest entnommen.

Die Proben wurden vor Ort durch ein 850 µm Sieb gesiebt, wobei der Überstand auf *Corophium* und Prädatoren überprüft und diese, sowie Bestandteile > 10 mm, entfernt wurden. Nach Homogenisierung wurden die Proben vor Ort in Unterproben aufgeteilt. Die Proben wurde gekühlt direkt zur TUHH und zum Dr. Noack-Laboratorium transportiert. Von dort wurden sie in

einer geschlossenen Kühlkette an die BfG (Versand) und das NLÖ (direkter Transport) verteilt.

Es wurden wieder die in Tabelle 26 zusammengestellten Tests von den vier Laboratorien: TUHH, Dr. Noack Laboratorium für Angewandte Biologie, Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) (Berlin) und dem Niedersächsischen Landesamt für Ökologie (NLÖ) im Zeitraum vom 14.08.-10.09.02 angewendet.

Tabelle 26: Ringtestteilnehmer (LB = Leuchtbakterien)

Test	TUHH	Noack	BfG	NLÖ
Mariner Leuchtbakterientest	+ flüssig getrockneten LB	+ flüssig getrockneten LB	+ gefrier- getrockneten LB	+ gefrier- getrockneten LB
Mariner Algentest	+	+	+	+
Amphipodentest	+	+	-	-

Die Eluatherstellung sowie die Testdurchführungen erfolgten nach bereits beschriebenen Methoden (siehe auch Anhang). Die chemische Analyse der Sedimentproben anhand der Schadstoffliste der HABAK-WSV übernahm die TUHH.

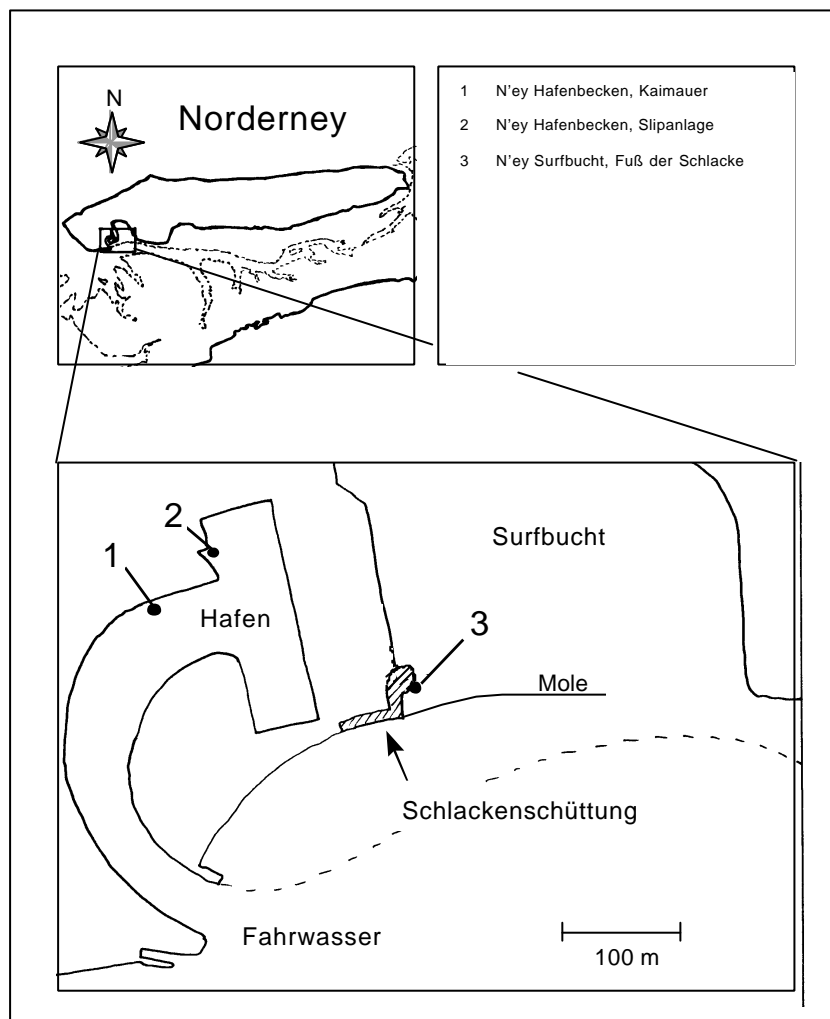


Abb. 33: Stationskarte: Ringtest- Probenahmestellen auf Norderney (Karte NLÖ, verändert)

7.2.2. Ringtest-Ergebnisse und Diskussion

7.2.2.1. Physikalische Sedimenteigenschaften

Die physikalischen Eigenschaften der Ringtest-Proben und des Kontrollsediments für den Amphipodentest sind in Tabelle 27 zusammengefasst. Die beiden Sedimentproben aus dem Hafenbecken (N'ey 1 und N'ey 2) waren schlickig, während die Probe am Fuße der Schlacke (N'ey 3) etwas sandiger war.

Tabelle 27: Probenahmestationen und Sedimenteigenschaften

Bezeichnung	N'ey 1	N'ey 2	N'ey 3	Kontrollsed
Station	Hafenbecken, Kaimauer	Hafenbecken, Slipanlage	Surfbucht, 5 m vom Fuß der Schlacke entfernt	Surfbucht, <i>Corophium</i> Standort
Probenahmegerät	Kastengreifer	Eimer	Schaufel	per Hand
Sedimenttiefe [cm]	ca. 15	nicht bestimmbar	oberen 10	oberen 10
Trockengewicht (TG) [%]	21,85	31,96	75,99	47,75
Organischer Gehalt (TOC) [%]	12,08	3,83	0,50	4,32
Mittlere Korngröße [µm]	22,96	109,55	138,11	60,15
Anteil < 63 µm [%]	63,92	42,98	25,99	53,02
Anteil < 20 µm [%]	49,32	29,74	20,62	38,11

7.2.2.2. Ringtest-Ergebnisse des Testsets

➤ Ringtest-Ergebnisse des Meerwasser- Leuchtbakterientests

Im marinen Leuchtbakterientest war bei allen Ringtestteilnehmern insgesamt eine gute Übereinstimmung der Testergebnisse unter Berücksichtigung der beiden Verfahren mit gefrier- und flüssig getrockneten Leuchtbakterien festzustellen (siehe Abb. 34). Eine signifikante Hemmung wurde von allen Laboratorien in der Probe N'ey 2 (Hafenbecken Slipanlage) beobachtet. Diese Probe wurde von einem Laboratorium zweimal (in einem Abstand von 1,5 Stunden) gemessen. Dabei nahm die Hemmung von 77% (G2) auf 17% (G2) ab. Dieses Eluat hatte in den anderen Laboratorien unmittelbar nach der Herstellung einen Sauerstoffgehalt von 21%. Nach der Eluatvorschrift der PraktikerInnen sollten die Eluate einen Sauerstoffgehalt von mindestens 50% aufweisen. Ist dies unmittelbar nach der Herstellung nicht der Fall, so ist durch Belüften oder Rühren entsprechend Sauerstoff einzutragen. Die Einhaltung dieser Voraussetzung ist bedeutsam, um sog. *confounding factors* (siehe Kapitel 5.2) auszuschließen. Zu den Faktoren, die eine Schadstofftoxizität vortäuschen können, zählt z.B. Schwefelwasserstoff, gegenüber dem die Leuchtbakterien sehr empfindlich sind (Herbst & Nendza 2000). Schwefelwasserstoff könnte eine Erklärung für die Abnahme der Toxizität bei der zweiten Messung sein.

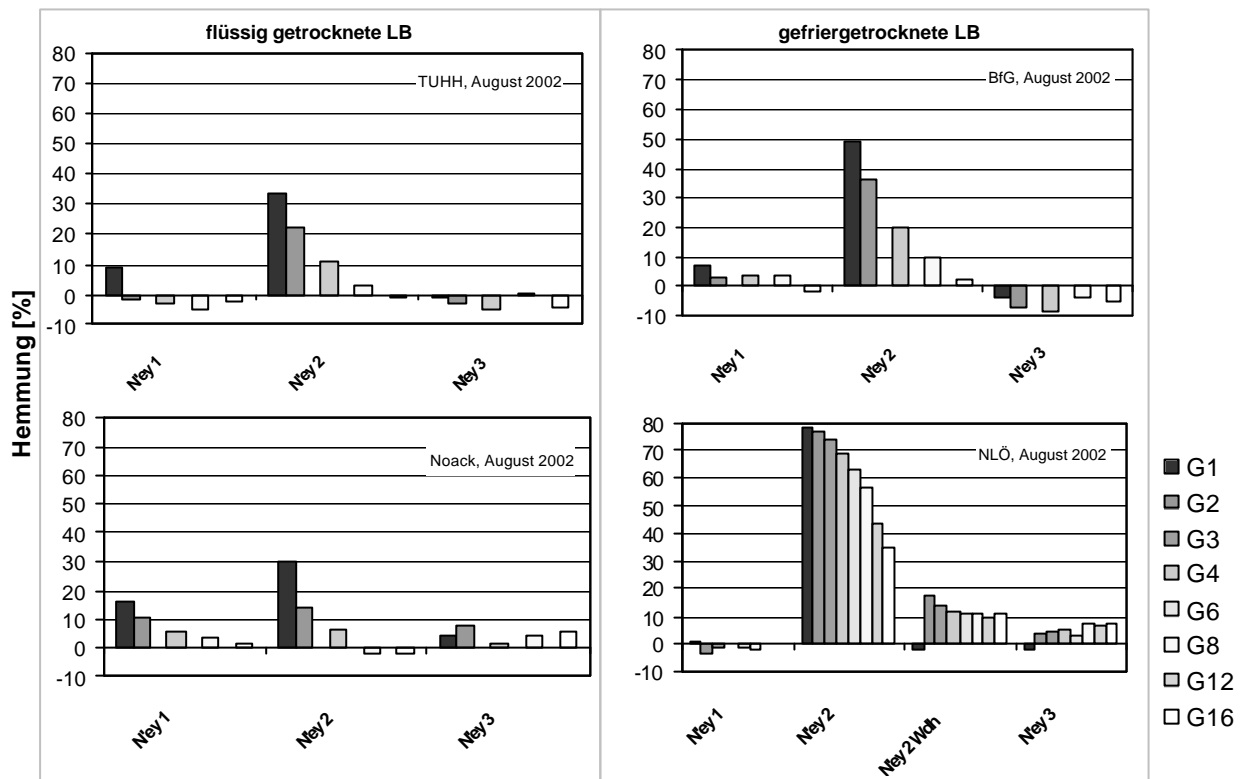


Abb. 34: Ringtest-Ergebnisse des Meerwasser-Leuchtbakterientests

➤ Ringtest-Ergebnisse des marinen Algentests

Die Ringtest-Ergebnisse des marinen Algentests waren zwischen den Laboratorien im Vergleich zum Vor-Ringtest 2001 deutlich harmonisierter (siehe Abb. 35). Die Fördereffekte waren deutlich geringer als im Vor-Ringtest. Es wurden von allen Laboratorien keine signifikanten Hemmungen der Wachstumsrate festgestellt. Lediglich bei einem Labor wurde bei einer ersten Messung in der Probe N'ey 2 eine 87%ige Hemmung der Wachstumsrate (G2) konstatiert, jedoch konnte dies bei einer Wiederholungsmessung durch dasselbe Labor nicht bestätigt werden (2,6% Hemmung (G2)). Vermutlich waren dafür wie beim Leuchtbakterientest *confounding factors* verantwortlich.

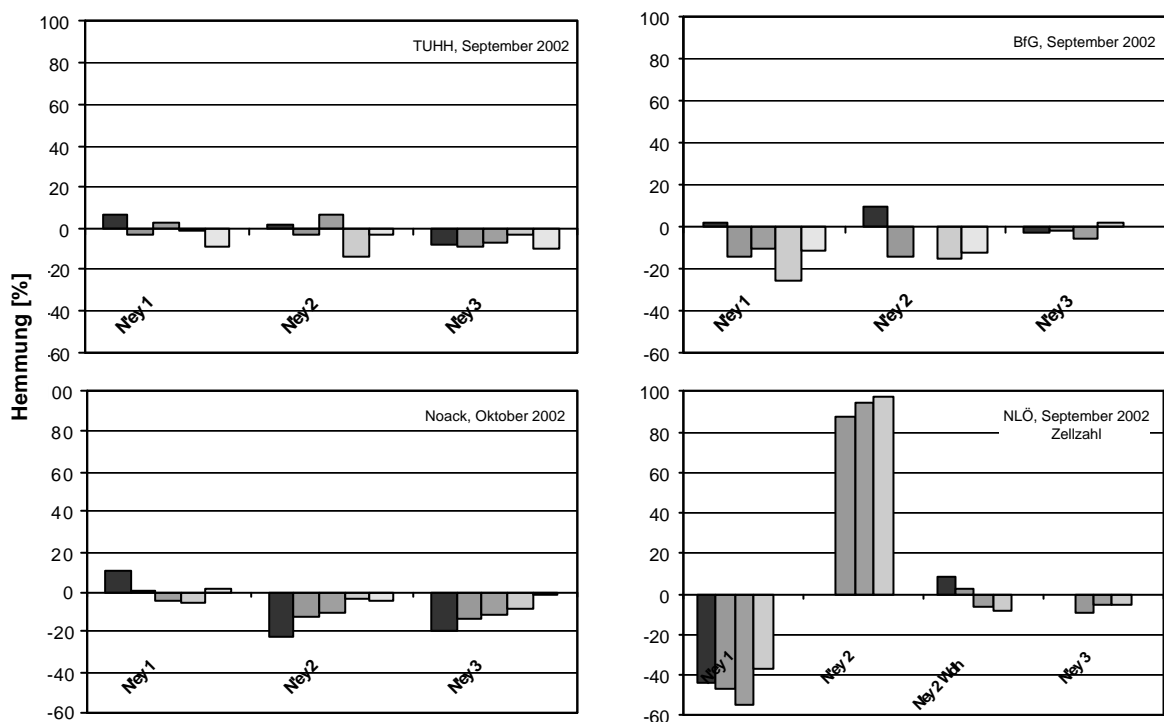


Abb. 35: Ringtest-Ergebnisse des marinen Algentests

National wurde unter Berücksichtigung des Biomasseintegrals bisher der Grenzwert für eine signifikante Hemmung bei = 20% festgelegt. Bei Anwendung

der Wachstumsrate ist eine deutlich geringere Hemmung (vermutlich zwischen 5-10%) als Grenzwert anzunehmen.

➤ Ringtest-Ergebnisse des akuten Amphipodentests

Im Ringtest wurden die an der TUHH gezüchteten Corophien als Testorganismen von beiden Ringtestteilnehmern eingesetzt. Dazu wurden die Tiere unmittelbar vor der Probenahme zum Dr. Noack-Laboratorium gebracht. Die Mortalität in den Kontrollansätzen war bei beiden Laboratorien gering (0-1%). Die Testergebnisse zeigten in beiden Laboratorien sehr gute Übereinstimmung, die im Vergleich zum Vor-Ringtest deutlich gesteigert wurde. Dies Ergebnis spricht für den Einsatz einheitlicher Testorganismen. Das eine Laboratorium war bei allen Proben geringfügig sensativer, wobei die Abweichung zwischen den Laborergebnissen = 8% war.

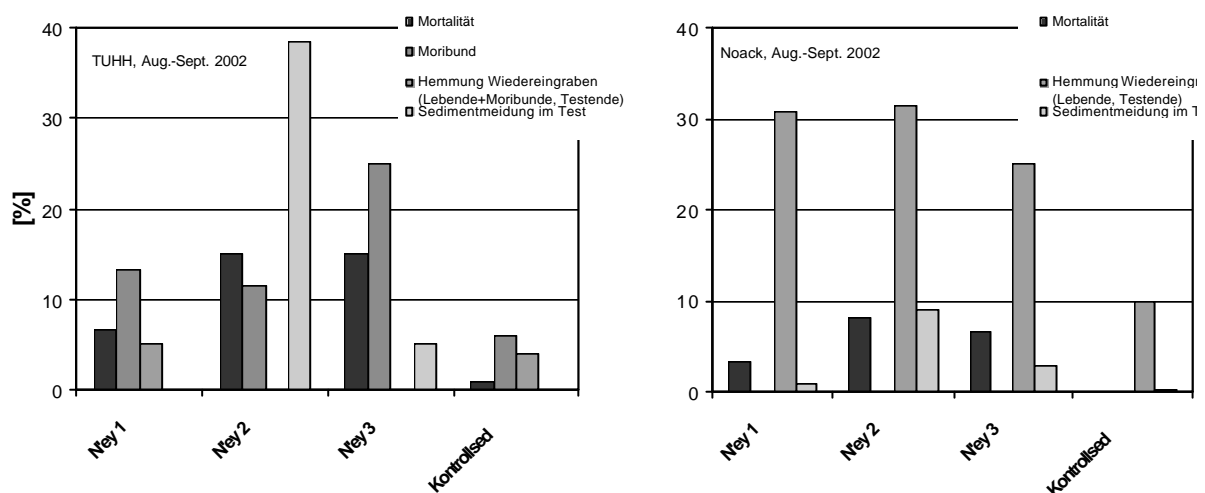


Abb. 36: Ringtest-Ergebnisse des Amphipodentests

Die höchste Mortalität wurde von dem einen Labor in Ney 2 und Ney 3 mit einer Mortalität von 15% ermittelt. Diese Proben zeigten zwar auch in dem anderen Labor die höchsten Mortalitäten, doch betrugen sie nur 8,3 und 6,7%. Es kann also von keinem signifikanten Effekt ausgegangen werden. Als subletale Parameter wurden von beiden Laboratorien „Hemmung des Wiedereingrabens am Testende“ (bezogen auf die Überlebenden) sowie „Sedimentmeidung während des Tests“ erhoben. Die Ergebnisse dieser Parameter waren zwischen den Laboratorien unterschiedlich. Dennoch lieferten

sie eine zusätzliche Information über die Probentoxizität, die sich bei beiden Laboratorien eindeutig von den Kontrollen unterschieden. Darüber hinaus wurde von dem einen Labor eine Differenzierung der Lebenden in „fit“ und „moribund“ vorgenommen. Die Ringtest-Ergebnisse zeigten, dass die subletalen Parameter nach weiterer Harmonisierung zwischen den Laboratorien als ergänzende Parameter in die Bewertung des toxischen Potentials der Sedimente einfließen und dadurch die Aussagekraft und Sensitivität des Tests erhöhen können (vgl. auch McGee et al. 1993).

7.2.2.3. Ringtest- Ergebnisse der chemischen Sedimentanalyse

Die Ergebnisse der chemischen Analyse der Sedimentproben wurde in Tabelle 28 im Vergleich zum Richtwert 1 (RW 1) der HABAK-WSV und zum Kontrollsediment des Amphipodentests dargestellt. Es ist darauf hinzuweisen, dass der RW 1 sich auf die Fraktion < 20 µm TG bezieht, während die Probenergebnisse auf das Gesamtsediment (TG) bezogen wurde (zum Anteil der Fraktion < 20 µm siehe Tabelle 27). Trotz dieses Schadstoff-Verdünnungsfaktors durch größere Sedimentpartikel wurde der RW 1 teilweise überschritten (siehe grau unterlegte in Werte Tabelle 28 und Tabelle 29). Bezüglich des Schwermetallgehalts war der Kupfergehalt der Probe N'ey 2 fast dreimal so groß wie der RW 1. Die Nickelkonzentration der Probe N'ey 1 überstieg ebenfalls den RW 1. Bei der Konzentration organischer Schadstoffe überschritt die Gesamt-Konzentration der gemessenen PCB der Probe N'ey 2 den RW 1 um das Siebenfache. Die Konzentration von PCB 101, PCB 108 und PCB 138 war in der Probe N'ey 3 (nur für PCB 101) und im Kontrollsediment etwas höher als der RW 1. Die Analyse der Nährstoffe Gesamt-Phosphor und Gesamt-Stickstoff zeigte, dass der Gesamt-Phosphor Gehalt in den Proben N'ey 1 und dem Kontrollsediment den RW 1 überstieg.

Tabelle 28: Schwermetallkonzentration der Ringtest-Sedimentproben (bezogen auf TG des Gesamtsediments, TUHH) im Vergleich zum RW 1 (bezogen auf Trockengewicht der Sedimentfraktion < 20 µm, HABAK-WSV (BfG 1999)) (TG = Trockengewicht)

Metall	Einheit	RW 1	N'ey 1	N'ey 2	N'ey 3	Kontrollsed
Arsen	mg/kg TG	30,00	16,14	2,54	1,57	6,40
Cadmium	mg/kg TG	2,50	1,05	0,18	0,05	0,46
Chrom	mg/kg TG	150,00	41,55	10,93	9,08	29,02
Kupfer	mg/kg TG	40,00	23,65	117,35	5,01	6,36
Quecksilber	mg/kg TG	1,00	0,06	< 0,02	< 0,02	0,10
Nickel	mg/kg TG	50,00	59,20	38,80	18,53	43,85
Blei	mg/kg TG	100,00	60,10	21,70	6,33	21,15
Zink	mg/kg TG	350,00	151,90	99,95	30,28	68,95
Kobalt	mg/kg TG	kein RW	8,50	1,25	0,47	4,43
Eisen	%	kein RW	2,92	0,81	0,25	0,96

Tabelle 29: Konzentration der organischen Schadstoffe der Ringtest-Sedimentproben (bezogen auf das Trockengewicht des Gesamtsediments, TUHH) im Vergleich zum RW 1 (bezogen auf das Trockengewicht der Sedimentfraktion < 20 µm, HABAK-WSV (BfG 1999))

Organischer Schadstoff	Einheit	RW 1	N'ey 1	N'ey 2	N'ey 3	Kontrollsed
PCB 28	µg/kg TG	2	***	<1	<1	<1
PCB 52	µg/kg TG	1	***	<1	<1	<1
PCB 101	µg/kg TG	2	***	21	3	3
PCB 118	µg/kg TG	3	1	14	<1	<1
PCB 138	µg/kg TG	4	2	41	4	5
PCB 153	µg/kg TG	5	2	37	3	3
PCB 180	µg/kg TG	2	1	33	2	5
Σ PCB	µg/kg TG	20	6	146	12	16
α-Hexachlorcyclohexan	µg/kg TG	0.4	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
γ-Hexachlorcyclohexan	µg/kg TG	0.2	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Hexachlorbenzol	µg/kg TG	2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Pentachlorbenzol	µg/kg TG	1	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
p,p'-DDT	µg/kg TG	1	<0,008	0,018	<0,008	<0,008
p,p'-DDE	µg/kg TG	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
p,p'-DDD	µg/kg TG	3	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Σ 6 PAK*	mg/kg TG	1	0,552	0,406	0,253	0,615
Σ 13 PAK**	mg/kg TG	kein RW	1,04	0,8	0,57	1,20
Σ KH	mg/kg TG	300	140	<50	<50	<50
TBT	µg /kg TG	20	Keine Analyse	Keine Analyse	Keine Analyse	Keine Analyse

Legende:

- * Summe von 6 PAK (Fluoranthren, Benzo(b)fluoranthren, Benzo(k)fluoranthren, Benzo(a)pyren, Benzo(ghi)perylene, Indeno(1,2,3-cd)pyren)
- ** Summe von 13 PAK (obigen 6 und Fluoren, Phenanthren, Anthracen, Pyren, Benzo(a)anthracen, Chrysen, Dibenzo[a,h]anthracen)
- *** Keine Auswertung möglich, da Überlagerung durch andere Substanzen

 Überschreitung RW 1

Tabelle 30: Konzentration der Nährstoffe Phosphor (P) und Stickstoff (N) der Ringtest-Sedimentproben (bezogen auf das Trockengewicht des Gesamtsediments, TUHH) im Vergleich zum RW 1 (bezogen auf das Trockengewicht der Sedimentfraktion < 20 µm, HABAK-WSV (BfG 1999))

Nährstoffe	Einheit	RW 1	N'ey 1	N'ey 2	N'ey 3	Kontroll-sed
P ges	mg/kg TG	500	836	398	91	517
N ges	mg/kg TG	1500	3	1	< 1	1

Zum Vergleich der Gesamtschadstoffbelastung der Proben untereinander und im Vergleich zum RW 1 wurden die Schadstoffkonzentrationen in Abbildung 37 und 38 dargestellt. Dabei gibt Abbildung 37 (A) einen Gesamtüberblick und in Abbildung 38 (B und C) sind die Schadstoffe hinsichtlich der Höhe des RW 1 aufgeteilt in Werte > 20 µg/ kg bzw. mg/kg (B) und = 20 µg/ kg bzw. mg/kg (C). Auf diese Weise wurde deutlich, dass die Gesamtbelastung in der Probe N'ey 2 und nachfolgend in N'ey 1 am größten war. Die Probe N'ey 3 war am geringsten belastet, sie war jedoch auch die sandigste Probe.

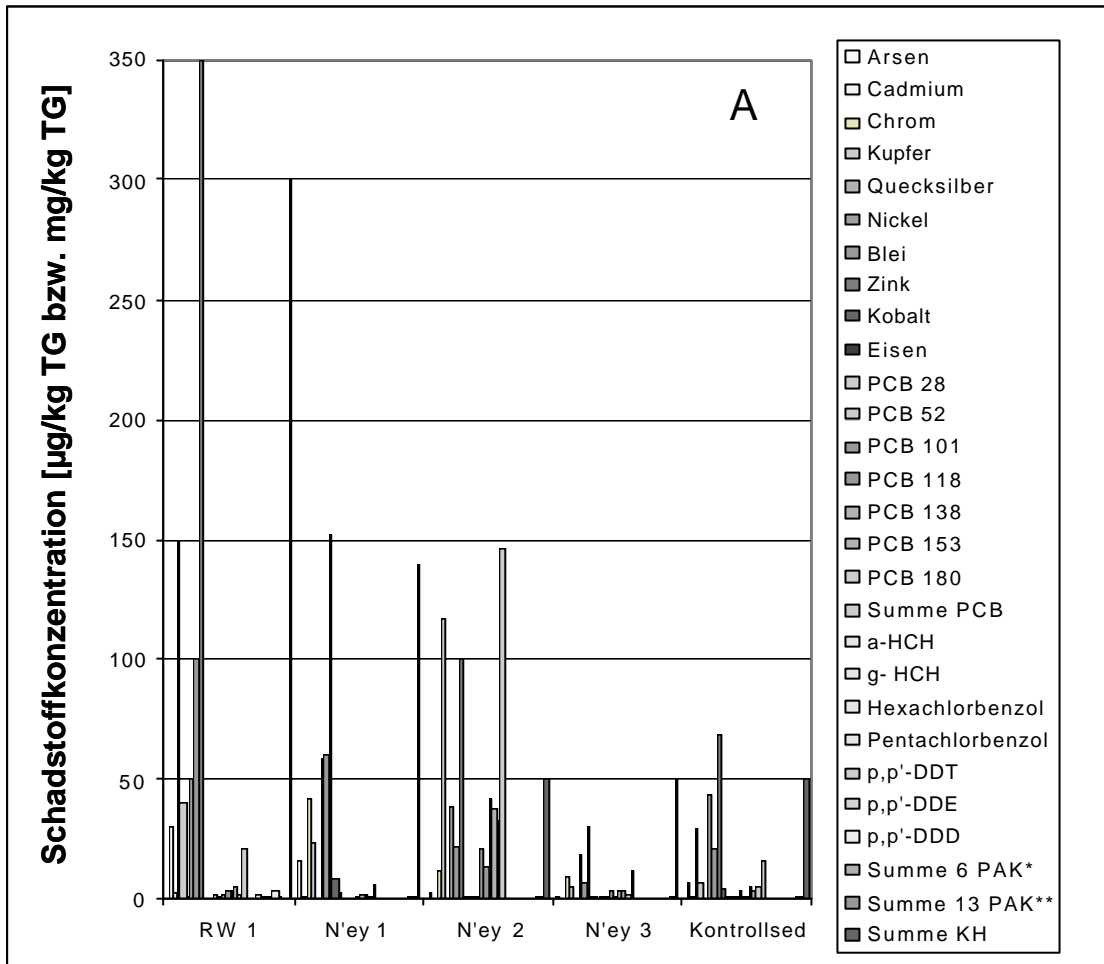
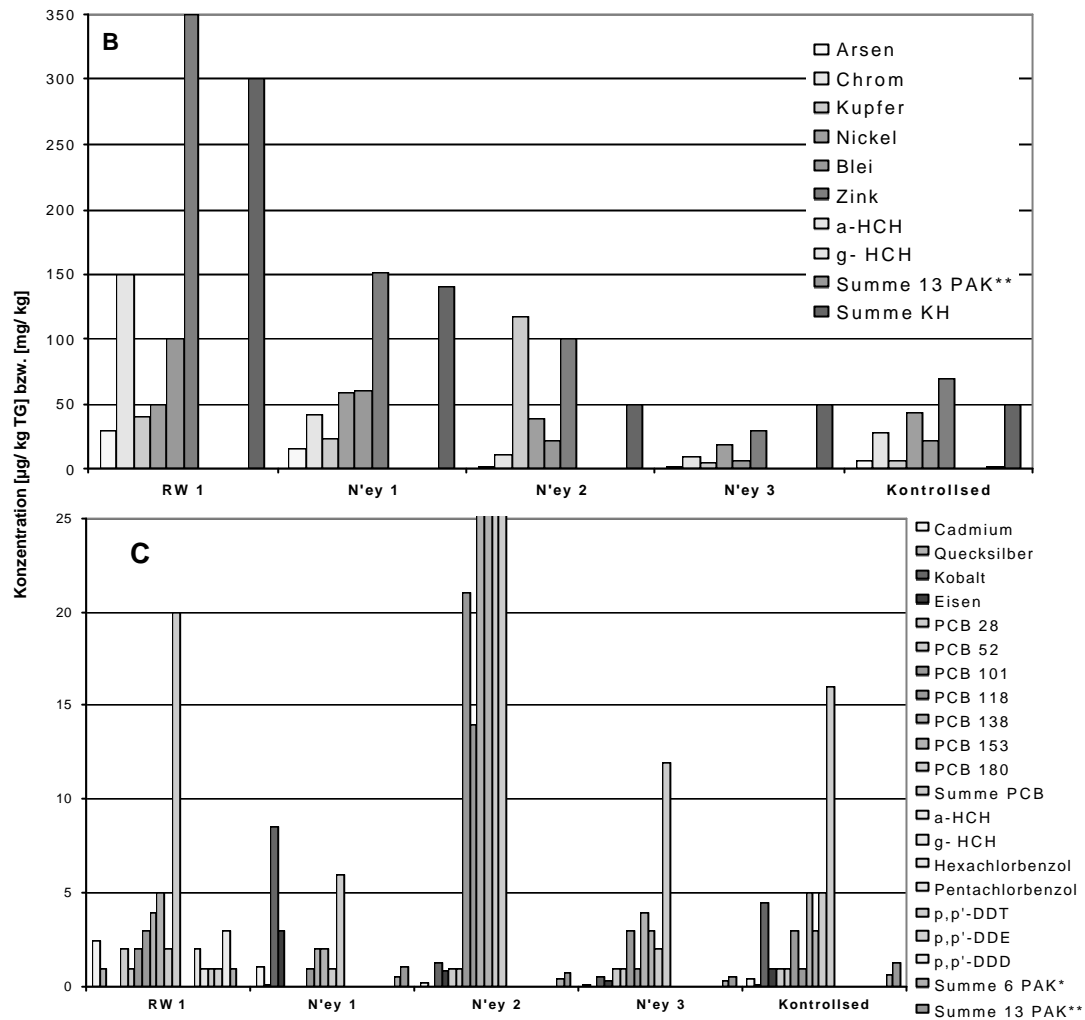


Abb. 37: Gesamt-Darstellung der Schadstoffbelastung der Ringtest-Sediment-proben im Vergleich zum RW 1 der HABAK-WSV



7.2.2.4. Zusammenfassung der Ringtest-Ergebnisse

Die Probe N'ey 2 wurde sowohl nach der chemischen Analyse als auch vom Meerwasser-Leuchtbakterientest bei allen Ringtestteilnehmern als toxisch identifiziert. Im akuten Amphipodentest war dies ebenfalls bei allen Ringtestteilnehmern die Probe mit der höchsten Mortalität. Der Effekt konnte jedoch nicht sicher als signifikant angesprochen werden. Im marinen Algentest hatten zwei der vier Laboratorien in der Probe N'ey 2 die größte Hemmung der Wachstumsrate (ca. 10%). Von den anderen zwei Laboratorien wurde die größte Hemmung der Wachstumsrate (ca. 10%) im marinen Algentest in der Probe N'ey 1 festgestellt. Der Schwellenwert für einen signifikanten Effekt muss beim marinen Algentest aufgrund des Heranziehens der Wachstumsrate als Endpunkt neu bewertet werden. Er wird vermutlich bei 5-10% Hemmung der Wachstumsrate liegen. Weitere Ausführungen zur Herangehensweise bei der ökotoxikologischen Bewertung mariner Sedimente werden unter Kapitel 9.1.4 gemacht. Beim marinen Algentest besteht aufgrund der weiterhin festgestellten Fördereffekte bei allen Ringtestteilnehmern über dieses Projekt hinaus Optimierungsbedarf.

Insgesamt hat der Ringtest gezeigt, dass die Biotests zwischen den Laboratorien sehr gut harmonisiert sind.

7.3. Einsatz des Testsets auf weitere Sedimente der Nordsee und Ostsee

Zur weiteren Validierung des marinen Biotest-Sets sowohl bezüglich der Durchführung der Testverfahren als auch zur Sensitivität der Verfahren bzw. zur Ermittlung des toxischen Potentials von Brack-/ Meerwasser-Sedimenten wurden von der TUHH weitere Sedimente der Nordsee und Ostsee untersucht.

Zunächst wurde das Testset auf weitere Nordsee und Ostsee Sedimente derselben Seereisen wie im Vor-Ringtest (Probenahme durch BFA –Fischerei und der BSH, 2001) angewendet (siehe Stationskarten Abb. 27 und Abb. 28). Darüber hinaus wurden Schadstoffgradienten am Fuße einer Kupferhüttenschlacke auf Wangerooge in Zusammenarbeit mit dem NLÖ und auf Norderney in Zusammenarbeit mit der BfG (2002) untersucht. Es wurde auf Wangerooge und Norderney jeweils ein Transekt im Wattenmeer (jeweils 5 Proben) am Fuße der Metallhüttenschlacken mit dem marinen Biotest-Set untersucht.

Das marine Testset wurde damit zusätzlich zu den (Vor-) Ringtests auf weitere 18 natürliche Sedimentproben angewendet, zu denen teilweise auch chemische Analyse-Daten vorliegen.

Tabelle 31: Übersicht über Sedimentproben, in denen durch mindestens eines der marinen Testverfahren ein signifikant toxischer Effekt nachgewiesen wurde

Test Probe	Brack-/Meerwasser Leuchtbakterientest (% Hemmung Biolumineszenz)	Brack-/Meerwasser Algentest (% Hemmung Wachstumsrate)	Akuter Amphipodentest (% Mortalität)
O-OD	21 (G1)	nicht toxisch	nicht toxisch
O-722	21 (G1)	nicht toxisch	nicht toxisch
O-710	nicht toxisch	36 (G1)	nicht toxisch
Kontrollsed	22 (G1)	nicht toxisch	nicht toxisch

In Tabelle 31 sind die Test-Ergebnisse der Proben dargestellt, in denen in mindestens einem der drei Testverfahren ein signifikanter, toxischer Effekt ermittelt wurde. Von den 18 Sedimentproben wurde folglich nur in vier Proben ein toxischer Effekt und dieser jeweils nur durch ein Testverfahren nachgewiesen. Es muss darauf hingewiesen werden, dass bisher in die Bewertung der Amphipoden-Toxizität nur die prozentuale Mortalität eingingen. Subletale Parameter, die die Sensitivität des Testverfahrens steigern, wurden erst im Verlauf des Projekts weiterentwickelt und deshalb noch nicht berücksichtigt. In den Niederlanden wurden 39 marine Baggergut-Proben u.a. mit dem akuten Amphipodentest mit *C. volutator* untersucht. Dabei war die prozentuale Mortalität in sechs Proben $> 20\%$ - $< 50\%$ und in vier Proben $> 50\%$. In den übrigen 29 Proben war die Mortalität $\leq 20\%$ (Stronkhorst 1998).

8. Bilanz: Validieren, Harmonisieren und Implementieren eines minimalen biologischen Testsets zur Bewertung von Brack-und Meerwasser – Sedimentproben

Das Testset bestand aus zwei Tests für die Wasserphase (Eluate): dem Leuchtbakterientest und den marinen Algentest mit *Phaeodactylum tricornutum* sowie dem Gesamtsedimenttest mit dem Amphipoden *Corophium volutator*. Damit wurden zwei akute Tests und ein chronischer Test ausgewählt, die als internationale (ISO) und nationale (DIN) Standards vorlagen (DIN EN ISO 11348-1-3; DIN EN ISO 10253) bzw. sich im ISO Standardisierungsverfahren (akuter Amphipodentest, ISO DIS 16712) befanden.

	0 100%	Erreicht	Mögliche Weiterentwicklung
Etablieren		<ul style="list-style-type: none"> • TUHH (Test-Set) • Dr. Noack-Laboratorium (Test-Set) • Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) (LBT, MAT) • Niedersächsisches Landesamt für Ökologie (NLÖ) (LBT, MAT) 	<ul style="list-style-type: none"> • Künstliches Kontroll-/ Referenzsediment für Amphipodentest (v.a. für Referenzsubstanz/ Stoffprüfung) • Chronischer Amphipodentest
Validieren		<ul style="list-style-type: none"> • Modifikation LBT für Brack-/Meerwasser • Ringtest: Brack-/Meerwasser LBT • Erweiterung Algentest auf Brack-/Meerwasser • Ergänzung subletale Parameter Amphipodentest • EU-BEQUALM Ringtest: Amphipodentest • Zucht + Kultivierung Corophium • Vor-Ringtest: Test-Set an Ost-/ Nordsee Sedimentproben • Ringtest: Test-Set an Norderney-Sedimentproben 	<ul style="list-style-type: none"> • Bewertung Algentest-Ergebnisse (μ) • Bewertung subletale Parameter Amphipodentest • Bewertung der Sedimente – größerer Probenumfang notwendig
Harmonisieren		<ul style="list-style-type: none"> • Zwischen den Laboratorien <ul style="list-style-type: none"> ◦ Eluatherstellung, Testdurchführung u. -auswertung • Zwischen den Tests <ul style="list-style-type: none"> ◦ künstliches Meerwasser, Eluatherstellung 	<ul style="list-style-type: none"> • Wachstum Mariner Algentest (Kontrolle/ Fördereffekte der Eluate) • QS subletale Parameter Amphipodentest
Implementieren		<ul style="list-style-type: none"> • Voraussetzung: ISO/ DIN Standards: <ul style="list-style-type: none"> ◦ ISO DIS Amphipodentest ◦ ISO Revision Mariner Algentest ◦ ISO Revision Leuchtbakterientest • Zucht + Kultivierung Corophium \rightarrow Testaufbau in weiteren Laboratorien • Berücksichtigung in HABAK-WSV, SH Baggergut-RL geplant 	

Abb. 39: Bilanz der Implementierung des minimalen Biotest-Sets (LBT = Leuchtbakterientest, MAT = Mariner Algentest)

Das Testset wurde erfolgreich von vier Laboratorien etabliert: von der TUHH, vom Dr. Noack-Laboratorium für Angewandte Biologie, von der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) und vom Niedersächsischen Landesamt für Ökologie (NLÖ) (siehe Abb. 39). Die beiden Behörden haben den akuten

Amphipodentest bisher noch nicht aufgebaut, streben dieses aber für die Zukunft an.

Die einzelnen Testverfahren wurden auf Ihre Eignung für die Bewertung von Meer- und Brackwasser-Sedimentproben geprüft und den Erfordernissen angepasst. Dafür war eine Modifikation des Leuchtbakterientests sowie die Erweiterung der Testvorschrift des marinen Algentests auf Meer- und Brackwasser-Eluate notwendig. Die Modifikation des Leuchtbakterientests für Brack- und Meerwasserproben wurde in einem deutschlandweiten Ringtest unter Beteiligung von 24 Laboratorien validiert.

Im akuten Amphipodentest wurde die Mortalität erhoben und durch die Ergänzung von subletalen Parametern konnten Effekte frühzeitiger und differenzierter erfasst werden. Der akute Amphipodentest basierte zunächst auf Wildfängen von *Corophium volutator*. Da dies aber mit einer unterschiedlichen Vorbelastung der Freilandtiere, der nicht gewährleisteten Verfügbarkeit im Winter sowie mit einem Eingriff ins Ökosystem verbunden war, wurde der Schlickkrebs *Corophium volutator* an der TUHH erstmals über einen Zeitraum von einem Jahr zur Reproduktion unter Laborbedingungen gebracht. Es gelang, die Tiere auch im Winter zu reproduzieren. Die Fitness der gezüchteten Tiere wurde durch langfristige Haltungen, Toxizitätstests und morphologischen Untersuchungen unter dem Binokular (einschließlich der Prüfung auf Parasitenbefall) überprüft. Mit der erfolgreichen Reproduktion und Kultivierung des Schlickkrebses im Labor wurde sowohl ein großer Beitrag für die Implementierung des Tests in anderen Laboratorien geleistet als auch die Basis für die Entwicklung eines chronischen Tests gelegt.

Die Probenahme, Probenvorbereitung, Eluatherstellung und die Testdurchführung wurde sowohl zwischen den Testverfahren als auch zwischen den Laboratorien harmonisiert. Es wurde dasselbe künstliche Brackwasser und künstliche Meerwasser für die Eluatherstellung, für den Leuchtbakterientest und für den Algentests eingesetzt. Für die Tests der Wasserphase wurde eine vergleichbare Vorschrift für Brackwasser- und Meerwasser- Sedimente bzw. Eluate entwickelt. Die Harmonisierung der Verfahren zwischen den Laboratorien und die Validität des Testsets wurde durch einen Vor-Ringtest an Ostsee- und Nordsee-Sedimentproben und durch einen Ringtest an Norderneyer-Sedimentproben gezeigt.

Das Projekt war aufgrund der engen Kooperation mit dem DIN Arbeitskreis 5.3 „Marine Biotests“ und aufgrund der Zugehörigkeit zur ISO Delegation stark in den Standardisierungsprozess eingebunden. Der kontinuierliche, nationale und internationale Expertenaustausch war sowohl für die Qualität als auch für die Effizienz des Projekts von herausragender Bedeutung. Aufgrund der Notwendigkeit der Implementierung mariner Biotests zur Umsetzung internationaler rechtlicher Anforderungen war die Rückkopplung der Projektergebnisse in den Standardisierungsprozess immens wichtig.

Darüber hinaus wurde intensive, projektbegleitende Öffentlichkeitsarbeit geleistet (siehe Abbildung 40), um die Implementierung des Testsets auch nach Abschluss des Projekts zu fördern.

Der große Erfolg des Projekts zeigt sich auch daran, dass sowohl die Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) als auch das Landesamt für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein (LANU) die Implementierung des Testsets in die jeweiligen Baggergut-Richtlinien planen.

Weitere nationale und internationale Projekt- (Re-) Präsentationen	
Präsentationen (Vortrag, Poster)	<ul style="list-style-type: none"> • Workshop “River Sediments and Related Dredged Material in Europe” 2000, Geesthacht • Deutsche SETAC Tagung 2000, Hamburg • BfG Ostsee Workshop 2002, Berlin • SETAC Europe 13th Annual Meeting - 2003, Hamburg
Veröffentlichung	<ul style="list-style-type: none"> • Ecotoxicology 2002, Vol 11 (5), 379-384
Delegation	<ul style="list-style-type: none"> • 19. ISO/ TC 147 „Water quality“ Sitzung 2000, Türkei • 20. ISO/ TC 147 „Water quality“ Sitzung 2002, USA
Teilnahme	<ul style="list-style-type: none"> • EU-BEQUALM Workpackage 2 - Water and sediment bioassays – Ringtests und Workshop, U.K. • SETAC World Congress 2000, U.K.
Kooperation	<ul style="list-style-type: none"> • J. Thain & Dr. Y. Allen, CEFAS, U.K. • M. Scholten & K. Kaag, TNO-MEP, NL • C. Schipper & Dr. B. Kater, RIKZ, NL • Dr. P. Mayer, DMU, DK • Dr. R. Scroggins, Ca EPA, Canada

Abb. 40: Nationale und internationale Projekt-(Re-)Präsentationen

9. Ausblick

9.1. Optimierung und Weiterentwicklung des minimalen Testsets

Das bestehende Testset sollte zukünftig hinsichtlich der folgenden Punkte optimiert und weiterentwickelt werden (Abb. 39):

9.1.1. Meer-/ Brackwasser Algentest

- Das Wachstum in den Kontrollen sollte optimiert werden, um die Schwankungen der Testergebnisse zwischen den Laboratorien und die Fördereffekte bei der Untersuchung von Brack-/ Meerwasser-Eluaten weiter zu reduzieren.
- Aufgrund der Einführung der Wachstumsrate als Parameter und die Erweiterung des Tests auf die Untersuchung von Eluaten muss für den Meer-/ Brackwasser Algentest analog zum Süßwasseralgentest der Grenzwert für eine signifikante Hemmung festgelegt werden. Er wird vermutlich bei einer Hemmung der Wachstumsrate von 5-10% liegen. Bei der Grenzwertfestlegung sind die Schwankungen der Kontrollen und Proben innerhalb eines Labors und die laborübergreifenden Schwankungen zu berücksichtigen.

9.1.2. Akuter Amphipodentest

- Die Erhebung der subletalen Parameter „Sedimentmeidung während des Tests“, „Wiedereingrabeverhalten am Testende“ sowie die Unterscheidung des Zustandes der Tiere am Testende als „fit“, „moribund“ und „tot“ sollte fortgesetzt und weiterentwickelt sowie deren Integration in die Testauswertung angestrebt werden.
- Durch den Erfolg der Reproduktionsversuche mit *Corophium volutator* im Labor wurde die Basis für die Entwicklung eines verlängerten und chronischen Amphipodentests gelegt. Der Bedarf eines solchen

Testverfahrens wurde vielfach formuliert (u.a. HELCOM 1992; OSPARCOM 1998; EC TGD 2002).

- Steigt der Bedarf an gezüchteten und langfristig gehälteren Schlickkrebsen, so ist die Massenkultur der Futteralge *Navicula salinicola* weiterzuentwickeln.
- Für die Implementierung des Amphipodentests zur Stoffbewertung wird die Entwicklung eines künstlichen Kontroll-/ Referenzsediments empfohlen.
- Aufgrund des großen Testvolumens (1 l Bechergläser) ist der Amphipodentest aufwendig. Untersuchungen zur Reduzierung des Testvolumens werden empfohlen (siehe auch Ferretti 2002).

9.2. Anwendung des Testsets und Prüfung der Ergebnisse auf Redundanz und Komplementarität

Bei der Anwendung eines Testsets auf eine Sedimentprobe kann nicht davon ausgegangen werden, dass die eingesetzten Organismen ein toxisches Potential einer Umweltprobe einheitlich anzeigen. Die spezifische Bioverfügbarkeit der Schadstoffe und die unterschiedlichen Sensitivitäten der Tests gegenüber Schadstoff(-gemischen) führen zu sich ergänzenden Informationen und möglicherweise sogar zu gegenläufigen Ergebnissen. Für diese komplexe Aufgabe der Interpretation und Bewertung der Testset-Ergebnisse ist die Entwicklung einer integrierenden Methode zur Bewertung der Sedimentqualität für das Sedimentmanagement dringend erforderlich. Das Testset ist durch Faktorenanalyse sowohl auf seine Redundanz (Ahlf et al. 2002) als auch auf die Komplementarität der Testergebnisse zu prüfen. Für diese Prüfung und die Ableitung von Sedimentqualitätskriterien ist eine umfangreiche Datenerhebung und der Aufbau einer Datenbank erforderlich, wobei die Datengrundlage dafür mit diesem Projekt geschaffen wurde.

9.3. Entwicklung neuer mariner Gesamtsedimenttests

➤ Entwicklung eines marinen Nematodentests unter Berücksichtigung der multixenobiotischen Resistenz (MXR)

Nematoden sind wichtige Vertreter des limnischen und marinen Benthos. Für die Bewertung von Boden und limnischen Sedimenten befindet sich der Nematodentest mit *Caenorhabditis elegans* und den Parametern Wachstum und Reproduktion im nationalen Standardisierungsverfahren (DIN). Ökotoxikologische Untersuchungen zeigten, dass Nematoden sensitiv gegenüber Schwermetallen, jedoch weniger sensitiv gegenüber organischen Schadstoffen sind. An der TUHH konnte in einer Diplomarbeit (Meyer 2000) erstmals nachgewiesen werden, dass Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) über den Mechanismus der "multixenobiotischen Resistenz" (MXR) verfügen, der sie vor Umweltgiften und endogenen Toxinen schützt. Die MXR basiert auf der Aktivität von P-Glykoproteinen (P-gp), die verschiedene Stoffe aus Zellen transportieren (Effluxsystem). Die Induktion und die Konzentration an P-Glykoproteinen (P-gp) könnte mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffs als Frühwarnsystem und ergänzenden Parameter zur Wachstumsrate herangezogen werden. Im Rahmen der Diplomarbeit wurde versucht, den Testaufbau mit dem marinen Nematoden *Pellioditis marina* zu übertragen. Die dafür notwendige Synchronisation der Altersstadien und die Gewinnung dieser Tiere in ausreichender Biomasse konnte bisher nicht erreicht werden. Dennoch ist die Erhebung von Biomarkern im intakten Tier als Frühwarnsystem und zum Aufschluss des Wirkmechanismus in Kombination mit den klassischen Biotest-Parametern (Wachstum und Reproduktion) ein vielversprechender Ansatz.

➤ Weitere Tests mit Repräsentanten des marinen Benthos

Es wird vielfach der Bedarf an weiteren, v.a. chronischen, marinen Gesamtsedimenttests gesehen. Hierbei wäre neben dem Nematodentest die Entwicklung von Gesamtsedimenttests mit den klassischen Phyla Bakterien

und Algen denkbar. Darüber hinaus sollten jedoch auch die Besonderheiten des marinen Ökosystems wie z.B. die 15 exklusiv marinen Metazoa Phyla und auch das komplexe Nahrungsnetz im Blickwinkel behalten werden.

9.4. Europäische Harmonisierung bezüglich der Erhebung und der Bewertung der marinen Sedimentqualität

Innerhalb Europas wird die marine Sedimentqualität mit unterschiedlichen Testsets erhoben (vgl. Stronckhorst 1998, Brils et al. 2000 , Niederlande; Heijerick et al. 2000, Belgien; Thain et al. 2000, Großbritannien). Im Rahmen dieses Projekts wurde die europäische Kompatibilität des Testsets angestrebt, diesbezüglich besteht jedoch Harmonisierungsbedarf. Darüber hinaus gibt es innerhalb der EU kein einheitliches Konzept zur Bewertung mariner Sedimente. Die Konzepte sind noch nicht ausgereift und divergieren auf verschiedenen Ebenen:

- Die Bewertungsgrundlage ist entweder ausschließlich die Ökotoxizität der Original-Sedimentprobe (z.B. Stronckhorst 1998) oder es werden die Verdünnungsstufen der Eluate und nach Möglichkeit auch des Sediments in der Bewertung berücksichtigt (BfG 1999; BfG 2000).
- Es besteht international Übereinstimmung darin, dass bei der Feststellung der marinen Sedimentqualität ein Testset angewendet werden soll. Jedoch fließen die Testergebnisse in unterschiedlicher Form in die Klassifizierung mariner Sedimente ein: Es werden entweder alle Testergebnisse in die Klassifizierung integriert (z.B. Ahlf & Gratzner 1999; Brüggemann 1997; Stronckhorst 1998) oder es wird für die jeweilige Sedimentprobe nur der sensitivste Test berücksichtigt (BfG 1999; BfG 2000).
- Für die Integration der gesamten Testset- Ergebnisse in die Klassifizierung von Sedimenten werden unterschiedliche Methoden angewandt z.B. Cluster-Analyse (Ahlf & Wild-Metzko 1992), Hasse-Diagramm-Technik (Brüggemann 1997), Fuzzy-Logic Klassifizierung (Heise et al. 2000).
- Auf der nächsten zu harmonisierenden Ebene steht die Integration der Toxizitätstest-Ergebnisse mit der chemischen Analyse und der *in situ*

Struktur der benthischen Lebensgemeinschaft (Sediment-Qualitäts-Triade, Chapman et al. 1995; Ahlf et al. 2002).

Im Hinblick auf die länderübergreifende Meeresumwelt und die zunehmende Bedeutung des Völker- und EU-Rechts sind sowohl die Weiterentwicklung als auch die Harmonisierung der marinen Sedimentmanagement-Konzepte von sehr großer Bedeutung.

9.5. Implementierung des marinen Biotest-Sets für weiteres Emissionsmanagement

Die Implementierung mariner Biotests sollte neben dem Baggergut-Management auch für das *Ecological Risk Assessment* und *Management* weiterer Emissionen angewendet werden: für die Stoffbewertung (EC TGD 2002), insbesondere wenn die Stoffe unmittelbar in die marine Umwelt ausgebracht werden, und für jegliche Einleitungen in die Meere (für Off-Shore Einleitungen OSPARCOM 1995). Dies ist aufgrund der Besonderheit und Komplexität des marinen Ökosystems (vgl. Abbildung 2) zur Einhaltung des Vorsorgeprinzips geboten.

10. Zusammenfassung

Um die Qualität von Meer- und Brackwasser-Sedimenten hinsichtlich ihres toxischen Potentials bewerten zu können, ist der Einsatz mariner Biotests erforderlich. Deshalb sind marine Biotestverfahren auch in internationalen Richtlinien zum Monitoring der Meeresumwelt und zum Baggergut-Management (OSPARCOM; HELCOM; LC; PIANC; IDAC/ CEDA) vorgesehen. In den Baggergut-Richtlinien sind sie Bestandteil der Risikoabschätzung (*Risk Assessments*) einer Verbringung des Baggerguts ins Meer und stellen somit die Basis für das Risikomanagement (*Risk Management*) dar.

Aufgrund des nationalen Forschungs- und Erfahrungsrückstands bezüglich einer ökotoxikologischen Bewertung von marinen Sedimentproben wurden marine Biotests in den bisherigen nationalen Baggergut-Richtlinien nicht oder nur in geringem Umfang berücksichtigt. Im Rahmen dieses Projekts wurde erstmals ein marines Biotest-Set zur Bewertung von Meer- und Brackwasser-Sedimenten innerhalb Deutschlands validiert, harmonisiert und in nationalen Laboratorien implementiert. Damit steht es für die nationale Umsetzung der internationalen Anforderungen bereit.

Für eine Implementierung des Testsets im nationalen Umweltrecht war die Standardisierung der Testverfahren von großer Bedeutung. Deshalb wurde das Projekt in enger Zusammenarbeit mit dem nationalen Standardisierungsgremium, dem DIN Arbeitskreis „Marine Biotests“ und der internationalen Standardisierungsorganisation (ISO/ TC 147 „Water quality“) durchgeführt.

Das Testset besteht aus zwei Tests für die Wasserphase (Eluate): dem Leuchtbakterientest und den marinen Algentest mit *Phaeodactylum tricornutum* sowie dem Gesamtsedimenttest mit dem Amphipoden *Corophium volutator*. Damit wurden zwei akute Tests und ein chronischer Test ausgewählt, die als

internationale (ISO) und nationale (DIN) Standards vorlagen (DIN EN ISO 11348-1-3; DIN EN ISO 10253) bzw. sich im ISO Standardisierungsverfahrens (akuter Amphipodentest (ISO DIS 16712)) befanden.

Das Testset wurde erfolgreich von vier Laboratorien etabliert: von der Technischen Universität Hamburg-Harburg (TUHH), vom Dr. Noack-Laboratorium für Angewandte Biologie, von der Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) und vom Niedersächsischen Landesamt für Ökologie (NLÖ). Die beiden Behörden haben den akuten Amphipodentest bisher noch nicht aufgebaut streben dieses aber für die Zukunft an.

Die einzelnen Testverfahren wurden auf Ihre Eignung für die Bewertung von Meer- und Brackwasser-Sedimentproben geprüft und den Erfordernissen angepasst. Dafür war eine Modifikation des Leuchtbakterientests sowie die Erweiterung der Testvorschrift des marinen Algentests auf Meer- und Brackwasser-Eluate notwendig. Die Modifikation des Leuchtbakterientests für Brack- und Meerwasserproben wurde in einem deutschlandweiten Ringtest unter Beteiligung von 24 Laboratorien validiert.

Im akuten Amphipodentest wurde die Mortalität erhoben und durch die Ergänzung von subletalen Parametern konnten Effekte frühzeitiger und differenzierter erfasst werden. Der akute Amphipodentest basierte bis dato auf Wildfängen von *Corophium volutator*. Da dies aber mit einer unterschiedlichen Vorbelastung der Freilandtiere, der nicht gewährleisteten Verfügbarkeit im Winter sowie mit einem Eingriff ins Ökosystem verbunden war, wurde der Schlickkrebs *Corophium volutator* an der TUHH erstmals über einen Zeitraum von einem Jahr zur Reproduktion unter Laborbedingungen gebracht. Es gelang, die Tiere auch im Winter zu reproduzieren. Die Fitness der gezüchteten Tiere wurde durch langfristige Hälterungen, Toxizitätstests und morphologischen Untersuchungen unter dem Binokular (einschließlich der Prüfung auf Parasitenbefall) überprüft. Mit der erfolgreichen Reproduktion und Kultivierung

des Schlickkrebsses im Labor wurde sowohl ein großer Beitrag für die Implementierung des Tests in anderen Laboratorien geleistet als auch die Basis für die Entwicklung eines chronischen Tests gelegt

Die Probenahme, Probenvorbereitung, Eluatherstellung und die Testdurchführung wurde sowohl zwischen den Testverfahren als auch zwischen den Laboratorien harmonisiert. Die Harmonisierung der Verfahren zwischen den Laboratorien und die Validität des Testsets wurde durch einen Vor-Ringtest an Ostsee- und Nordsee-Sedimentproben und durch einen Ringtest an Norderneyer-Sedimentproben gezeigt.

Der große Erfolg des Projekts zeigt sich auch daran, dass sowohl die Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) als auch das Landesamt für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein (LANU) die Implementierung des Testsets in die jeweiligen Baggergut-Richtlinien planen.

Die Implementierung mariner Biotests sollte neben dem Baggergut-Management auch für das *Ecological Risk Assessment* und *Management* weiterer Emissionen angewendet werden: für die Stoffbewertung (EC TGD 2002), insbesondere wenn die Stoffe unmittelbar in die marine Umwelt ausgebracht werden, und für jegliche Einleitungen in die Meere. Dies ist aufgrund der Besonderheit und Komplexität des marinen Ökosystems zur Einhaltung des Vorsorgeprinzips geboten.

11. Literaturverzeichnis

1. Ahlf, W. & Wild-Metzko, S., 1992. Bioassay responses to sediment elutriates and multivariate data analysis for hazard assessment of sediment-bound chemicals. *Hydrobiologia*, 235/ 236, S. 415- 418.
2. Ahlf, W., 1994. Biotests an Sedimenten und Böden: Ökotoxikologische Bewertung von kontaminierten Feststoffen. Habilitationsschrift, Technische Universität Hamburg-Harburg.
3. Ahlf, W., 1995. Ökotoxikologische Sedimentbewertung. *Z. Umweltchem.*, 7, S. 84- 91.
4. Ahlf, W. & Gratzner, H., 1999. Erarbeitung von Kriterien zur Ableitung von Qualitätszielen für Sedimente und Schwebstoffe. Berlin, Deutschland, Umweltbundesamt. UBA Texte 41/99, 168 S.
5. Ahlf, W. & Förstner, U., 2001. Managing contaminated sediments. *J. Soils & Sediments*, 1(1), S. 30- 36.
6. Ahlf, W., Hollert, H., Neumann-Hensel, H. & Ricking, M., 2002. A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality. *J. Soils & Sediments*, 2(1), S. 37-42.
7. Ahrens, A., 2002. EU-Methode zur Risikobewertung von gefährlichen Stoffen in der marinen Umwelt. Aktuelle Probleme der Meeresumwelt 2002 - Symposium des BSH, Hamburg.
8. Allen, Y. & Thain, J., 2002. BEQUALM Workpackage 2 - Water column and sediment bioassays - Report of workshops and intercalibration exercises. Unveröffentlicht, 60 S.
9. Allen, Y.T., Kirby, S.J., Reed, J. & Thain, J.E., 2003. Development and application of chronic and sublethal sediment bioassays. Poster Präsentation SETAC Brighton.
10. Andersen, H. V., Kjolholt, J., Poll, C., Dahl, S.O., Stuer-Lauridsen, F., Pedersen, F. & Bjornestad, E., 1998. Environmental risk assessment of surface water and sediments in Copenhagen Harbour. In: Calmano, W., Roeters, P. & Vellinga, T. (Hrsg.). *Contaminated Sediments*. 37 (6-7), S. 263- 272.

11. Ankley, G. T., Katko, A. & Arthur, J.W., 1990. Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9 (3), S. 313- 322.
12. ASTM, 1999. Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine Amphipods. ASTM. Report No. E 1367- 99, 27 S.
13. Bagarinao, T., 1992. Sulfide as an environmental factor and toxicant: tolerance and adaptations in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 24, S. 21- 62.
14. Baraj, B., Hax Niencheski, L.F., Soares, J.A., Martinez, M. & Merkoci, A., 2000. Comparison of chromium speciation by CZE and ion exchange followed by AAS. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 367, S. 12- 16.
15. Beaumont, A.R. & Newman, P.B., 1986. Low levels of tributyl- tin reduce growth of marine micro-algae. *Mar. Pollut. Bull.*, 17(10), S. 457- 461.
16. Becker, D.S., Bilyard, G.R. & GINN, T.C., 1990. Comparisons between sediment bioassays and alterations of benthic macroinvertebrate assemblages at a marine superfund site: Commencement Bay, Washington. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9, S. 669-685.
17. Bellan-Santini, D., 1980. Relationship between populations of amphipods and pollution. *Mar. Pollut. Bull.*, 11, S. 224- 227.
18. Beratergremium für Altstoffe (BUA), 2000. Chemikalienbewertung - Konzepte für Sedimente und marine Ökosysteme - 8. BUA-Kolloquium. Behret, H. & Nagel, GDCh. GDCh-Monographie. No. 17, 157 S.
19. Beratergremium für Altstoffe (BUA), 2000. Risk assessment für den marinen Bereich (Vorschlag des BUA). Behret, H. (Hrsg.), Hirzel Wissenschaftliche Reihe, Nr. 220, 36 S.
20. Bias, R., 1981. Cadmium uptake rates in euryhaline amphipods of the Elbe-Estuary experiments with *Corophium volutator* (Pallas) (Amphipoda, Corophiidae). *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 61(1-2), S. 84-152.

21. Bjoernestad, E., Petersen, G.I., Robson, M., Reiersen, L.O., Henriquez, L., Massie, L. & Blackman, R., 1993. Paris Commission ring test: testing of offshore chemicals and drilling mud on selected marine organisms. *The Science of the Total Environment, Supplement*, S. 713- 719.
22. BLABAK, 2001. Konzept zur Handhabung von Tributylzinn(TBT)-belastetem Baggergut im Küstenbereich. 6 S.
23. Borowsky, B., 1991. Patterns of reproduction of some amphipod crustaceans and insights into the nature of their stimuli. In: Bauer, R.T. & Martin, J.W. (Hrsg.), *Crustacean sexual biology*. New York, Columbia University Press, S. 33- 49.
24. Borowsky, B., Aitken-Ander, P. & Tanacredi, J.T., 1993. The effects of low doses of waste crankcase oil on *Melita nitida* Smith (Crustacea: Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 166 (1), S. 39- 46.
25. Bowmer, C. T., 1994. Paris Commission sediment reworker ring-test, 1993. Delft, The Netherlands, TNO Environmental and Energy Research. TNO-report IMW-R 93/317, 42 S.
26. Brils, J., Stronkhorst, J. & van de Guchte, K., 2000. The status and use of bioassays for the assessment of contaminated sediments in The Netherlands. In: Gandrass, J., Salomons, W. & Förstner, U. (Hrsg.), *Workshop on River Sediments and Related Dredged Material in Europe - Scientific Background from the Viewpoints of Chemistry, Ecotoxicology and Regulations*, 3.- 5. April 2000. GKSS, Geesthacht, Deutschland, Report 1, S. 12- 16.
27. Brils, J.M., Huwer, S.L., Kater, B.J., Schout, P.G., Harmsen, J., Delvigne, G.A.L. & Scholten, M.C.Th., 2002. Oil effect in freshly spiked marine sediment on *Vibrio fischeri*, *Corophium volutator*, and *Echinocardium cordatum*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21 (10), S. 2242- 2251.
28. Brüggemann, R., Oberemm, A. & Steinberg, C., 1997. Ranking of aquatic effect tests using Hasse diagrams. *Environ. Toxicol. Chem.*, 63, S. 125- 139.
29. Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG), 1997. Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Binnenland (HABAB-WSV). Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, Deutschland, 1070.

30. Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG). 1999. Handlungsanweisung für den Umgang mit Baggergut im Küstenbereich (HABAK-WSV). Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, Deutschland, 1100, 25 S.
31. Carr, R.S., Biedenbach, J.M. & Hooten, R.L., 2001. Sediment quality assessment survey and toxicity identification evaluation studies in Lavaca Bay, Texas, a marine superfund site. *Environmental Toxicology*, 16, S. 20- 30.
32. Carr, R. S., Nipper, M., Adams, W. J., Berry, W. J., Burton, G. A., Jr., Ho, K., MacDonald, D., Scroggins, R. & Winger, P. V., 2001. Porewater toxicity testing: Biological, chemical and ecological considerations with a review of methods and applications, and recommendations for future areas of research. In: Carr, R. S. & Nipper, M. (Hrsg.), Summary of a SETAC Technical Workshop, SETAC.
33. Chapman, P.M., Swartz, R.C., Roddie, B., Phelps, H.L., Van-Den-Hurk, P. & Butler, R., 1992. An international comparison of sediment toxicity tests in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91(1-3), S. 253- 264.
34. Chapman, P.M., 1995. Sediment quality assessment: Status and outlook. *J. Aquat. Ecosyst. Health*, 4(3), S. 183- 194.
35. Collier, L.M. & Pinn, E.H., 1998. An assessment of the acute impact of the sea lice treatment ivermectin on a benthic community. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 230(1), S. 131-147.
36. Conradi, M. & Depledge, M.H., 1998. Population responses of the marine amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766) to copper. *Aquatic Toxicology*, 44(1-2), S. 31-45.
37. Cook, S.V., Chu, A. & Goodman, R.H., 2000. Influence of salinity on *Vibrio fischeri* and lux-modified *Pseudomonas fluorescens* toxicity bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(10), S. 2474- 2477.
38. Davies, I.M., Gillibrand, P.A., Mchenery, J.G. & Rae, G.H., 1998. Environmental risk of ivermectin to sediment dwelling organisms. *Aquaculture*, 163(1-2), S. 29- 46.

39. Deans, E.A., Meadows, P.S. & Anderson, J.G., 1982. Physical, chemical and microbiological properties of intertidal sediments, and sediment selection by *Corophium volutator*. Int. Rev. Gesamt. Hydrobiol., 67 (2), S. 261- 269.
40. Depledge, M.H. & Billingham, Z., 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. Mar. Pollut. Bull., 39(1-12), S. 32- 38.
41. DIN EN ISO 10253, 1998. Wachstumshemmtest mit marinen Algen *Skeletonema costatum* und *Phaeodactylum tricornutum*. Berlin, Beuth Verlag GmbH. 15 S.
42. DIN EN ISO 11348-1-3, 1999. Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest). Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN. Berlin, Beuth Verlag.
43. DIN EN ISO 5667-16, 1999. Probenahme - Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren. Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN. Berlin, Beuth Verlag. 45 S.
44. ECETOC, 2001. Risk assessment in marine environments. Brussels, Belgium. ECETOC, Technical Report, 82, 141 S.
45. Environment Canada, 1992. Biological test method: Acute test for sediment toxicity using marine or estuarine amphipods. Environment Canada, Environmental Protection Series, EPS 1/RM/26, 83 S.
46. Environment Canada, 1994. Guidance document on collection and preparation of sediments for physicochemical characterization and biological testing. Environment Canada, Environmental Protection Series, EPS 1/RM/29.
47. Environment Canada, 1995. Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environment Canada, Environmental Protection Series, EPS 1/RM/ 30, 56 S.
48. European Commission (EC), 2002. Technical guidance document on risk assessment (TGD). Entwurf 2002.

49. Fanuko, N., 1981. On the growth of marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* in the batch culture. *Acta Bot. Croat.*, 40, S. 111- 116.
50. Fenchel, T., Kofoed, L.H. & Lappalainen, A., 1975. Particle size-selection of two deposit feeders: the amphipod *Corophium volutator* and the Prosobranch *Hydrobia ulvae*. *Marine Biology*, 30, S. 119- 128.
51. Fent, K., 1998. *Ökotoxikologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 288 S.
52. Ferraro, S.P. & Cole, F.A., 2002. A field validation of two sediment-amphipod toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(7), S. 1423- 1437.
53. Ferretti, J.A., Calesso, D.F., Lazorchak, J.M. & Durhams, C.O., 2002. Evaluation of reduced sediment volume toxicity test procedures using the marine amphipod *Ampelisca abdita*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(11), S. 2372- 2377.
54. Field, L.J., Macdonald, D.D., Norton, S.B., Ingersoll, C.G., Severn, C.G., Smorong, D., & Lindskoog, R., 2002. Predicting amphipod toxicity from sediment chemistry using logistic regression models. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(9), S. 1993- 2005.
55. Fish, J.D. & Mills, A., 1979. The reproductive biology of *Corophium volutator* and *C. arenarium* (Crustacea: Amphipoda). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 59, S. 355- 368.
56. Fish, J.D. & Mills, A., 1980. The setal armature of the antennules, antennae, and uropods of *Corophium volutator* and *C. arenarium* (Amphipoda). *Crustaceana*, 38, S. 271- 278.
57. Fleming, R.J., Holmes, D. & Nixon, S.J., 1998. Toxicity of permethrin to *Chironomus riparius* in artificial and natural sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(7), S. 1332- 1337.
58. Flügge, H., 1977. Zur Taxonomie von *Corophium arenarium* und *C. volutator* (Crust.: Amphipoda: Corophiidae). *Abh. Verh. naturwiss. Ver. Hambur*, 20, S. 113- 122.
59. Flügge, H., 1978. Zur Taxonomie und Biologie des Amphipoden *Corophium arenarium* Crawford, 1937. Dissertation, Universität Hamburg. 175 S.

60. Forbes, M.R., Sherman-Boates, J., Mcneil, N.L. & Brison, A.E., 1996. Mate searching by males of the intertidal amphipod *Corophium volutator* (Pallas). *Can. J. Zool. Rev. Can. Zool.*, 74(8), S. 1479- 1484.
61. Gerdol, V. & Hughes, R.G., 1994. Feeding behaviour and diet of *Corophium volutator* in an estuary in southeastern England. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 114(1-2), S. 103- 108.
62. Gerdol, V. & Hughes, R.G., 1994. Effect of *Corophium volutator* on the abundance of benthic diatoms, bacteria and sediment stability in two estuaries in southeastern England. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 114(1-2), S. 109- 115.
63. Gratzner, H. & Ahlf, W., 2001. Adjustment of a formulated sediment for sediment testing with *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). *Acta hydrochim. hydrobiol.*, 29(1), S. 41- 46.
64. Harkey, G.A., Landrum, P.F. & Klaine, S.J., 1994. Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13(8), S. 1315- 1329.
65. Harris, G.J. & Morgan, E., 1984. Rhythms of locomotion and oxygen consumption in the estuarine amphipod *Corophium volutator* (Crustacea: Amphipoda). *Chronobiol. Int.*, 1(1), S. 21- 25.
66. Hart, T.J., 1930. Preliminary notes on the bionomics of the Amphipod *Corophium volutator* (Pallas). *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*, 16, S. 761- 789.
67. Hartwich, G., 1975. Schlauchwürmer, Nemathelminthes, Rund- oder Fadenwürmer, Nematoda, Parasitische Rundwürmer von Wirbeltieren I. Rhabditida und Ascaridida. In: F.Dahl (Hrsg.), *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeresteile nach ihren Merkmalen und nach ihrer Lebensweise*. Gustav Fischer, Jena, 256 S.
68. Heijerick, D. G., Vangheluwe, M. L., Janssen, C. R. & Dumon, G., 2000. Selection and use of marine toxicity assays to assess the quality of dredged sediments. In: Gandrass, J., Salomons, W. & Förstner, U. (Hrsg.), *Workshop on River Sediments and Related Dredged Material in Europe - Scientific Background from the Viewpoints of Chemistry, Ecotoxicology and Regulations*, 3.- 5. April 2000. GKSS, Geesthacht, Deutschland, Report 1, S. 30- 40.

69. Heise, S., Maaß, V., Gratzner, H. & Ahlf, W., 2000. Ecotoxicological sediment classification: capabilities and potentials - presented for Elbe River sediments. In: Bundesanstalt für Gewässerkunde (BfG) (Hrsg.), Sediment Assessment in European River Basins. Bundesanstalt für Gewässerkunde, Koblenz, Deutschland, S. 96- 104.
70. Helsinki Commission (HELCOM), 1992. Revised guidelines for the disposal of dredged spoils. 12 S.
71. Hill, I. A., Matthiessen, P. & Heimbach, F. 1993. Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. In: Hill, I. A., Matthiessen, P. & Heimbach, F. SETAC-Europe Workshop on sediment toxicity assessments, 8.- 10.11.1993, The Netherlands. 105 S.
72. Hoess, S., Haitzer, M., Traunspurger, W., Gratzner, H., Ahlf, W. & Steinberg, C., 1997. Influence of particle size distribution and content of organic matter on the toxicity of copper in sediment bioassays using *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). Water, Air, and Soil Pollution, 99 (1-4), S. 689- 695.
73. Holmstroem, W.F. & Morgan, E., 1983. Laboratory entrainment of the rhythmic swimming activity of *Corophium volutator* (Pallas) to cycles of temperature and periodic inundation. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 63, S. 861- 870.
74. IADC/ CEDA, 1999. Reuse, recycle or relocate. IADC/ CEDA, Guide 5.
75. ICES (ACME), 2000. Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants. ICES (ACME).
76. Intergovernmental Oceanographic Commission (IOC), United Nations Environment Programme (UNEP), and International Maritime Organisation (IMO), 1999. Global Investigation of Pollution in the Marine Environment (GIPME) - Final report on guidance on assessment of sediment quality. 20 S.
77. ISO DIS 16712, 2002. Water quality- Determination of acute toxicity of marine or estuarine sediments to amphipods. Unveröffentlichter Entwurf des Standards.

78. Janssen, C., 1998. Alternative assays for routine toxicity assessments: a review. In: Schürmann, G. & Markert, B. (Hrsg.), *Ecotoxicology*. John Wiley & Sons, Inc. & Spektrum Akademischer Verlag, New York, S. 813-839.
79. Kater, B., Postma, J.F., Dubbeldam, M. & Prins, J.T.H.J., 2001. Comparison of laboratory and in situ sediment bioassays using *Corophium volutator*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(6), S. 1291- 1295.
80. Kater, B.J., Hannewijk, A., Postma, J.F. & Dubbeldam, M., 2000. Seasonal changes in acute toxicity of cadmium to Amphipod *Corophium volutator*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19(12), S. 3032- 3035.
81. Klein, B., 1991. Erfahrungen mit Leuchtbakterientests. Niedersächsisches Landesamt für Ökologie, Hildesheim, 41 S.
82. Kohl, J.-G. & Nicklisch, A., 1988. *Ökophysiologie der Algen*. Akademie-Verlag, Berlin, 252 S.
83. Koopmann, C., Faller, J., van Bernem, K.-H., Prange, A. & Müller, A., 1994. Schadstoffkartierung in Sedimenten des deutschen Wattenmeeres - Juni 1989- Juni 1992. GKSS Forschungszentrum, Geesthacht, Deutschland, GKSS Bericht, 94/ E/ 6, 156 S.
84. Krebs, F., 1992. Der Leuchtbakterientest für die Wassergesetzgebung. In : Steinhäuser, K. G. & Hansen, P. D. *Biologische Testverfahren*. Gustav Fischer Verlag. Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, S. 591- 624.
85. Krebs, F., 1992. Gewässeruntersuchung mit dem durch Alkali- und Erdalkalionen- Zugabe optimierten DIN-Leuchtbakterientest, dargestellt am Beispiel der Saar. In: Steinhäuser, K. G. & Hansen, P.D. *Biologische Testverfahren*. Gustav Fischer Verlag, Schr.-Reihe Verein WaBoLu, 89, S. 657- 673.
86. Kuhn, A., Munns, W.R., Serbst, J., Edwards, P., Cantwell, M.G., Gleason, T., Pelletier, M.C. & Berry, W., 2002. Evaluating the ecological significance of laboratory response data to predict population- level effects for the estuarine amphipod *Ampelisca abdita*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(4), S. 865- 874.

87. Kuhn, A., Munns, W.R., Serbst, J., Edwards, P., Cantwell, M.G., Gleason, T., Pelletier, M.C. & Berry, W., 2002. Evaluating the ecological significance of laboratory response data to predict population-level effects for the estuarine amphipod *Ampelisca abdita*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(4), S. 865- 874.
88. Lauckner, G., 1990. Parasiten - ihr Einfluß im Ökosystem Wattenmeer. In: Lozan, J.L., Lenz, L., Rachor, E., Watermann, B. & von Westernhagen, H. (Hrsg.), *Warnsignale aus der Nordsee*. Verlag Paul Parey, Berlin- Hamburg, Deutschland, S. 219-230.
89. Lincoln, R.J., 1979. British marin amphipoda: Gammaridea. *British Museum for Natural History, London*, S. 324- 325.
90. Liss, W. & Ahlf, W., 1997. Evidence from whole-sediment, porewater, and elutriate testing in toxicity assessment of contaminated sediments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 36 (2), S. 140- 147.
91. London Convention (LC) (Scientific Group), 2000. Waste Assessment Guidance: Development of waste-specific guidance - draft specific guidance of assessment of dredged material - dredged material assessment framework. *London Convention*, 28 S.
92. Lotufo, G. R., Bridges, T. S. & Steevens, J., 2000. Effects based testing in the United States dredging program. In: Gandrass, J., Salomons, W. & Förstner, U. (Hrsg.), *Workshop on River Sediments and Related Dredged Material in Europe - Scientific Background from the Viewpoints of Chemistry, Ecotoxicology and Regulations*, 3.- 5. April 2000. GKSS, Geesthacht, Deutschland, Report 1, S. 20- 25.
93. Matthiessen, P., 2000. BEQUALM newsletter - Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programmes (BEQUALM).
94. Mayer, P., Cuhel, R. & Nyholm, N., 1997. A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition test. *Wat. Res.*, 31(10), S. 2525- 2531.
95. Mayer, P., Frickmann, J., Christensen, E.R. & Nyholm, N., 1998. Influence of growth conditions on the results obtained in algal toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17(6), S. 1091-1098.

96. McGee, B.L., Schlegel, C.E. & Reinharz, E., 1993. Assessing sublethal levels of sediment contamination using the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, S. 577- 587.
97. McLusky, D.S., 1967. Some effects of salinity on the survival, moulting, and growth of *Corophium volutator*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 47, S. 607-617.
98. McLusky, D.S., 1970. Salinity preference in *Corophium volutator*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 50, S. 747- 752.
99. Meador, J.P., 1993. The effect of laboratory holding on the toxicity response of marine infaunal amphipods to cadmium and tributyltin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 174(2), S. 227- 242.
100. Meadows, P.S., 1964. Substrate selection by *Corophium* species: The particle size of substrates. *J. Anim. Ecol.*, 33, S. 387- 394.
101. Meadows, P.S. & Ruagh, A.A., 1981. Temperature Preferences and Activity of *Corophium volutator* (Pallas) in a New Choice Apparatus, *Sarsia*, 66(1), S. 67-72.
102. Meissner, K. & Bick, A., 1997. Population dynamics and ecoparasitological surveys of *Corophium volutator* in coastal waters in the Bay of Mecklenburg (southern Baltic Sea). *Dis. Aquat. Org.*, 29(3), S. 169-179.
103. Meyer, U., 2000. Zur Xenobiotika-Resistenz ausgewählter freilebender Nematoden und ihrer Eignung als Biotest-Organismen. Diplomarbeit, Universität Hamburg, FB 14. 72 S.
104. Mills, A. & Fish, J.D., 1980. Effects of salinity and temperature on *Corophium volutator* and *C. arenarium* (Crustacea: Amphipoda), with particular reference to distribution. *Mar. Biol.*, 58(2), S. 153- 161.
105. Moreira Dos Santos, M., Moreno-Garrido, I., Goncalves, F., Soares, A.M.V.M. & Ribeiro, R., 2002. An in situ bioassay for estuarine environments using the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21(3), S. 567- 574.

106. Möller, P. & Rosenberg, R., 1982. Production and abundance of the amphipod *Corophium volutator* on the west coast of Sweden. *Neth. J. Sea Res.*, 16, S. 127- 140.
107. Mudroch, A. & Azcue, J. M., 1995. Manual of aquatic sediment sampling. Lewis Publishers, Boca Raton, Fl. USA, 224 S.
108. Murdoch, M.H., Baerlocher, F. & Laltoo, M.L., 1986. Population dynamics and nutrition of *Corophium volutator* (Pallas) in the Cumberland Basin (Bay of Fundy). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 103(1-3), S. 235- 249.
109. Nelson, M.K., Landrum, P.F., Burton, G.A., Jr., Klaine, S.J., Crecelius, E.A., Byl, T.D., Gossiaux, D.C., Tsymbal, V.N., Cleveland, L., Ingersoll, C.G. & Sasson-Brickson, G., 1993. Toxicity of contaminated sediments in dilution series with control sediments. *Chemosphere*, 27(9), S. 1789-1812.
110. Herbst, T. & Nendza, M., 2000. Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments. Umweltbundesamt, Berlin, Deutschland, *UBA Texte 28/2000*, 63 S.
111. O' Connor, T.P. & Paul, J.F., 2000. Misfit between sediment toxicity and chemistry. *Mar. Pollut. Bull.*, 40, S. 59- 64.
112. OSPARCOM, 1995. PARCOM protocols on methods for the testing of chemicals used in the offshore industry. OSPARCOM, 35 S.
113. OSPARCOM, 1998. OSPAR guidelines for the management of dredged material. Nr. 1998- 20, 32 S.
114. OSPARCOM, 1997. JAMP Guidelines for General Biological Effects Monitoring.
115. Pascoe, D., Brown, A.F., Evans, B.M.J. & Mckavanagh, C., 1990. Effects and fate of cadmium during toxicity tests with *Chironomus riparius* - the influence of food and artificial sediment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19(6), S. 872- 877.
116. Pastorok, R. A. & Becker, D. S., 1990. Comparative sensitivity of sediment toxicity bioassays at three superfund sites. In: Landis, W. G. & van der Schalie, W. H. *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, ASTM, Philadelphia, 13, S. 123- 139.

117. Pedersen, F., Bjoernestad, E., Andersen, H.V., Kjolholt, J. & Poll, C., 1998. Characterization of sediments from Copenhagen Harbour by use of biotests. *Contaminated Sediments*, 37(6-7), S. 233 - 240.
118. Peer, D.L., Linkletter, L.E. & Hicklin, P.W., 1986. Life history and reproductive biology of *Corophium volutator* (Crustacea: Amphipoda) and the influence of shorebird predation on population structure in Chignecto Bay, Bay of Fundy, Canada. *Neth. J. Sea Res.*, 20(4), S. 359- 373.
119. Peters, C., 1999. Die Belastbarkeit von Ökotoxizitätstests aus naturwissenschaftlicher und umweltrechtlicher Sicht - aufgezeigt an Beispielen des Gewässerschutzes. Diplomarbeit, Universität Hamburg, FB 14, 163 S.
120. Peters, C., 2000. The upcoming European Water Framework Directive - general purpose and implications, consideration of sediment-quality and subsequent questions. In: Salomons, W. & Turner, K. (Hrsg.), *River sediments and related dredged material in Europe*. GKSS, Geesthacht, Deutschland, Report 2, S. 40- 42.
121. Peters, C., 2001. International regulations concerning dredged material management. In: Gandrass, J. & Salomons, W. (Hrsg.), *Dredged material in the port of Rotterdam - Interface between Rhine Catchment Area and North Sea*. GKSS, Geesthacht, Deutschland, Report, S. 214-229.
122. Peters, C., 2001. The national policy framework in Germany - dredged material management. In: Gandrass, J. & Salomons, W. (Hrsg.), *Dredged material in the port of Rotterdam - Interface between Rhine Catchment Area and North Sea*. GKSS, Geesthacht, Deutschland, Report, S. 171- 181.
123. PIANC, 1997. Dredged material management guide. Special Report of the Permanent Environmental Commission. Vellinga, T. (Hrsg.), Brüssel, Belgien.
124. PIANC, 1998. Management of aquatic disposal of dredged material. Report of Working Group I of the Permanent Environmental Commission. Brüssel, Belgien.

125. Power, E.A. & Chapman, P.M., 1992. Assessing sediment quality. In: Burton, G.A. Jr. (Hrsg.), *Sediment toxicity assessment*. Lewis Publishers, Chelsea, S. 1-18.
126. Roddie, B. D. & Thain, J. E., 2001. Biological effects of sediment-bound contaminants: *Corophium* spp. sediment bioassays and toxicity test. International Council for the Exploration of the Sea (ICES). *Techniques in marine environmental sciences (TIMES)*, 30, 26 S.
127. Schellenberg, A., 1942. Krebstiere oder Crustacea, IV Flohkrebse oder Amphipoda. In: Dahl, M. & Bischoff, H. (Hrsg.), *Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzenden Meeressteile*. Gustav Fischer Verlag, Jena.
128. Schipper, C. A., Burgess, R. M., & van den Dikkenberg, L. C., 1999. The 10 d marine Amphipod *Corophium volutator* mortality sediment toxicity test. RIKZ. Report No. Specie-01, 16 S.
129. Segerstrale, S.G., 1940. Zur Biologie des Amphipoden *Corophium volutator*, nebst Angaben über die Entwicklung und Rückbildung der Oostegitenborsten bei dieser Art. *Studien über die Bodentierwelt in südfinnländischen Küstengewässern VI.*, 40 S.
130. Segerstrale, S.G., 1959. Synopsis of data on the Crustaceans *Gammarus locusta*, *Gammarus oceanicus*, *Pontoporeia affinis*, and *Corophium volutator* (Amphipoda Gammaridea). 23 S.
131. Segerstrale, S.G., 1970. Light control of the reproductive cycle of *Pontoporeia affinis* Lindstroem (Crustacea Amphipoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 5(3), S. 272- 275.
132. Sims, I., Holmes, D., Fleming, R. & Dewitt, T., 2000. The comparative sensitivity of two invertebrates used for assessing sediment toxicity, *Poster Präsentation SETAC Brighton*.
133. Slooff, W., Van Oers, J.A.M. & Zwart, D.D., 1986. Margins of uncertainty in ecotoxicological hazard assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 5, S. 841- 852.

134. Smith, D., Hughes, R.G. & Cox, E.J., 1996. Predation of epipelagic diatoms by the amphipod *Corophium volutator* and the polychaete *Nereis diversicolors* in the Embley River, Australia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 145(1-3), S. 53- 61.
135. Spies, R.B., 1989. Sediment bioassays, chemical contaminants and benthic ecology: New insights or just muddy water? *Mar. Environ. Res.*, 27, S. 73- 75.
136. Steele, V.J. & Steele, D.H., 1986. The influence of photoperiod on the timing of reproductive cycles in *Gammarus* species (Crustacea, Amphipoda). *Am. Zool.*, 26, S. 459- 467.
137. Stronkhorst, J., 1998. Dredged material, more or less harmful: Quality assessment with bioassays. In: IMO. *Waste assessment guidance: Underlying principles for describing national action levels and application of biological techniques*. 9 S.
138. Stronkhorst, J., Schipper, C. A., Honkoop, J. & van Essen, K., 2001. Disposal of dredged material in Dutch coastal waters - a new effect-orientated assessment framework. National Institute for Coastal and Marine Management (RIKZ). 78 S.
139. Suedel, B.C. & Rodgers, J.H. Jr., 1994. Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13(7), S. 1163- 1175.
140. Sverdrup, L.E., Furst, C.S., Weideborg, M., Vik, E.A. & Stenersen, J., 2002. Relative sensitivity of one freshwater and two marine acute toxicity tests as determined by testing 30 offshore E & P chemicals. *Chemosphere*, 46(2), S. 311- 318.
141. Swartz, R.C., Deben, W.A., Sercu, K.A. & Lamberson, O., 1982. Sediment toxicity and the distribution of amphipods in Commencement Bay, Washington, USA. *Mar. Pollut. Bull.*, 13(10), S. 359- 364.
142. Traunsperger, W., & Drews, C., 1996. Toxicity analysis of freshwater and marine sediments with meio- and macrobenthic organisms: A review. *Hydrobiologia*, 328(3), S. 215- 261.

143. Van-Den-Hurk, P., Chapman, P.M., Roddie, B. & Swartz, R.C., 1992. A comparison of North American and West European infaunal amphipod species in a toxicity test on North Sea sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91(1- 3), S. 237- 243.
144. van Bernem, K.H., 1998. Verbreitung von Makrofauna-Arten im Wattenmeer. In: Landesamt für den Nationalpark Schleswig-Holsteinisches Wattenmeer (Hrsg.), *Umweltatlas Wattenmeer*. Ulmer Verlag, Deutschland, S. 94- 95.
145. Villaescusa, I., Marti, S., Matas, C., Martinez, M. & Ribo, J.M., 1997. Chromium (VI) toxicity to luminescent bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(5), S. 871- 874.
146. Walsh, G.E., Weber, D.E., Brashers, L.K. & Simon, T.L., 1990. Artificial sediments for use in tests with wetland plants. *Ecol. Res. Ser. U.S. Environ. Prot. Agency*, 30(3), S. 391- 396.
147. Walsh, G.E., Weber, D.E., Esry, L.K., Nguyen, M.T., Noles, J. & Albrecht, B., 1992. Synthetic substrata for propagation and testing of soil and sediment organisms. *Pedobiologia*, 36, S. 1- 10.
148. Watkin, E.E., 1941. The yearly life cycle of the amphipod *Corophium volutator*. *J. Anim. Ecol.*, 10, S. 77- 93.
149. Weber, D.E., Mckenney, C.L., Jr., Macgregor, M.A. & Celestial, D.M., 1996. Use of artificial sediments in a comparative toxicity study with larvae and postlarvae of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Environ. Pollut.*, 93(2), S. 129- 133.
150. Weideborg, M., Vik, E.A., Ofjord, G.D. & Kjonno, O., 1997. Comparison of three marine screening tests and four Oslo and Paris Commission procedures to evaluate toxicity of offshore chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16(2), S. 384- 389.
151. Williams, J.A., 1985. The role of photoperiod in the initiation of breeding and brood development in the amphipod *Talitrus saltator* Montagu. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 86, S. 59- 72.
152. Williams, L.G., Chapman, P.M. & Ginn, T.C., 1986. A comparative evaluation of marine sediment toxicity using bacterial luminescence,

- Oyster embryo and Amphipod sediment bioassays. *Mar. Environ. Res.*, 19, S. 225- 249.
153. Wilson, W.H., Jr. & Parker, K., 1996. The life history of the amphipod, *Corophium volutator*. The effects of temperature and shorebird predation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 196(1-2), S. 239- 250.
 154. Wong, Y. S., Tam, N. F. Y., Lau, P. S. & Xue, X. Z., 1995. The toxicity of marine sediments in Victoria Harbour, Hong Kong. In: Wu, R.S.S., Atlas, R.M., Goldberg, E.D., Sheppard, C., Chapman, P.M., Connell, D.W., McIntyre, A.D. & Rainbow, P.S. (Hrsg), *International conference on marine pollution and ecotoxicology held in Hong Kong, 22- 26 January 1995*. S. 464- 470.
 155. Zimmer, M. & Ahlf, W., 1994. Erarbeitung von Kriterien zur Ableitung von Qualitätszielen für Sediment und Schwebstoffe - Literaturstudie. Umweltbundesamt. *UBA Texte*, 69/94, 309 S.

ANHANG, MATERIALIEN

A.

Ergänzung zu: Validierung des Meer-/ Brackwasser-Leuchtbakterientests: Ringtest mit 3,5-Dichlorpenol

- I. Ringtestteilnehmerliste
- II. Zusammensetzung des Lösungsmittels, Kontroll- und Verdünnungswassers der Tests 1 – 4
- III. Grafische Darstellung der EC50-Werte der Ringtestteilnehmer

B.

Ergänzende Richtlinien für die Probenahme von Brackwasser- und Meerwasser-Sedimenten, für die Probenvorbereitung sowie für die Durchführung und Auswertung der marinen Testverfahren

- I. Probenahme
- II. Probenvorbereitung
 1. Für den Gesamtsedimenttest - akuter Amphipodent
 2. Richtlinie zur Eluatherstellung aus Brack- / Meerwasser-Sedimentproben für den Brack-/ Meerwasser Leuchtbakterien- und Algentest
- III. Meer-/ Brackwasser Modifikation des Leuchtbakterientests
- IV. Erweiterung des marinen Algentests mit *Phaeodactylum tricornutum* auf Meer-/ Brackwasser-Eluate
- V. Ergänzende Richtlinie zum akuten Amphipodentest

A. ERGÄNZUNG ZU: VALIDIERUNG DES MEER-/BRACKWASSER-LEUCHTBAKTERIENTESTS: RINGTEST MIT 3,5-DICHLORPENOL

I. Liste der Ringtestteilnehmer

TeilnehmerIn	Postanschrift	LA	MN	FG
Fr. S. Becker, Fr.H.Führman, Hr. Dr.U. Noack	Dr. U. Noack – Laboratorium für Angewandte Biologie Käthe – Paulus – Straße 1 D – 31157 Sarstedt	+		
Fr. C. Peters	TUHH AB Umweltschutztechnik Eißendorfer Straße 40 D – 21073 Hamburg	+		
Fr. N. Reineke	Universität Hamburg Institut für Organische Chemie Martin-Luther-King-Platz 6 20146 Hamburg	+		
Fr. Dr. G. Severin	GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH Institut für Ökologische Chemie Ingolstädter Landstraße 1 D-85764 Neuherberg	+		
Fr. Dr. Kussatz, Fr. Dr. M. Pattard, Fr. I. Schmiedling	Umweltbundesamt, Fachgebiet IV 2.6 Versuchsfeld Marienfelde Schichauweg 58 D-12307 Berlin	+		
Fr. S. Becker	Fa. Umwelttechnik Dr. Bartetzko GmbH Ostendstr. 25 D- 12459 Berlin	+		
Hr Prof. M. Sellner, Fr. Schmidt	Hochschule Wismar, Labor Malchow Inselstrasse 10 –12 D-23999 Malchow	+		
Hr. Prof. H. Platen	Fachhochschule Gießen-Friedberg Fachbereich KMUB Wiesenstraße 14 D-35390 Gießen	+		
Hr. Dr. M. Becker	IFB Halle GmbH Schiepziger Str. 59 06120 Halle/S.	+		

Fortsetzung der Liste der Ringtestteilnehmer

TeilnehmerIn	Postanschrift	LA	MN	FG
Fr. U. Langheinrich	Hochschule Magdeburg – Stendal Fachbereich Wasserwirtschaft Breitscheidstrasse 2 39114 Magdeburg	+		
Hr Dr. R. Uhlemann	Bioservice Waldenburg GmbH H. – Heine-Str.6 08396 Waldenburg	+		
Fr. Dr. I. Stephan	Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM) Unter den Eichen 87 D-12205 Berlin	+		
Hr. Holweg	FH Nordostniedersachsen, FBB (WU), Herbert Meyer-Str.7 29556 Suderburg	+		
Hr. Dr. R. Ostrowski	Wasserlaboratorien Roetgen GmbH Krefelder Strasse 299 52070 Aachen	+	+	
Hr. Dr. F. Krebs, Fr. Wunsch	Bundesanstalt für Gewässerkunde Kaiserin Augusta – Anlagen 15 – 17 D – 56068 Koblenz	+	+	
Hr R. Geschwendtner	Umweltanalytisches Labor des Instituts für SiedlungswasserwirtschaftRWTH Aachen Krefelder Strasse 299 52070 Aachen	+	+	
Hr. Dr. M. Diedrich, Hr. Prof. H. Bercher	IUT -Institut f. Umwelttoxikologie GmbH Pappelallee 1, Haus 6a D - 17489 Greifswald		+	
Hr. W. Bülow	Niedersächsisches Landesamt für Ökologie An der Scharlake 39 D - 31135 Hildesheim		+	
Fr. S. Pfitzner	Bundesanstalt für Gewässerkunde Schneller Str. 140 D-12439 Berlin		+	

Fortsetzung der Liste der Ringtestteilnehmer

TeilnehmerIn	Postanschrift	LA	MN	FG
Hr. Prof. P.D. Hansen Hr. Dr. Unruh Fr. Fischer	Technische Universität Berlin, Inst. für Ökologie, FG Ökotoxikologie, Keplerstrasse 4-6 D-10589 Berlin		+	
Hr. Dr. G. Kalnowski	TU Berlin Inst. für Technischen Umweltschutz AG Umwelthygiene Amrumerstr. 32 13353 Berlin		+	
Fr. N. Viebranz	Umweltschutz Nord GmbH&Co Industriepark 6 27777 Ganderkesee		+	
Hr. Dr. E. Küster	Sektion Chemische Ökotoxikologie UFZ- Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH Permoserstr. 15 04318 Leipzig		+	
Hr. Dr. H.-J. Pluta, Fr. Dr. U. Vogel	Umweltbundesamt, Fachgebiet III 3.6 Versuchsfeld Marienfelde Schichauweg 58 D - 12307 Berlin			+

II. Zusammensetzung des künstlichen Meer- und Brackwassers

	Standardmedium	Modifizierte Medien		
	DIN EN ISO 11348-2 /-3	Marines Medium	Brackwasser Medien	
		ASW	ABW	Klein ASW
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
Salze [g/L]				
NaCl	20,0	22,0	14,19	14,61
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	-	9,7	6,26	10,165
Na ₂ SO ₄ (wasserfrei)	-	3,7	2,39	-
CaCl ₂ (wasserfrei)	-	1,0	0,65	1,110
KCl	-	0,65	0,42	0,746
NaHCO ₃	-	0,20	0,13	-
H ₃ BO ₃	-	0,023	0,015	-
Salinität	20	31	20	20
Leitfähigkeit [mS/cm]	31	47	31	31
pH-Wert:	6,0 - 8,5	6,0 - 8,5	6,0 - 8,5	6,0 - 8,5

III. Grafische Darstellung der EC_{50} -Werte der Ringtestteilnehmer

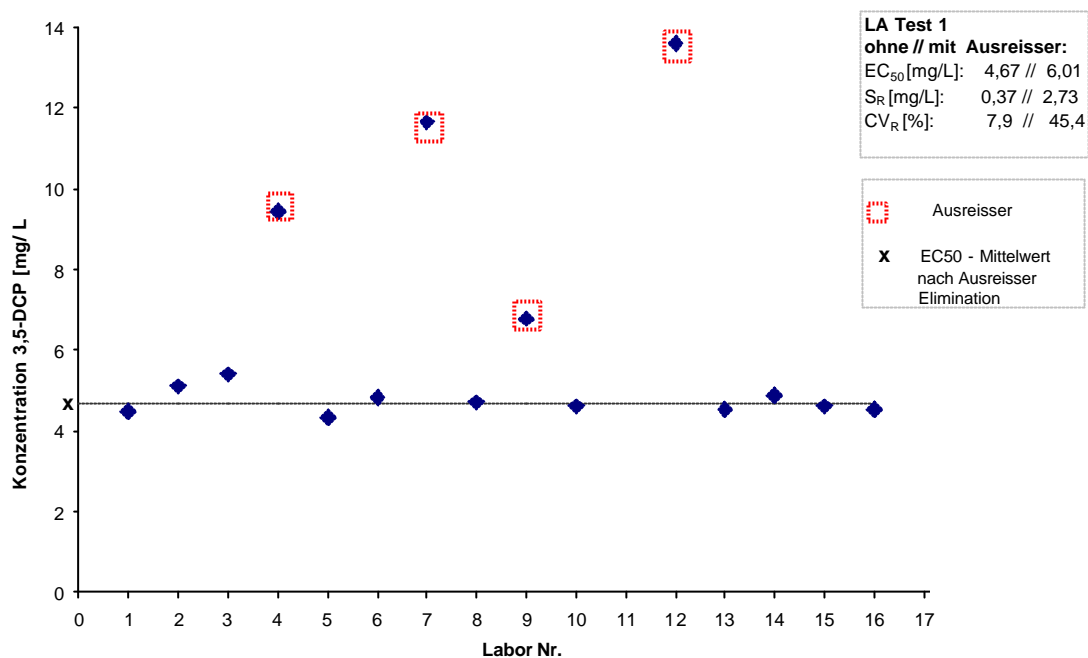


Abbildung 1: EC_{50} -Werte des Verfahrens mit flüssig getrockneten LB (LA), Test 1

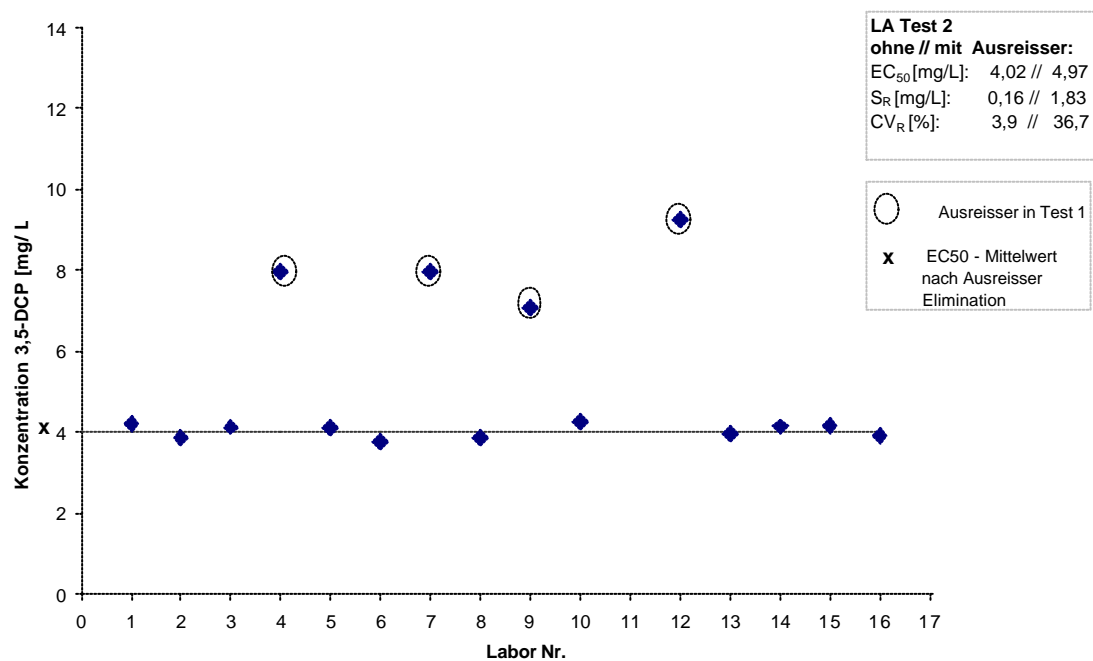
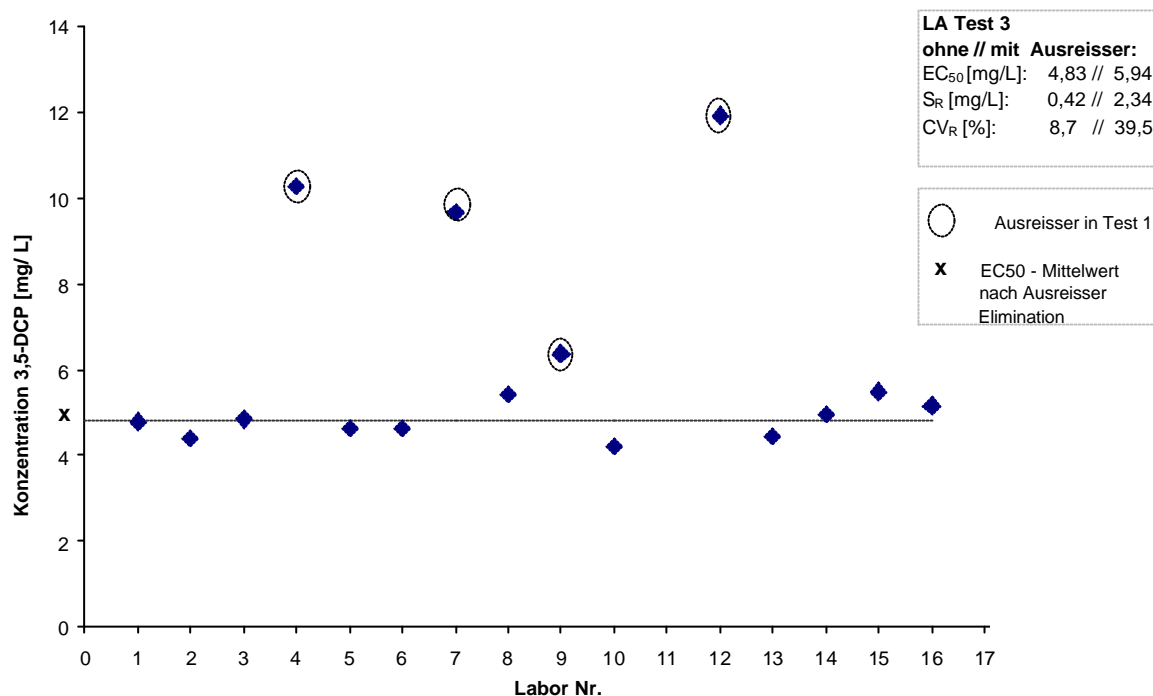
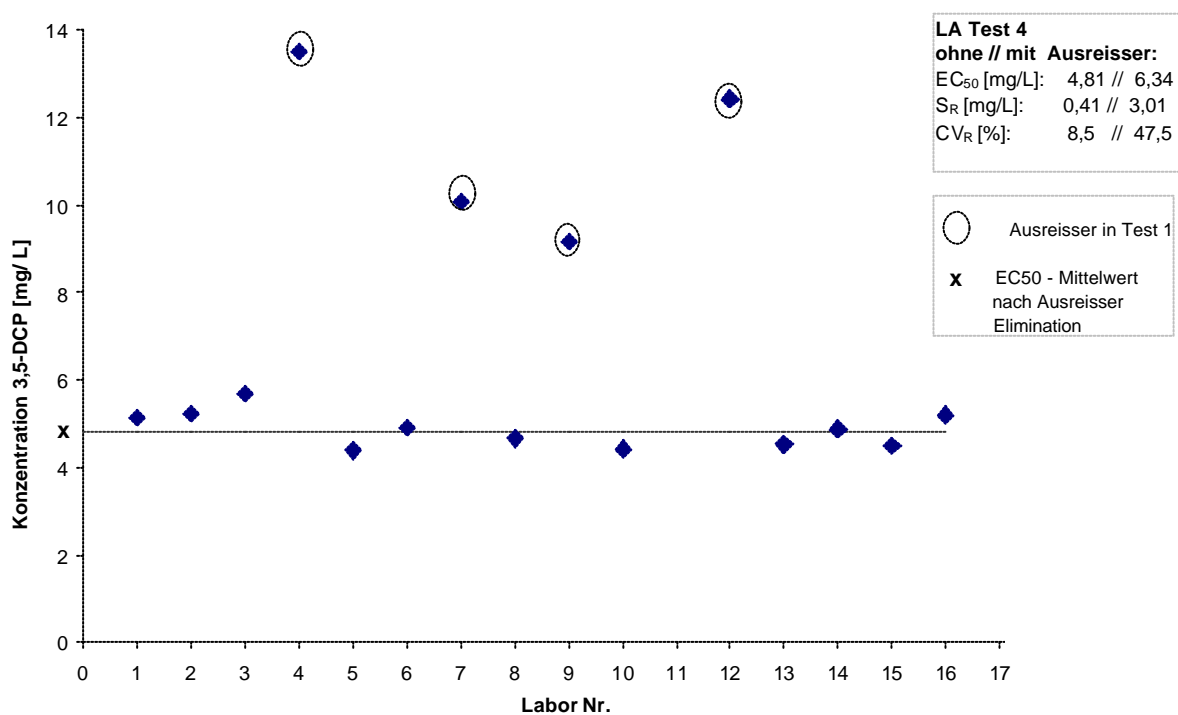
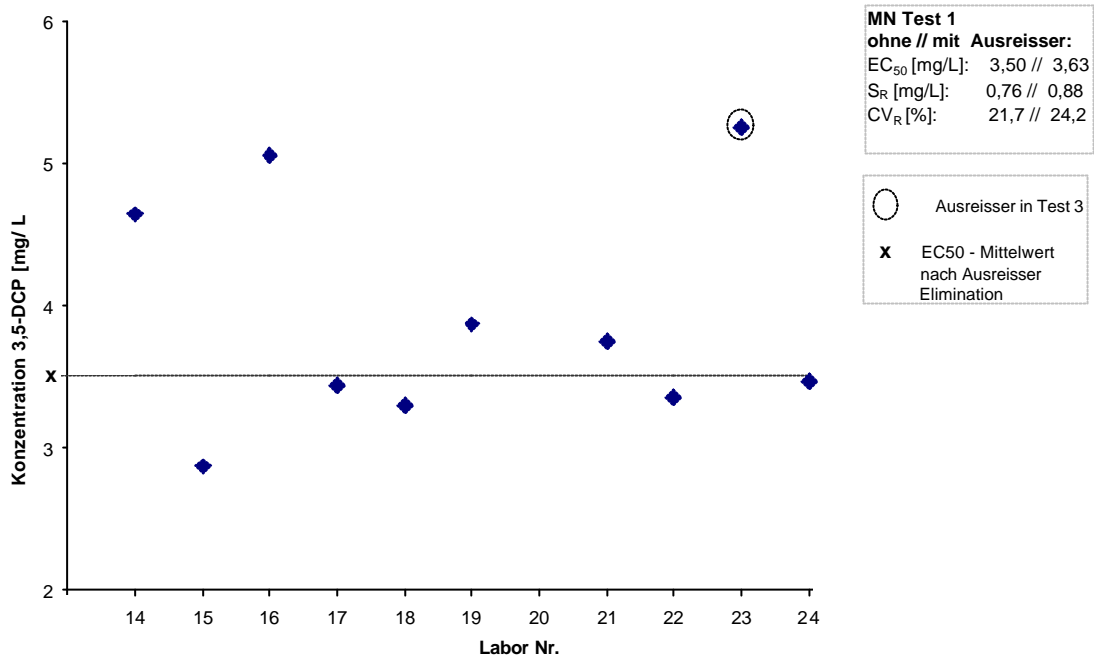
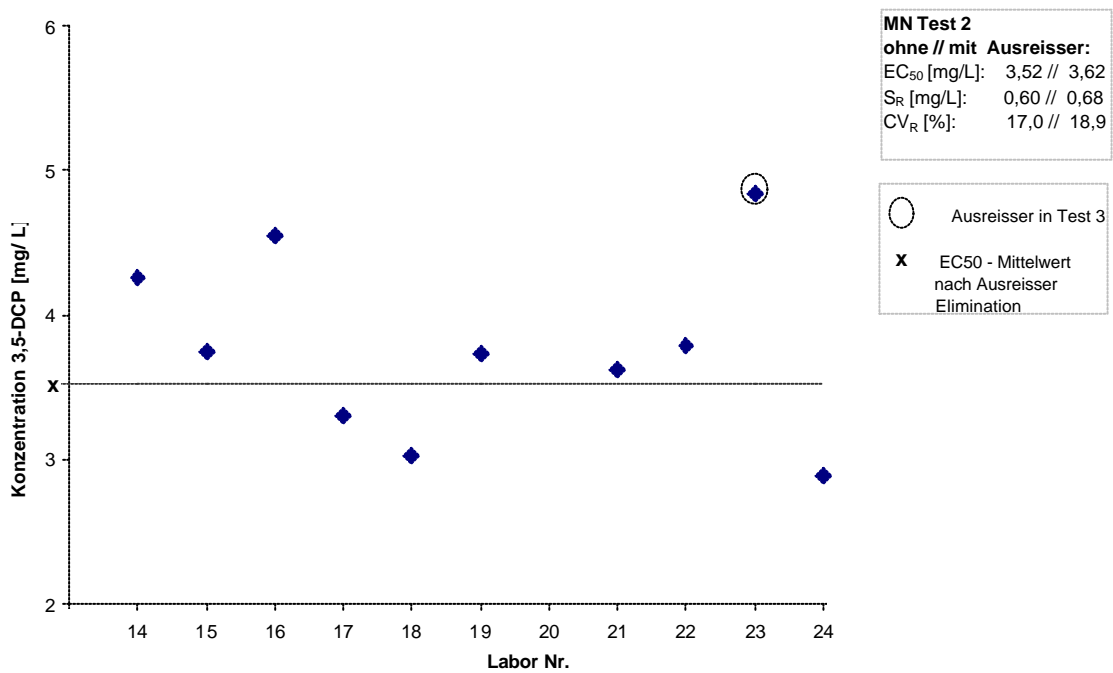
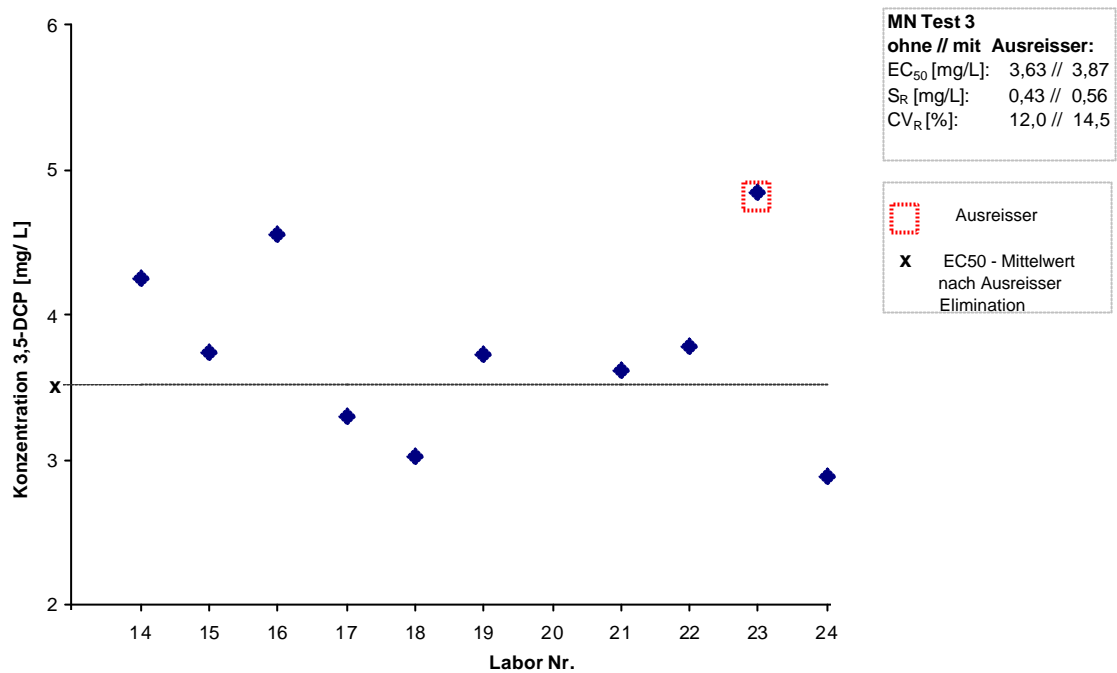
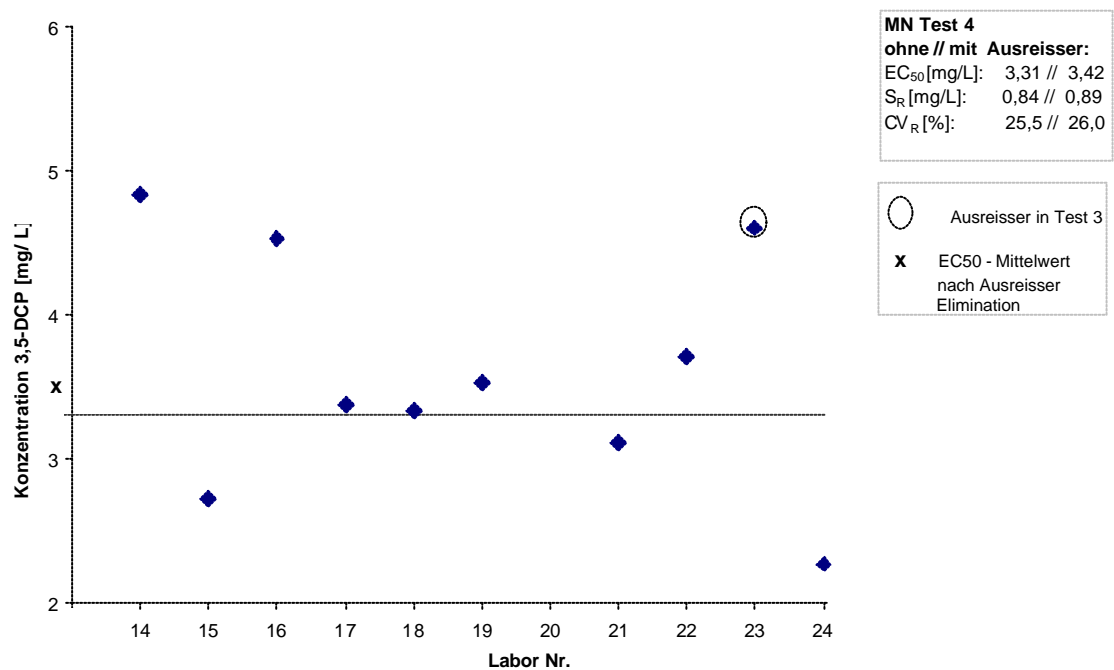


Abbildung 2: EC_{50} -Werte des Verfahrens mit flüssig getrockneten LB (LA), Test 2

Abbildung 3: EC_{50} -Werte des Verfahrens mit flüssig getrockneten LB (LA), Test 3Abbildung 4: EC_{50} -Werte des Verfahrens mit flüssig getrockneten LB (LA), Test 4

Abbildung 5: EC_{50} -Werte, Verfahrens mit gefriergetrockneten LB (MN), Test 1Abbildung 6: EC_{50} -Werte des Verfahrens mit gefriergetrockneten LB (MN), Test 2

Abbildung 7: EC_{50} -Werte des Verfahrens mit gefriergetrockneten LB (MN), Test 3Abbildung 8: EC_{50} -Werte des Verfahrens mit gefriergetrockneten LB (MN), Test 4

B. ERGÄNZENDE RICHTLINIEN FÜR DIE PROBENAHME VON BRACKWASSER- UND MEERWASSER-SEDIMENTEN, FÜR DIE PROBENVORBEREITUNG SOWIE FÜR DIE DURCHFÜHRUNG UND AUSWERTUNG DER MARINEN TESTVERFAHREN

Die folgenden Richtlinien sollten als Ergänzung zu den ISO EN DIN Standards angewendet werden. Sie wurden in Zusammenarbeit mit dem DIN AK 5.3 Marine Biotests erarbeitet.

Die Empfehlungen zur Probenahme und Probenvorbereitung sind für die Anwendung auf das minimale Biotest-Set ausgerichtet.

I. Probenahme

Bisher gibt es keinen ISO EN DIN Standard speziell für die Probenahme von Meer- und Brackwasser-Sedimenten für die Durchführung von marinen Biotests. Es können jedoch bestehende Standards mit einigen Ergänzungen angewendet werden. Grundsätzlich sollten bei der Probenahme von Meer-/Brackwasser-Sedimenten für die Durchführung mariner biologischer Testverfahren folgende Aspekte berücksichtigt werden:

- Probenahmestrategie,
- das Probenahmegerät,
- Probengefäße,
- Probentransport,
- Lagerung (Art und Dauer)

In Tabelle 1 sind die Standards und ergänzenden Empfehlungen aufgeführt, an denen sich für den jeweiligen Aspekt orientiert werden sollte.

Tabelle 1: Probenahme von Meer-/ Brackwasser-Sedimenten

Aspekt	Basis Standard	ergänzende Empfehlung
Probenahmestrategie	ISO DIS 5667-19 (2002) Probenahmeverfahren: Anleitung zur Probenahme von Sedimenten in der marinen Umwelt	HABAK-WSV (BfG 1999) sollte ebenfalls berücksichtigt werden.
Probenahmegerät	ISO DIS 5667-19 (2002) Probenahmeverfahren: Anleitung zur Probenahme von Sedimenten in der marinen Umwelt	Es sollte bevorzugt ein Kastengreifer oder Stechlote eingesetzt werden. Falls bei der Probenahme Oberflächenwasser das Sediment überschichtet, sollte dieses unmittelbar nach der Probenahme vorsichtig dekantiert werden. Späteres Dekantieren sollte vermieden werden, da es sich um Interstitialwasser handeln kann.
Probengefäße	DIN EN ISO 5667-16 (1998) Probenahme: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren	
Probentransport	DIN EN ISO 5667-16 (1998) Probenahme: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren	Proben bei 4°C gekühlt transportieren.
Lagerung	DIN EN ISO 5667-16 (1998) Probenahme: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren	Proben sollten bei 4°C gekühlt und dunkel gelagert werden. Tiefkühlung verändert die Sedimenttextur und kann einen Einfluss auf die Toxizität haben. Die Tests sollten binnen 4 Wochen nach der Probenahme durchgeführt werden.

II. Probenvorbereitung

1. Für den Gesamtsedimenttest - akuter Amphipodentest

Die Testvorschrift des akuten Amphipodentests (ISO DIS 16712 (2002)) umfasst auch die Probenvorbereitung.

2. Richtlinie zur Eluatherstellung aus Brack- / Meerwasser-Sedimentproben für den Brack-/ Meerwasser Leuchtbakterien- und Algentest

Prinzip

Elution von Sedimenten mit künstlichem Brack-/ Meerwasser im Schüttelversuch und Trennung von Feststoff und Überstand durch Zentrifugation und Filtration.

Faustregel zur Abschätzung der Probemenge:

Als Richtwert zur Abschätzung der einzusetzenden Menge gilt, dass ca. die Hälfte des Sediment-Wasser-Gemisches nach dieser Anleitung als Eluat gewonnen werden kann.

Anmerkungen zur Probenahme

Überstehendes Wasser, welches durch die Art der Probenahme verursacht wurde, ist direkt nach der Probenahme zu dekantieren.

Temperatur, Salinität und pH-Wert des Interstitialwassers sind am Probenahmestandort bzw. im Labor zu messen und zu protokollieren.

Geräte

- Überkopfschüttler
- Zentrifuge
- Elutionsgefäße

Die Elutionsgefäße sollen aus inertem Material bestehen (Glas, PTFE, PE). Die Grösse des Gefäßes ist so zu bemessen, dass nach Einfüllen des Sediment-Wassergemisches noch ein Luftraum von mindestens 40 % des Gefäßvolumens verbleibt, um Sauerstoffmangel während der Elution zu vermeiden.

Bsp. Es sollen 100 ml Eluat gewonnen werden. Dann nimmt das Sediment-Wasser Gemisch ein Volumen von 200 ml ein, d.h. es sollte ein Gefäß von mind. 300 ml Größe gewählt werden.

➤ Filtereinrichtung und Filter

Empfehlung:

Glasfaservorfilter: Schleicher & Schüll GF 92, Ø 50 mm, Ref. No. 421030

Glasfaserfilter : Macherey & Nagel, MN GF – 5, Ø 50 mm, 0,45 µm

Reagenzien

➤ Elutionsmittel

In Abhängigkeit von der Salinität des Porenwassers wird künstliches Brackwasser (ABW) oder künstliches Meerwasser (ASW) als Elutionsmittel eingesetzt (siehe Tabelle 2):

- Salinität der Probe: $5 = x = 20 \Rightarrow$ ABW als Elutionsmittel
- Salinität der Probe: $20 < x = 35 \Rightarrow$ ASW als Elutionsmittel

Tabelle 2: Künstliches Meerwasser (ASW) (nach DIN EN ISO 10253) und künstliches Brackwasser (ABW)

	Artificial Sea Water (ASW)	Artificial Brackish Water (ABW)
Salz	[g/L]	[g/L]
NaCl	22,0	14,19
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	9,7	6,26
Na ₂ SO ₄ (wasserfrei)	3,7	2,39
CaCl ₂ (wasserfrei)	1,0	0,65
KCl	0,65	0,42
NaHCO ₃	0,20	0,13
H ₃ BO ₃	0,023	0,015
Salinität (Refraktometer) (20°C)	31 ± 1	20 ± 1
Leitfähigkeit [µS/cm] (20°C)	47.000 ± 1.000	31.000 ± 1.000
pH-Wert:	7,5 ± 0, 2	7,5 ± 0,2

Alle Chemikalien müssen von analytischer Reinheit sein.

Das Wasser für die Herstellung des synthetischen Meerwassers muss deionisiert oder von vergleichbarer Reinheit sein.

Durchführung der Elution

Wässrigen Überstand und abgesetztes Sediment homogenisieren.

Die naturfeuchten Sedimente mit Edelstahl oder Kunststoffsieben auf < 10 mm absieben, den Anteil des Siebrückstands bestimmen und protokollieren.

Das Trockengewicht des gesiebten Sediments wird nach DIN 38 414-2 (1985) bestimmt.

Die Sedimentproben werden im Verhältnis Sediment: Wasser von 1: 4 eluiert, d.h., 1 Teil Sediment (bezogen auf das Trockengewicht) und 3 Teile künstliches Brack-/ Meerwasser (ABW oder ASW).

Dazu wird das gesiebte und naturfeuchte Sediment entsprechend X g Trockengewicht in Gefäße eingewogen und mit ABW oder ASW auf 4 mal X g aufgefüllt (bezogen auf das Trockengewicht des Sedimentes; der Wassergehalt des Sedimentes wird als Anteil am Elutionsmittels berücksichtigt).

Bsp.: Es sollen 100 ml Eluat gewonnen werden. Es wird die Menge naturfeuchtes Sediment eingewogen, die 50 g Trockengewicht entspricht. Anschliessend wird mit ABW oder ASW auf 200 g aufgefüllt.

Ist der Wassergehalt der Sedimentprobe = 75%, so wird die Sedimentprobe mit ihrem eigenen Wasseranteil eluiert.

Die Gefäße werden verschlossen und auf einem Überkopfschüttler mit 5 – 10 Umdrehungen pro Minute bei Zimmertemperatur 24 Stunden geschüttelt. Falls kein Überkopfschüttler vorhanden ist, kann auch ein anderer Schüttlertyp verwendet werden. Es ist dabei darauf zu achten, dass das Sediment einerseits in Suspension bleibt, andererseits aber nicht so stark geschüttelt wird, dass die Sedimentpartikel zerrieben werden.

Nach dem Schütteln lässt man die Probe für ca. 15 Minuten absetzen und dekantiert dann den noch trüben Überstand in Zentrifugengefäße (aus inertem Material). Je nach Zentrifugenleistung ist die Probe 10 Minuten bei 10.000 g oder 30 Minuten bei 3.000 g zu zentrifugieren (Zentrifuge auf 20°C kühlen). Der Überstand wird über einen mit ABW oder ASW vorgewaschenen Glasfaserfilter oder über eine Kombination aus Glasfaservorfilter und Glasfasermikrofilter filtriert. Falls die Probe anschließend dennoch eine Trübung größer als 50 FNU hat, wird empfohlen, die Zentrifugation zu wiederholen.

Von dem Eluat sind die Leitfähigkeit (Salinität), der pH-Wert und der Sauerstoffgehalt zu bestimmen. Der Sauerstoffgehalt sollte bei mindestens 50 % Sättigung liegen, liegt er darunter, sollte das Eluat bis zum Erreichen dieses Wertes im offenen Becherglas gerührt werden.

Die Biotestverfahren sollten unmittelbar im Anschluss an diese Messungen angesetzt werden. Das Eluat kann für längstens 48 Stunden bei 4°C gelagert werden. Wird diese Lagerdauer überschritten muss das Sediment erneut eluiert werden.

Der pH-Wert wird je nach Testvorschrift eingestellt.

III. Meer-/ Brackwasser Modifikation des Leuchtbakterientests

Zum Zeitpunkt der Beendigung des Abschlussberichts liegt die ergänzende Richtlinie zum Leuchtbakterientest als Antrag auf einen informativen Annex bei ISO in der folgenden Form vor:

Revision of ISO 11348-1-3 (1998):

Application for an additional informative annex (D) for testing saltwater samples with the luminescent bacteria test

1. Background information:

The test organism *Vibrio fischeri* is a marine bacteria. Testing saltwater samples with the standard procedure often leads to stimulation effects, which may mask inhibition effects (Klein 1991). The stimulation is probably caused by alkali and alkaline-earth metal ions (Klein 1991; Krebs 1992). With this modification of the test procedure the bioluminescence in the control is optimised by using an artificial seawater or an artificial brackish water as control and dilution water. Thus, the stimulation effects are reduced and the method is applicable for seawater and brackish water samples and the respective elutriates and porewater.

2. Definitions

2.1. Salinity (Practical Salinity)

According to ISO 6107 Teil 2 (1997): practical salinity, S , dimensionless value of which, for the purpose of checking water quality, may be regarded as an estimate of the concentration, in grams per kilogram, of the dissolved salts in seawater; it is defined algorithmically, in terms of the ratio (K_{15}) of the electrical conductivity of the sample, at 15 °C and 1 atm, to that of a defined potassium chloride solution (32,436 6 g/kg of sample) at the same temperature and pressure.

2.2. Saltwater sample

Brackish or sea water sample with a salinity between 5 to 35.

2.3. Elutriates of marine or brackish sediments

Liquid extract of marine or brackish sediment. The elution media is artificial or natural sea/ brackish water.

2.4. Porewater of marine or brackish sediments

Porewater or interstitial water is the water occupying space between sediment particles.

3. Materials

3.1 . Reference substances

- 3,5-dichlorophenol
- Zinc sulfate heptahydrate ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)

3.2 Artificial sea water (ASW) and artificial brackish water (ABW)

Use deionised water for the preparation of artificial sea water (ASW) and artificial brackish water (ABW) with the composition given in table 1. All chemicals shall be of analytical grade.

Table 1 – Artificial seawater (ASW) (according to ISO 10253) and artificial brackish water (ABW)

	Artificial Sea Water (ASW)	Artificial Brackish Water (ABW)
Salt	[g/L]	[g/L]
NaCl	22,0	14,19
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	9,7	6,26
Na_2SO_4 (anhydrous)	3,7	2,39
CaCl_2 (anhydrous)	1,0	0,65
KCl	0,65	0,42
NaHCO_3	0,20	0,13
H_3BO_3	0,023	0,015
Conductivity [$\mu\text{S}/\text{cm}$] (20°C)	47.000 \pm 1.000	31.000 \pm 1.000
Practical Salinity (20°C)	31 \pm 1	20 \pm 1
pH-value:	7,5 \pm 0, 2	7,5 \pm 0,2

4. Procedure

The bacteria are reconstituted according to the standard procedure. Depending on the salinity of the saltwater, elutriate or porewater sample, artificial seawater (ASW) or artificial brackish water (ABW) is used as negative control, as dilution water for the sample dilution series and as dilution water for the reference substance instead of a 2% sodium-chloride solution (see summary in table 2).

Table 2 - Comparison of the standard procedure and the modified procedures

	Standard Procedure ISO 11348-1 -3	Brackish water modification	Sea water modification
Salinity (S) of sample	< 5	$5 = x = 20$	$20 < x = 35$
Reference substance solved in	NaCl-solution (S 20)	ABW (S 20)	ASW (S 31)
Control	NaCl-solution (S 20)	ABW (S 20)	ASW (S 31)
Dilution water	NaCl-solution (S 20)	ABW (S 20)	ASW (S 31)

4.1. Sample with a salinity of $5 = x = 20$ (brackish water modification):

Measure and document the salinity of the sample. Samples with a salinity < 20 S have to be raised to a salinity of 20 S with sodium chloride. Measure the pH-value of the sample. If the pH lies between 7.0 and 8,5 there is generally no adjustment necessary. If necessary, adjust the pH of the sample to $7,5 \pm 0,2$ by adding either hydrochloric acid or sodium hydroxide; choose the concentration of the hydrochloric acid or the sodium hydroxide to restrict the volume added to not more than 5 % of total volume.

Use the artificial brackish water (ABW) (3.1) as

- control
- for the dilution series of the sample
- for the stock solution of the reference substance and for its dilution series.

4.2. Sample with a salinity of $20 < x = 35$ (sea water modification):

Measure and document the salinity of the sample. Measure the pH-value of the sample. If the pH lies between 7.0 and 8,5 there is generally no adjustment necessary. If necessary, adjust the pH of the sample to $7,5 \pm 0,2$ by adding either hydrochloric acid or sodium hydroxide; choose the concentration of the hydrochloric acid or the sodium hydroxide to restrict the volume added to not more than 5 % of total volume.

Use the artificial seawater (ASW) (3.1) as

- control
- for the dilution series of the sample
- for the stock solution of the reference substance and for its dilution series

5. Precision data

For the reference substance 3,5-dichlorophenol the EC₅₀-values given in table 3 have been determined in a round robin test. For zinc sulfate heptahydrate the data set was limited and was not obtained in a round robin test. It is shown for informative purposes only. The data set with freshly prepared bacteria is obtained by one laboratory only.

NOTE: The outliers were not considered for the derivation of the mean value. Those outliers, which failed in the standard procedure were not considered for the precision data of the modified procedures.

Table 3 – Precision data for fresh cultured bacteria (ISO 11348-1)

Reference substance	Test	L	N	\bar{x} mg/l	s mg/l	CV %
3,5-dichlorophenol	Standard	1	5	3,87	0,317	8,2
	Brackish water	1	2	3,46	0,094	2,7
	Sea water	1	3	3,23	0,188	5,8
Zn ²⁺	Standard	1	3	20,70	2,39	11,55
	Brackish water	1	2	31,43	2,63	8,36
	Sea water	1	6	36,73	3,66	9,96

Abbreviations used in table 3 signify:

- L Number of laboratories
- N Number of sets of data
- \bar{x} Mean value (EC₅₀-value) (one laboratory)
- s Standard Deviation (one laboratory)
- CV Coefficient of variation (one laboratory), in percent

Table 4 – Precision data for liquid-dried bacteria (ISO 11348-2)

Reference substance	Test	L	N	NAP %	\bar{x} mg/l	S _R mg/l	CV _R %
3,5-dichlorophenol	Standard	15	17	23,5	4,67	0,370	7,9
	Brackish water	11	13	0,0	4,83	0,420	8,7
	Sea water	11	13	0,0	4,02	0,158	3,9
Zn ²⁺	Standard	1	2	-	24,78	2,28	9,2
	Brackish water	2	3	-	35,96	1,27	22,1
	Sea water	2	2	-	43,65	9,66	3,55

Abbreviations used in table 4 signify:

L Number of laboratories

N Number of sets of data

NAP Number of outliers, in percent

\bar{x} Mean value (EC₅₀-value)

S_R Standard deviation of reproducibility

CV_R Coefficient of variation of reproducibility, in percent

Table 5 – Precision data for freeze-dried bacteria (ISO 11348-3)

Reference substance	Test	L	N	NAP %	\bar{x} mg/l	S _R mg/l	CV _R %
3,5-dichlorophenol	Standard	10	13	0,0	3,63	0,879	24,2
	Brackish water	10	13	7,7	3,63	0,434	12,0
	Sea water	10	13	0,0	3,62	0,683	18,9
Zn ²⁺	Standard	3	5	-	2,84	0,73	25,67
	Brackish water	2	4	-	6,10	1,59	26,13
	Sea water	3	5	-	6,08	1,50	24,65

Abbreviations used in table 5 signify:

L Number of laboratories

N Number of sets of data

NAP Number of outliers, in percent

\bar{x} Mean value (EC₅₀-value)

S_R Standard deviation of reproducibility

CV_R Coefficient of variation of reproducibility, in percent

References

Klein, B (1992): Die Rolle des Kaliums bei Toxizitätstests mit Leuchtbakterien (incl. abstract in english: The role of potassium in toxicity tests using luminescent bacteria). Z.f.Angew.Zool., Vol. 4, p. 199-219.

Krebs, F. (1992): Gewässeruntersuchung mit dem durch Alkali- und Erdalkalitionen-Zugabe optimierten DIN-Leuchtbakterientest, dargestellt am Beispiel der Saar. In: Steinhäuser, K. G. & Hansen, P. D. (Eds.). Biologische Testverfahren. Stuttgart, Deutschland. Gustav Fischer Verlag. Schr.-Reihe Verein WaBoLu. p. 657-673.

IV. Erweiterung des marinen Algentests mit *Phaeodactylum tricornutum* auf Meer-/ Brackwasser-Eluate

Zum Zeitpunkt der Beendigung des Abschlussberichts befindet sich der marine Algentest (ISO EN DIN 10253 (1998)) in der Revision. Die Revision umfasst im Wesentlichen die Berücksichtigung der Wachstumsrate als alleinigen Parameter sowie die Erweiterung der Testvorschrift auf die Untersuchung von Meerwasserproben und Eluate. Die Revision sieht noch nicht die methodische Differenzierung von Eluaten unterschiedlicher Salinität (Meerwasser- und Brackwasser-Modifikation) vor. Diese wird aber im Folgenden als Ergänzung auch zum zukünftigen Standard berücksichtigt:

1. Probenvorbereitung (Eluate)

Die Eluate werden nach Vorschrift des DIN AK 5.3 hergestellt. Wenn der pH-Wert im Bereich von 7,5 - 8,5 liegt, ist keine weitere Einstellung notwendig.

Je nach Salinität der Probe wird die Brackwasser oder die Meerwasser Modifikation des Algentests angewendet. Sie unterscheiden sich lediglich in der Verwendung von künstlichem Meerwasser (ASW) und künstlichem Brackwasser (ABW) (siehe Tabelle 1 und 2).

Untersuchungen zur Salinitätstoleranz von *Phaeodactylum tricornutum* zeigten, dass die in der Testvorschrift geforderte Wachstumsrate von 0,04 pro Stunde bei einer Salinität der Probe von $10 \leq x \leq 35$ erreicht wurde. Liegt die Salinität des Eluats in der Spanne von $10 \leq x \leq 35$, sollte das Eluat ohne Aufsalzen oder Verdünnen eingesetzt werden.

Tabelle 1: Brackwasser- und Meerwasser-Modifikation des marinen Algentests

	Brackwasser-Modifikation	Meerwasser-Modifikation
Salinität der Probe	$10 \leq x \leq 20$	$20 < x \leq 35$
Nährmedien angesetzt in	ABW (S 20)	ASW (S 31)
Verdünnungswasser	ABW (S 20)	ASW (S 31)
Nährmedium der Kontrolle basierte auf	ABW (S 20)	ASW (S 31)
Lösungsmittel der Referenzsubstanz	ABW (S 20)	ASW (S 31)

2. Zusammensetzung des künstlichen Meerwassers (ASW) und künstlichen Brackwasser (ABW)

Tabelle 2: Künstliches Meerwasser (ASW) (nach DIN EN ISO 10253) und künstliches Brackwasser (ABW)

	Artificial Sea Water (ASW)	Artificial Brackish Water (ABW)
Salz	[g/L]	[g/L]
NaCl	22,0	14,19
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	9,7	6,26
Na ₂ SO ₄ (wasserfrei)	3,7	2,39
CaCl ₂ (wasserfrei)	1,0	0,65
KCl	0,65	0,42
NaHCO ₃	0,20	0,13
H ₃ BO ₃	0,023	0,015
Salinität (Refraktometer) (20°C)	31 ± 1	20 ± 1
Leitfähigkeit [µS/cm] (20°C)	47.000 ± 1.000	31.000 ± 1.000
pH-Wert:	7,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2

Alle Chemikalien müssen von analytischer Reinheit sein.

Das Wasser für die Herstellung des synthetischen Meerwassers muss deionisiert oder von vergleichbarer Reinheit sein.

3. Herstellung des Meer-/ Brackwasser - Nährmediums

Die Herstellung des Nährmediums mit den Nährstammlösungen 1-3 erfolgt nach DIN EN ISO 10253. Bei der Brackwassermodifikation wird lediglich das ABW anstelle des ASW eingesetzt.

4. Herstellung des neunfach-konzentrierten Meer-/ Brackwasser-Nährmediums

Zu etwa 600 ml ASW (bzw. ABW) werden 135 ml Nährstammlösung 1, 4,5 ml Nährstammlösung 2 und 9 ml Nährstammlösung 3 gegeben (siehe DIN EN ISO 10253). Alle Lösungen sollten steril sein. Zügiges Auffüllen und Mischen dieser Lösung auf 1 l mit steril filtriertem ASW (bzw. ABW). pH-Wert-Einstellung auf $8.0 \pm 0,2$ nach einigen Stunden.

5. Herstellung der Vor-Kultur

Die Kultur, aus der das Inokulum für die Vor-Kultur entnommen wird, muss sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.

6. Testdurchführung

Die Testansätze und Kontrollen werden folgendermaßen angesetzt (siehe Pipettierschema (Tabelle 3):

- Es wird das neunfach-konzentrierte Nährmedium in allen Testansätzen und Kontrollen in gleicher Menge vorgelegt. Dabei wird das Mengenverhältnis so gewählt, dass zu Testbeginn in allen Testansätzen und Kontrollen eine Nährmediumkonzentration nach DIN EN ISO vorliegt.
- Als Verdünnungswasser für die Herstellung der Verdünnungsstufen wird das ASW oder ABW ohne die Stammlösungen 1-3 verwendet.
- Zur Herstellung des Inokulums (Zelldichte 1×10^5 Zellen pro Milliliter) wird die erforderliche Zellzahl aus der Vor-Kultur in frisches einfach-konzentriertes Nährmedium überführt. Das Inokulum wird so gewählt, dass zu Testbeginn im Testansatz und in der Kontrolle 10^4 Zellen je Milliliter sind.
- Bei Anwendung des Pipettierschemas nach Tabelle 3 wird unter diesen Vorgaben die nach DIN EN ISO vorgesehene Nährstoffkonzentration und Algendichte in allen Testansätzen gewonnen.
- Für jede Verdünnungsstufe wird ein Blindwert (Testansatz ohne Algen) mitgeführt. Hierfür wird in den Testansatz anstelle des Inokulums (200 μ L) einfach-konzentriertes Nährmedium (200 μ L) eingesetzt.

Tabelle 3: Pipettierschema für den miniaturisierten marinen Algentest (für größere Testvolumina ist analog vorzugehen)

Verdünnung	G-Stufe	9x- konz. Nähr-medium [µL]	ASW oder ABW [µL]	Probe [µL]	Inokulum [µL]	End-volumen [µL]
1 in 1,25	1	200	-	1600	200	2000
1 in 2	2	200	600	1000	200	2000
1 in 3	3	200	933	667	200	2000
1 in 4	4	200	1100	500	200	2000
1 in 5	5	200	1200	400	200	2000
1 in 8	8	200	1350	250	200	2000
1 in 12	12	200	1433	167	200	2000
1 in 16	16	200	1475	125	200	2000
1 in 24	24	200	1517	83	200	2000
1 in 32	32	200	1537	63	200	2000
Kontrolle		200	1600	-	200	2000

7. Testauswertung

Es wird die prozentuale Hemmung der Wachstumsrate μ bestimmt.

V. Ergänzende Richtlinie zum akuten Amphipodentest (ISO DIS 16712 (2002))

Die ISO Standardisierung des akuten Amphipodentests wird 2003 abgeschlossen sein. Da dieser Standard eine Vielzahl von Testspezies berücksichtigt, wird empfohlen, mindestens die ICES Richtlinie (Roddie & Thain 2001) zur Information hinzuzuziehen. Darüber hinaus wird folgende Vorgehensweise empfohlen:

1. Freilandentnahme der Testorganismen:

- Sieben der Tiere durch 500 µm Sieb im Freiland
- Transport der Tiere ins Labor: kühl und feucht (Tier ohne Wasser und ohne Sediment, nur mit abgespülten Algen bedecken; isoliert transportieren).

2. Akklimatisierung/ Hälterung der Testorganismen:

- Hälterung der Tiere im Kontrollsediment
- Aquarien mit Recycling-System (Filter) und Belüftung;
- Beleuchtung: 16h hell: 8h Dunkel
- Künstliches Meerwasser der Firma Sigma (Sigma Sea Salt) (Salinität 25 – 35)
- Wird ein Test mit Brackwassersedimenten durchgeführt, so sind die Tiere zuvor an eine Salinität von 25 zu akklimatisieren (max. Differenz: S 3 pro Tag).
- Fütterung: mit Algen, wenn die Tiere länger als 4 Tage gehältert werden. Die Fütterung sollte 3 Tage vor Testbeginn enden.

(Siehe auch Versuchsaufbau zur Reproduktion von *C. volutator* im Labor)

3. Probenvorbereitung

- Sieben der naturfeuchten Sedimente durch ein 1 mm Sieb, um Prädatoren und Corophien des Probenahmestandortes auszuschließen. Kommen an dem Probenahmestandort Corophien vor, so sollte ein 500 µm Sieb eingesetzt werden.

4. Testaufbau:

- Anzahl der Tiere: 20 Tiere je Testansatz; Je Probe 3 Parallelen; 5 Kontrollen
- Beleuchtung: Dauerlicht
- Belüftung/ Sauerstoffsättigung: > 85 %
- Synthetisches Meerwasser: Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Produkt No. S 9883) in deionisiertem Wasser ansetzen.

➤ Salinität:

- Meerwasser-Sedimente: Sigma Sea Salt, Salinität 30
- Brackwasser-Sedimente: Sigma Sea Salt, Salinität 30, ergibt während des Tests je nach Sediment eine Salinität zwischen ca. 22-28S.

5. Testparameter (Endpunkte):

➤ Tot, moribund, lebend

Definitionen:

- Tot: bei Anstoßen der Tiere mit Pipette keine Reaktion. Tiere erholen sich auch nach Überführen in frisches Meerwasser oder das Kontrollsediment nicht mehr.
- Moribund: Todgeweiht, d.h. Beine bewegen sich noch, aber kein Fluchtverhalten mehr möglich. Häufig nehmen die Tiere dann eine gekrümmte/ eingerollte Körperhaltung ein.
- Lebend: Tiere sind fit, bewegen sich aktiv, uneingeschränkt (Fluchtverhalten).

Anmerkung: Es kommt häufig vor, dass die Tiere unmittelbar nach dem Sieben „moribund“ sind, nach Überführen in frisches Seewasser sind sie jedoch nach einigen Minuten „lebend“ und graben sich auch im Sediment wieder ein. Dieses ist als „moribund“ zu protokollieren.

- Wiedereingrabeverhalten am Testende nachdem sie ca. 20 Minuten auf frischem Kontrollsediment sind.
- Sedimentmeidung während der Testdauer von 10 Tagen mindestens jeden zweiten Tag protokollieren.

6. Kontrollmortalität:

- < 20% im Einzelgefäß
- < 15% für alle Kontrollgefäße im Test

7. Referenzsubstanz:

- Wasserphase Test mit Ammoniumchlorid:
 - 3 Konzentrationen à 2 Replikate mit je 10 Tieren
 - Stammlösung: 10g/l NH_4^+ (29,69 g/l NH_4Cl)
 - 3 Konzentrationen im Bereich von 0 – 360 mg/l NH_4^+
 - EC_{50} -Wert NH_4^+ :
 - Signalbereich: 47,4-164,6 mg/l
 - Alarmbereich : 18,1-193,9 mg/l (Kontrollkarte TNO-MEP)
- Dauer: 72h
- pH-Wert: $8 \pm 0,5$