

Masterarbeit

Implementierung und Validierung eines Toxizitätstests mit Daphnia magna Straus für verschiedene Umweltproben

Vorgelegt von:

Peter Eggenbauer, BSc

01035328

Betreuer:

DI Alexia Aldrian

Univ.-Prof. DI Dr. mont. Roland Pomberger

Leoben, 07.06.2017

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und mich auch sonst keiner unerlaubten Hilfsmittel bedient habe.

AFFIDAVIT

I declare in lieu of oath, that I wrote this thesis and performed the associated research myself, using only literature cited in this volume.

Datum

Unterschrift

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dipl.-Ing. Alexia Aldrian für das Zustandekommen dieses interessanten Themas sowie die stets verfügbare Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit bedanken. Unsere freundschaftliche Zusammenarbeit habe ich als einen wichtigen Beitrag für ein konstruktives Arbeiten an dem Projekt empfunden. Auf die von ihr erhaltenen hilfreichen Hinweise hinsichtlich des Verfassens wissenschaftlicher Arbeiten werde ich noch in Zukunft gerne zurückgreifen.

Von den aufmerksamen Mitarbeitern des umweltanalytischen Labors am Lehrstuhl für Abfallverwertungstechnik und Abfallwirtschaft habe ich jederzeit hilfreiche Tipps zur Bedienung von Geräten und Durchführung von Messungen erhalten.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern nicht nur für die finanzielle Unterstützung, sondern auch für die Ermutigungen in den schwierigeren Phasen des Studiums. Ohne sie wäre es mir nicht möglich gewesen, an einer der besten Universitäten Österreichs zu studieren. Insbesondere in der Anfangszeit, welche nicht nur für mich mit einer Vielzahl an Neuerungen verbunden war, habe ich bei meiner Patentante immer Rückhalt finden können. Meine Geschwister haben ebenfalls Verständnis für meine häufige Abwesenheit, welche mit der Auswahl des Studienortes Leoben verbunden war, gezeigt.

Kurzfassung

Implementierung und Validierung eines Toxizitätstests mit *Daphnia magna* Straus für verschiedene Umweltproben

Ökotoxikologische Tests stellen in der Umweltanalytik ein wichtiges Werkzeug zur Beurteilung des Gefahrenpotentials von flüssigen und festen Abfällen dar. Für die vorliegende Masterarbeit wurde die Bandbreite an potentiellen ökotoxikologischen Verfahren für unterschiedlichste Matrices erhoben. Diese Verfahren wurden auf ihre Anwendbarkeit am Lehrstuhl für Abfallverwertungstechnik und Abfallwirtschaft mit den bereits bestehenden Mitteln bewertet. Ein Verfahren, der akute Toxizitätstest zur Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von *Daphnia magna* Straus nach ÖNORM EN ISO 6341, wurde im praktischen Teil der Masterarbeit auch umgesetzt und validiert. Der Toxizitätstest wurde sowohl gemäß den Normvorgaben als auch mit einem käuflich erwerbbaaren Testkit durchgeführt. Neben der als Referenzmaterial dienenden Substanz Kaliumdichromat wurde der Toxizitätstest im Zuge der experimentellen Versuchsreihen auch auf Reinstwasser, Leitungswasser und Oberflächenwasser angewendet. Außerdem wurden Eluate nach ÖNORM EN 14735 von mehreren festen Abfällen hergestellt und diese ebenfalls dem ausgewählten Toxizitätstest unterzogen. Zu diesen festen Abfällen gehörten metallentfrachtetes Batterieaktivmaterial, mechanisch vorbehandelter Elektroschrott sowie eine Bodenprobe. Neben den Toxizitätstests wurden die Eluate auch analytisch umfangreich charakterisiert. Die Ergebnisse der Toxizitätstests der untersuchten Materialien stimmten sehr gut mit den zu erwartenden Resultaten überein – sowohl für das Testverfahren nach Norm als auch für das Testkit. Im Falle der Referenzsubstanz Kaliumdichromats wurde der Sollwert für EC_{50} von $1,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ sehr gut erreicht. Das Eluat des Batterieaktivmaterials wurde zu Vergleichszwecken auch von einem anderen Prüflabor untersucht. Die Ergebnisse für diese Probenmatrix ergaben ebenfalls gute Übereinstimmung mit dem Referenzlabor.

Abstract

Implementation and validation of a toxicity test with organisms of the species *Daphnia magna* Straus for various environmentally relevant samples

Ecotoxicological tests represent an analytically important tool for the assessment of potential risks emerging of liquid and solid wastes. For this master thesis a literature survey was carried out in order to determine the range of existing ecotoxicological test methods for different environmentally relevant matrices. These methods were evaluated according to their practical applicability at the Chair of Waste Processing Technology and Waste Management under the employment of currently available means. Hereby, the acute toxicity test for the determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus according to ISO 6341 was implemented and validated. The toxicity test was conducted on the one hand following the instructions stated in the standard procedure, on the other hand according to a commercially available test kit. Besides potassium dichromate, the substance which served as reference material, experiments with ultrapure water, tap water and surface water were part of the thesis' practical experiments. Furthermore, leachates in compliance with the European Standard EN 14735 of several solid wastes were created and likewise tested upon their toxicity. These materials comprised metal-depleted active material of batteries, mechanically pre-treated electronical and electric waste as well as a soil sample. In order to gain a more detailed image of the composition of the samples, the leachates were characterised by analytical methods. The results obtained with the toxicity tests were highly in accordance with the expected outcomes – both for the method corresponding to the standard procedure and the test kit. In case of potassium dichromate the desired value for the EC_{50} of $1.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was obtained. The leachate of the batteries' active material was additionally analysed by another laboratory for comparative purposes. The results obtained within the thesis showed good accordance with those acquired in the reference laboratory.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 EINLEITUNG	3
1.1 Problemstellung	4
1.2 Zielsetzung	5
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	6
2.1 Begriffe im Zusammenhang mit Ökotoxikologie	8
2.1.1 Gesuchte Konzentration	9
2.1.2 Formen der Toxizität	11
2.1.2.1 Akute Toxizität.....	11
2.1.2.2 Chronische Toxizität	15
2.1.2.3 Genotoxizität	16
2.2 Wirkungsweise toxischer Substanzen	17
2.2.1 Expositionsphase	18
2.2.2 Toxikokinetische Phase	18
2.2.3 Toxikodynamische Phase	21
2.3 Ökotoxikologische Tests	24
2.3.1 Tests zur Ermittlung der Toxizität von Wasserproben	26
2.3.2 Tests zur Ermittlung der Toxizität von Bodenproben	43
2.3.3 Tests zur Ermittlung der Toxizität von Abfällen	52
2.4 Auswahl eines geeigneten Toxizitätstests	53
2.4.1 Entscheidung für die Durchführung des vorliegenden Tests	54
2.4.2 Einsatz von Krebstieren der Gattung Daphnia magna zur Beurteilung der Qualität von Wasser	55
2.4.3 Akuter Toxizitätstest zur Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von Daphnia magna Straus nach ÖNORM EN ISO 6341.....	57
2.4.4 Herkunft der Organismen.....	60
3 EXPERIMENTELLER TEIL	65
3.1 Beschreibung des notwendigen Equipments	65
3.2 Gegenüberstellung von Norm und Toxkit	70
3.3 Versuchsbeschreibung	73
3.3.1 Vorbereitungen für die experimentellen Versuchsreihen	75
3.3.1.1 Herstellung des Verdünnungswassers	75
3.3.1.2 Zucht der Organismen	76
3.3.2 Durchführung der experimentellen Versuchsreihen.....	78

3.3.3	Auswertung	79
3.4	Proben und Probenvorbereitung	80
3.4.1	Reinstwasser	82
3.4.2	Leitungswasser	82
3.4.3	Oberflächenwasser	82
3.4.4	Elektro- und Elektronikabfälle	84
3.4.5	Batterieaktivmaterial	85
3.4.6	Bodenprobe	87
3.4.7	Kaliumdichromat	88
4	ERGEBNISSE / DISKUSSION	89
4.1	Reinstwasser	89
4.2	Leitungswasser	91
4.3	Oberflächenwasser	93
4.4	Elektro- und Elektronikabfälle	94
4.5	Batterieaktivmaterial	97
4.6	Bodenprobe	105
4.7	Kaliumdichromat-Lösung	107
5	ZUSAMMENFASSUNG	110
6	VERZEICHNISSE	113
6.1	Literaturverzeichnis	113
6.2	Abkürzungsverzeichnis	119
6.3	Tabellen	121
6.4	Abbildungen	123
ANHANG A	I
ANHANG B	XVI

1 Einleitung

Durch anthropogene Einflüsse werden die Umweltmedien Boden, Abwasser sowie Luft beeinträchtigt, wobei insbesondere Wasserkörper und Böden durch industrielle Tätigkeiten negativ beeinflusst werden. Um diese Qualitätsänderungen verfolgen zu können, wurden einheitliche Vorgehensweisen entwickelt. Diese sind in Richtlinien, Verordnungen oder Normen festgelegt.

Insbesondere auf dem Feld der Ökotoxikologie wurden in der jüngeren Vergangenheit zahlreiche Normen entwickelt und herausgegeben, um das Gefährdungspotential von belasteten Wässern oder Böden sowie Abfällen auf lebende Organismen festzustellen. Das Spektrum der im Rahmen der Normen untersuchten Spezies erstreckt sich über einen weiten Bereich, beispielsweise existieren für die Ermittlung toxischer Effekte einer Wasserprobe Tests an Algen, Bakterien, Krebstieren, Fischen aber auch in Kläranlagen anfallender Belebtschlamm.

Bei den verfügbaren Versuchen zur Prüfung von Bodenproben kann zwischen solchen, die das Ziel der Untersuchung von Bodenverbesserungsmittel haben und jenen, welche zur Beurteilung der Beschaffenheit eines gegebenen Bodens heran zu ziehen sind, unterschieden werden. Bei letzteren kann die Wirkung einer Substanz oder eines Stoffgemisches auf einzelne Versuchstiere bestimmt werden, hierzu zählen Testverfahren an Würmern, Schnecken oder höheren Pflanzen. Alternativ dazu wurden Normen erarbeitet, mit welchen der Informationsgehalt über Auswirkungen toxischer Verbindungen auf mit dem Umweltmedium Boden assoziierte Prozesse wie die Stickstoffmineralisierung erweitert werden kann.

Im Hinblick auf die Untersuchung des Gefährdungspotentials von Abfällen existiert eine vergleichsweise geringe Zahl an standardisierten Verfahren. Hier wird vermehrt der Fokus auf die korrekte Herstellung von Proben und das einheitliche Vorgehen bei der Durchführung ökotoxikologischer Prüfungen gelegt.

Die hohe Zahl ökotoxikologischer Tests ist nicht nur mit dem Versuch, eine möglichst große Bandbreite unterschiedlicher Organismen abzudecken, zu erklären, sondern auch mit dem Ziel, die bekannten Formen der Toxizität zu bedienen. Hierbei wird zwischen drei Arten differenziert: der akuten, der chronischen sowie der Genotoxizität. Die meisten der Normen behandeln Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität, da die unmittelbar auftretenden Auswirkungen einer Substanz auf ein Ökosystem von hoher Bedeutung für die Beurteilung sind. Bedingt durch die Eigenschaft solcher Tests, die auf einen kurzen Zeitraum beobachtbaren Effekte festzuhalten, eignen sie sich hervorragend für die Untersuchung von Proben mit unterschiedlicher oder gar unbekannter Zusammensetzung, wie sie im Bereich der Umweltanalytik oft vorkommen. Ein weiterer Vorteil an akuten Tests besteht in ihrer einfachen und kostengünstigen Durchführbarkeit. (Holler et al., 1996:393)

Chronische Tests erweitern den direkten Charakter von akuten Tests dahingehend, als dass sie Aussagen über einen längeren Expositionszeitraum treffen. Hierbei werden Versuchsorganismen oft über mehrere Wochen bis hin zu Jahren der zu prüfenden Substanz

ausgesetzt. Diese Art von Versuchen wird vor allem zur Simulation realer Belastungssituationen herangezogen. (Holler et al., 1996:397)

Der dritte Typ von Toxizitätstests widmet sich dem Einfluss von Schadstoffen auf die Zellen eines Organismus. Ein Merkmal genotoxischer Versuche besteht darin, dass sich Erkenntnisse über Effekte auf Nucleinsäuren auf andere Zellen im betroffenen Organismus übertragen lassen. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Versuchen lassen sich bei genotoxischen Tests keine Dosis-Wirkungsbeziehungen ableiten, dies ist mit der Tatsache zu erklären, dass für Substanzen, welche auf die Zellgesundheit von Organismen einwirken, keine Schwellenwerte existieren (Holler et al., 1996:399f.). Für Stoffe, welche nach den konventionellen Methoden auf ihre Umweltgefährlichkeit hin untersucht wurden, lassen sich solche Aussagen treffen. Werte wie die letale Konzentration, LC_x , oder effektive Konzentration, EC_x , werden bei Erstellung eines Sicherheitsdatenblattes für einen toxischen Stoff in der Regel angegeben.

Betrachtet man die Wirkungsweise toxischer Substanzen, wird in der Literatur zwischen den der Exposition, der toxikokinetischen Phase sowie der toxikodynamischen Phase unterschieden. Die Exposition stellt den Schritt der Aufnahme eines Schadstoffes in den Körper dar und hängt von Faktoren wie der Zeit, der Temperatur und nicht zuletzt den spezifischen Oberflächen der in Frage kommenden Resorptionsflächen ab. Die Regionen des Magen-Darm-Traktes und der Lunge gelten bei Wirbeltieren als besonders anfällige Aufnahmeorte für körperfremde Stoffe. (Fuhrmann, 2006:18f.)

Sobald ein Schadstoff Eingang in den Körper gefunden hat, findet die toxikokinetische Phase statt. Hier wird zwischen den Begriffen der Invasion und der Evasion differenziert, wobei erstere die Verteilung der Substanz im Körper bezeichnet. Die Evasion beschreibt Mechanismen des Körpers, um den Schadstoff in eine unschädliche Form zu bringen: einerseits besteht die Möglichkeit, eine Verbindung mittels Bindung und Speicherung zu immobilisieren, andererseits kann es zu einer Exkretion über die Respiration beziehungsweise den Stoffaustausch kommen. (Fuhrmann, 2006:36ff.)

Die finale Phase, welche zur Wirkung eines toxischen Stoffes führt, wird mit dem Terminus Toxikodynamik umschrieben. Das hierbei vorherrschende Modell ist jenes des sogenannten Schlüssel-Schloss-Prinzips, welches aussagt, dass eine Substanz sowohl physisch als auch physikalisch mit einem Rezeptor kompatibel sein muss, um eine Wirkung auslösen zu können. (Fuhrmann, 2006:108)

1.1 Problemstellung

Die Lehrveranstaltung „Laborübungen zu Angewandte Umweltanalytik“, welche Teil des Bachelorstudiums Industrielle Umweltschutz- und Verfahrenstechnik ist, soll um eine zusätzliche Übungseinheit erweitert werden. Dadurch soll den Studierenden ermöglicht werden, einen Einblick in die Begriffswelt sowie die Durchführung von ökotoxikologischen Tests zu erhalten. Die Arbeitsvorschrift soll möglichst auf einschlägigen Normen basieren und wichtige Elemente der experimentellen Vorgangsweise bei ökotoxikologischen Tests enthalten. Bislang wurden solche Verfahren am Lehrstuhl für Abfallverwertungstechnik und

Abfallwirtschaft noch nicht durchgeführt, somit besteht eventuell der Bedarf zusätzliches Equipment zu erwerben. Nach Auswahl eines geeigneten Verfahrens müssen die Voraussetzungen für die Umsetzung geschaffen werden und eine Implementierung sowie Validierung des Verfahrens durchgeführt werden.

1.2 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es zunächst einen Überblick über die Bandbreite an zur Verfügung stehenden Ökotoxizitätstests zu bilden. Die vorhandenen Verfahren sollen recherchiert und in der Arbeit beschrieben werden, wobei der Fokus auf Versuche an wässrigen Proben – einschließlich Eluaten – gelegt werden soll. Anschließend ist ein geeignetes Verfahren nach den Gesichtspunkten der Umsetzbarkeit, Praktikabilität und didaktischen Aspekten auszuwählen. Dieses Verfahren soll im praktischen Teil der vorliegenden Masterarbeit in den Laborräumlichkeiten des Lehrstuhls für Abfallverwertungstechnik und Abfallwirtschaft umgesetzt werden. Hierzu sind zunächst Voraussetzungen betreffend die infrastrukturellen und technischen Rahmenbedingungen zu erfüllen und anschließend das Verfahren anhand einer Reihe von ausgewählten Proben durchzuführen.

2 Theoretische Grundlagen

Bevor an eine nähere Auseinandersetzung mit dem Thema Ökotoxizität herangegangen werden kann, ist es zunächst erforderlich, den Begriff zu definieren. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat 1983 folgende Begriffsbestimmung veröffentlicht:

„Die Ökotoxikologie befaßt sich mit Effekten chemischer Substanzen auf Organismen in Populationen und Ökosystemen, soweit daraus direkt oder indirekt Schäden entstehen. Dabei ist es gleichgültig, ob die Ökosysteme von Natur aus oder unter Mitwirkung des Menschen entstanden sind. Die Schädigung kann durch den einmaligen Effekt einer relativ hohen Dosis ausgelöst, also akut sein. Sie ist aber meistens chronisch, d.h. Folge von wiederholten, relativ kleinen Dosen mit womöglich vielfältigen Effekten. Sie trifft den einzelnen Organismus unter den jeweiligen Bedingungen seines Biotops, in dem auch zahlreiche andere Organismen miteinander und mit den Umweltfaktoren in mannigfaltigen Wechselbeziehungen leben.“ (Holler et al., 1996:337)

Die ursprüngliche Definition des Begriffes Ökotoxikologie ist von Truhaut im Jahre 1977 formuliert worden, welcher die Disziplin als

„den Zweig der Toxikologie, der sich mit dem Studium toxischer Effekte, hervorgerufen durch natürliche oder synthetische Schadstoffe, auf die Bestandteile von Ökosystemen tierischer (auch menschlicher), pflanzlicher und mikrobieller Art in einem integrativen Zusammenhang beschäftigt“
(Forbes & Forbes, 1994:2)

festlegt.

Setzt man der Begriff der Ökotoxikologie mit anderen naturwissenschaftlichen Disziplinen in Beziehung, so lässt sich das in Abbildung 1 gezeigte Diagramm erstellen.

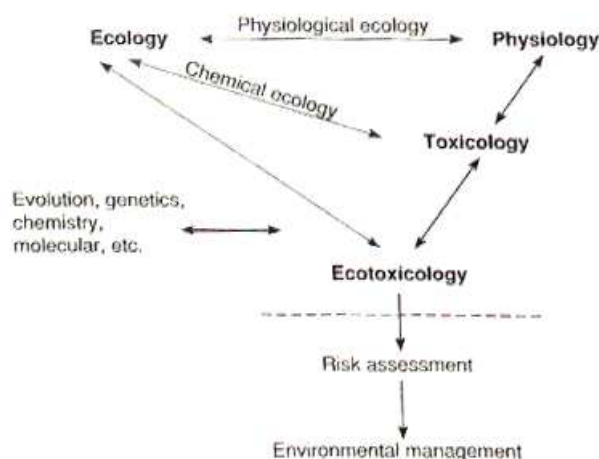


Abbildung 1: Gegenüberstellung der Beziehung zwischen Ökotoxikologie und verwandten Disziplinen (Forbes & Forbes, 1994:20)

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, bildet Ökotoxikologie die Grundlage für die Beurteilung von Risiken und die Entscheidungsfindung für umweltbezogene Fragestellungen.

Bedingt durch die Beschreibung toxischer Wechselwirkungen zwischen Ökosystemen und auf sie einwirkende Chemikalien, welche die Toxizität beeinflussen, lässt sich der Unterschied zwischen Umwelt- und Ökotoxikologie erklären. Während der Fokus der ersteren Disziplin auf dem Einfluss von Stoffen auf die Gesundheit des Menschen liegt, deckt die Ökotoxikologie sämtliche Organismen und Umweltmedien ab. Dies wird durch eine Kombination pharmakologischer sowie ökologischer Erfahrungen erreicht (Holler et al., 1996:337). Mithilfe wissenschaftlicher Methoden werden laufend neue Erkenntnisse in Bezug auf die unterschiedlichen Interaktionen zwischen chemischen Stoffen und Umweltmedien gewonnen. Diese werden zur Entwicklung neuer Tests herangezogen, welche zwei wesentlichen Zielen dienen:

Zum einen ist die Prüfung bestimmter Chemikalien erwünscht. Die Industrie entwickelt stetig neue Substanzen, welche vor Inverkehrbringung auf ihren Einfluss gegenüber den Menschen und seiner Umwelt zu untersuchen sind. Insbesondere eine mögliche vom Stoff ausgehende Gefährdung ist von Interesse dieser Tests, woraus sich die Notwendigkeit der Beurteilung des mit einer neu entwickelten Substanz assoziierten Risikos und des damit verbundenen Umweltmanagements ergibt. Die Ermittlung dieses Potentials wird durch den Vergleich einer der Substanz ausgesetzten Probe mit einem Kontrollansatz im Hinblick auf einen zuvor definierten Effekt erreicht. Die auf diese Weise erhaltene Konzentration an der Testsubstanz wird mit in der Umwelt unter realistischen Bedingungen auftretenden Konzentrationen verglichen. (Forbes & Forbes, 1994:25; Holler et al., 1996:338)

Die zweite Art von ökotoxikologischen Tests ist für die Prüfung des Verhaltens in Umweltmedien präsenster Einzelchemikalien und Substanzagglomerationen vorgesehen. Die den Menschen umgebende Umwelt kann in die drei Kompartimente Wasser, Boden und Luft eingeteilt werden. Jedes der drei setzt sich aus unterschiedlichen chemischen Verbindungen zusammen, welche je nach Erscheinungsbild des jeweiligen Ökosystems voneinander abweichen. Dadurch können die Systeme wesentliche Unterschiede zueinander aufweisen. Das Ziel der Toxizitätstests liegt darin, das Gefährdungspotential einer festgelegten Menge eines der eventuell kontaminierten Medien zu bestimmen. Die Probe ist soweit zu verdünnen, dass, verglichen mit einer Kontrolle, kein Effekt mehr messbar ist. Der wesentliche Unterschied zur Chemikalienprüfung liegt in der Belastung der Proben, welche einerseits bereits vorhanden ist, jedoch andererseits nicht exakt berechenbar ist. Eine der wichtigsten Anforderungen an die Tests ist eine kostengünstige Durchführung, da ein großer Teil der Tests im Rahmen von Routineuntersuchungen durchgeführt wird. Weiters ist eine möglichst einfache Umsetzung gefragt, da die Entnahme von Umweltproben von einer Vielzahl unterschiedlicher Parameter abhängt, welche das Testergebnis beeinflussen können. Neben der Beleuchtung der von den Schadstoffen ausgehenden Effekte, sollen auch theoretische Konzepte zum Verständnis ihres Verhaltens erarbeitet werden. (Forbes & Forbes, 1994:16; Holler et al., 1996:338)

Betrachtet man die grundlegende Zielsetzung ökotoxikologischer Versuche, so lässt sich ableiten, welche Branchen den Fokus auf welchen Typ Test legen: besteht das Ziel in der Erfüllung gesetzlicher Rahmenbedingungen, beispielsweise bei der Entwicklung einer neuen Chemikalie, werden Industrie und Beratungsunternehmen auf Versuche zurückgreifen, welche eine Beurteilung des Risikos ermöglichen und Managemententscheidungen erleichtern. Forschungsinstitutionen hingegen arbeiten an der Erweiterung und eventuellen Widerlegung althergebrachter Theorien bezüglich des Einflusses von Chemikalien auf Umweltmedien und legen den Fokus auf die Hinterfragung vereinfachter Ansichtsweisen. (Forbes & Forbes, 1994:25)

2.1 Begriffe im Zusammenhang mit Ökotoxikologie

Im Prozess der Planung eines Toxizitätstests ist es notwendig, sich über einige Begriffe im Klaren zu sein und diese ausreichend zu definieren. Einen fundamentalen Aspekt in diesem Zusammenhang stellt der Endpunkt eines Versuches dar. Unter diesem wird die Änderung einer Eigenschaft des Testorganismus unter dem Einfluss der Testsubstanz verstanden, welche je nach vorliegender Situation unterschiedlich charakterisiert ist. Laut Holler et al. (1996) müssen die folgenden Kriterien bei der Auswahl der Endpunkte berücksichtigt werden:

- *„Die Aussageabsicht einer Untersuchung muß geklärt sein.*
- *Die Aussagekraft des Endpunkts im Sinne der jeweiligen Aussageabsicht muß nachgewiesen oder diskussionsfähig sein.*
- *Der Nachweis einer signifikanten Wirkung muß mit einem zur Aussageabsicht und Aussagekraft verhältnismäßigen Aufwand zu leisten sein. Die Verhältnismäßigkeit ist nach dem aktuellen Erkenntnisstand zu verhandeln.*
- *Die Wahl der Endpunkte muß der Festsetzung experimenteller Rahmenbedingungen vorausgehen. Das Versuchsdesign muß die für eine Auswertung hinreichend genaue Erfassung des Endpunktes ermöglichen. Eine während des Experiments erfolgende Wahl zusätzlicher Endpunkte scheitert häufig an ungeeigneten Bedingungen, etwa an der Zahl der Organismen, der Individuendichte bei Wachstumsmessungen oder dem Geschlechterverhältnis bei Reproduktionstests.“ (Holler et al., 1996:388)*

Die Prüfbedingungen können sich durch Faktoren wie Belastungsmuster, Verteilung im gegenständlichen Umweltkompartiment oder Akkumulation verändern, wodurch die unter Laborbedingungen erhaltenen Aussagen über eine einzelne Veränderung für realistische Modelle wenig Relevanz besitzen. Aus diesem Grund werden Versuche derart ausgelegt, dass mithilfe statistischer Methoden unterstützte Aussagen allgemeine Gültigkeit besitzen. Die dafür erforderliche hohe Anzahl an Stichproben wird entweder durch eine entsprechende Menge an Testindividuen oder aber lange Beobachtungsreihen erreicht. In der Literatur wird zwischen zwei Ansätzen differenziert: dem Regressionsansatz und dem varianzanalytischen Ansatz. Während bei ersterem der Nachweis der Abhängigkeit des Endpunktes von der Konzentration der Testsubstanz zu erbringen ist, steht bei der zweiten Herangehensweise

eine Abweichung im Vergleich mit einem Kontrollansatz im Vordergrund. (Holler et al., 1996:389)

Erhaltene Endpunkte müssen jedenfalls quantifizierbar sein. So können messbare Größen wie beispielsweise Längen, Anzahl der Nachkommen oder Konzentration von Biomolekülen herangezogen werden. In diesem Fall spricht man von ordinalskalierten Daten. Unter Nominalskalierung werden Daten verstanden, welche ausschließlich qualitativen Charakter aufweisen, so zählt das Kriterium „vorhanden – nicht vorhanden“ zu dieser Form von Endpunkt. (Holler et al., 1996:389)

2.1.1 Gesuchte Konzentration

Um eine chemische Verbindung bzw. ein Substanzgemisch im Hinblick auf die Toxizität einzuordnen, ist es erforderlich, jene Konzentration zu bestimmen, bei der eine zuvor definierte Wirkung eintritt. Diese Konzentration wird als effect concentration, EC, bezeichnet – in einigen Quellen wird der mit TD abgekürzte Begriff toxische Dosis verwendet, da der Ausdruck effect concentration in der Literatur häufiger ist, wird auch in der vorliegenden Arbeit dieser Terminus beibehalten. Falls die Wirkung der Tod der Versuchsorganismen ist, wird die gesuchte Konzentration als lethal concentration, LC, bezeichnet. In der Praxis werden bei einem solchen Versuch mehrere Verdünnungen der zu untersuchenden Substanz angesetzt und die Ergebnisse in einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung graphisch dargestellt. Abbildung 2 zeigt ein Beispiel einer Dosis-Wirkungskurve.

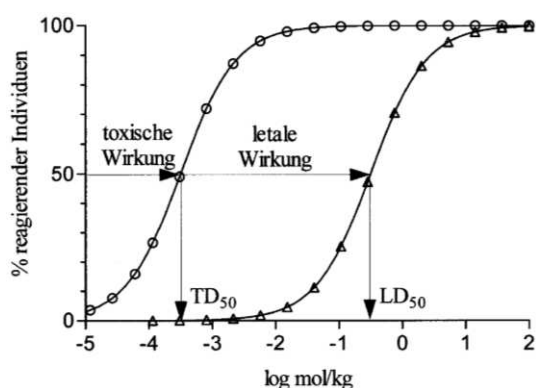


Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung (Fuhrmann, 2006:11)

Im Vergleich mit dem unbelasteten Kontrollansatz besteht die Möglichkeit, weiter zwischen den beobachteten Wirkungen zu unterscheiden: so wird die niedrigste Konzentration, bei der eine statistisch relevante Abweichung von der Kontrolle feststellbar ist, als lowest observed effect concentration, LOEC, bezeichnet. Analog dazu nennt sich die höchste Konzentration ohne eintretende Wirkung no observed effect level, NOEC. Ebenso wie beim EC-Wert muss der zu beobachtende Effekt genau definiert werden. Ferner bedarf es der gemeinsamen Angabe von NOEC und LOEC, da ihre Differenz von den eingesetzten Konzentrationen abhängt. (Fuhrmann, 2006:11; Holler et al., 1996:390f.)

In den meisten Fällen stellt sich die Dosis-Wirkungs-Beziehung als eine logarithmisch normalverteilte Funktion heraus. Aufgrund der Eigenschaft einer solchen Funktion, in die Unendlichkeit ausgedehnt zu sein, existiert keine Dosis, bei der keiner der betroffenen Organismen Schaden nimmt. Ausgehend von der Kurve wird auf eine Beantwortung der Frage nach Grenzwerten gesucht, welche sowohl für einzelne Individuen als auch Populationen Gültigkeit besitzen. Das Erscheinungsbild der Summenkurve wurde in vergangenen Untersuchungen als Hinweis auf das Vorhandensein eines populationsbezogenen Grenzwertes interpretiert, ein Gedankengang, der mittlerweile jedoch als inkorrekt gilt. Die Begründung hierfür liegt in der Normalverteilungskurve, welche sich, wie zuvor erwähnt, sowohl in positive als auch negative Richtung bis ins Unendliche ausdehnt. Korrekterweise muss die Toleranzkurve als Häufigkeitsverteilung der für die Mitglieder einer untersuchten Population auftretenden individuellen Grenzwerte einer zu observierenden Wirkung gesehen werden. Anders ausgedrückt reagiert jeder Organismus, auch wenn er derselben Spezies angehört, unterschiedlich auf einen Schadstoff und das Eintreten eines gewünschten Effektes wird erst nach Erlangen des eigenen Grenzwertes erreicht, diese Entwicklung ist in der Dosis-Wirkungsbeziehung abzuleiten. (Forbes & Forbes, 1994:107f.)

Bei den meisten Toxizitätstests besteht die untersuchte Wirkung im Tod der Versuchsorganismen. Aufgrund der Eindeutigkeit dieses Endpunktes wird der Effekt der Probe auf das untersuchte Umweltmedium deutlich hervorgehoben. Insbesondere akute Toxizitätstests zielen auf die letale Wirkung der Proben ab, bei chronischen Tests werden oft auch andere Endpunkte observiert, obgleich die eigentliche Bewertung anhand der Überlebensrate erfolgt. Obwohl die Sterblichkeit ein klar definierter Parameter ist, fällt es bei einigen Organismen schwer, den exakten Zeitpunkt des Todes festzulegen. So wird beispielsweise bei Wasserflöhen der Gattung *Daphnia magna* das Wort „Tod“ durch den Ausdruck „Immobilisierung“ ersetzt. Eine genaue Bestimmung des Ablebens wäre zu aufwendig und würde den Ablauf des Tests unnötig verkomplizieren.

Sämtliche Auswirkungen auf die Testorganismen, welche vor deren Ableben eintreten, werden unter dem Begriff subletale Wirkungen zusammengefasst. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass subletale Toxizitätstests Gefährdungen eines gegebenen Ökosystems um einiges exakter beschreiben als solche, deren Endpunkt die Sterblichkeit der Organismen ist. Die außerordentlich variiert auftretenden Effekte sind schwierig festzustellen und zu quantifizieren. Dies ist damit zu begründen, dass einerseits viel geringere Stoffmengen als bei der Ermittlung der LC benötigt werden und andererseits eine längere Testdauer bis zum Eintritt des gewünschten Effektes in Betracht gezogen werden muss. Aus diesen Gründen kommen subletale Tests oft nur in Frage, wenn die Abschätzung eines von einem Stoff ausgehenden Risikos gefragt ist. Sind hingegen Tests für die Umweltüberwachung gefragt, so liegt der Fokus der Untersuchungen in einer möglichst schnellen Detektion von Belastungen, ohne die finanziellen Aufwände zu hoch werden zu lassen. (Holler et al., 1996:392)

2.1.2 Formen der Toxizität

Bei der Planung eines Toxizitätstests ist festzulegen, in welcher Form die Wirkung untersucht werden soll. Je nach Zielsetzung wird zwischen akuter, subakuter, subchronischer und chronischer Toxizität unterschieden. Um eine toxische Wirkung als akut bezeichnen zu können, ist es erforderlich, dass sie nach Verabreichen einer hohen Dosis unmittelbar im Versuchsorganismus eintritt. Der Zeitraum bis zum Eintreffen der Wirkung hängt von Faktoren wie Substanzeigenschaften, der Konzentration im Testmedium und kinetischen Vorgängen ab, darf jedoch das Maximum von 96 Stunden nicht überschreiten um weiterhin als akut zu gelten. Wird die Dosis reduziert, treten vergleichbare Wirkungen dennoch auf, in dem Fall jedoch zeitverzögert. Durch diese Vorgangsweise wird die subakute Toxizität ermittelt, da das Kompensationspotential des Organismus in Abhängigkeit der exponierten Dosis an Testsubstanz kontinuierlich erschöpft. Im Rahmen von Langzeituntersuchungen werden Effekte untersucht, welche unter der Wirkschwelle akuter Wirkungen liegen und eventuell sogar andere Wirkmechanismen aufweisen; weiters können die beeinflussten Endpunkte andere als bei Tests zur Ermittlung der akuten Toxizität sein. Solche Versuche werden als chronische Tests bezeichnet. (Holler et al., 1996:393)

Für Organismen bewegen sich die Wirkzeiträume für toxische Substanzen im Zeitraum von Stunden bis Wochen. Daher ist die Dauer, bis sich akute bzw. chronische Effekte bemerkbar machen, nicht absolut voraussagbar. Subchronische Versuche dauern jedenfalls kürzer als einen Lebenszyklus, während chronische Tests einen oder mehrere Reproduktionskreisläufe überspannen können. (Forbes & Forbes, 1994:23; Holler et al., 1996:369)

2.1.2.1 Akute Toxizität

Insbesondere in Hinblick auf die Untersuchung von aus umwelttechnischer Sicht relevanten Proben haben akute Toxizitätstests eine viel größere Bedeutung als chronische. Dies liegt an der hohen Menge an Proben einerseits und ihrer veränderlichen Zusammensetzung andererseits. Diese Gründe, in Kombination mit dem Bedarf, die Untersuchungen möglichst schnell und finanziell nicht zu belastend auszuführen, schließen Langzeittests für Umweltproben aus. Der Beweggrund für die Durchführung von akuten Toxizitätstests liegt in der ersten Einstufung der Wirkung einer Substanz. Bei Bedarf können anschließend weitere Versuche, auch Langzeittests angesetzt werden. Der Effekt, welcher beim Großteil der angewandten Toxizitätstests die zu untersuchende Wirkung darstellt, ist der Tod der Versuchsorganismen in Kombination mit der Einwirkzeit. Eine Ausnahme bildet hierbei der Daphnientest, da hier die Immobilisierung der Krebstiere im Vordergrund steht. (Holler et al., 1996:393)

Da die Wirkung von Substanzen auf Organismen unter realistischen Bedingungen nicht immer eindeutig ist, sondern von Nebenwirkungen und wechselseitigen Beeinflussungen abhängt, sind derartige Überlegungen in die Untersuchungen mit einzubeziehen. In der Literatur werden die Faktoren Kombinationswirkungen, Biokonzentration sowie unterschiedliche Wirkmechanismen genannt.

Kombinationswirkungen

Gerade bei der Analyse der Wirkung von Umweltproben auf Biota, welche immer ein Gemisch mehrerer Verbindungen darstellen, ist mit einer Beeinflussung der unterschiedlichen Substanzen untereinander zu rechnen. Selbst bei der Analyse einzelner Stoffe ist davon auszugehen, dass sie zu einem bestimmten Zeitpunkt mit Umweltmedien in Kontakt kommen werden. Die Kombination mehrerer Substanzen kann einen synergistischen oder aber einen antagonistischen Effekt hervorrufen. Welcher davon genau eintritt, ist jedoch schwer bis unmöglich zu prognostizieren, da die exakte Wirkung von der Stoffkombination und der vorliegenden Konzentration abhängt, so besteht die Möglichkeit, dass die Wirkung bei niedrigen Konzentrationen anders ist als bei höheren. Stoffe, deren hauptsächliche Wirkung in der Erschöpfung des Kompensationspotentials liegen, weisen in den meisten Fällen eine additive Zunahme des Effektes auf. In der Praxis darf dieses Verhalten für sämtliche weiteren Konzentrationsbereiche nicht ohne weitere Begründungen angenommen werden, da dies in einer linearen Konzentrations-Wirkungs-Beziehung resultieren würde; ein Muster, das oft in der Realität so nicht anzutreffen ist. Im Falle einer Risikobetrachtung wird diese Vorgehensweise für gemessene Konzentrationen an ähnlich bzw. unspezifisch wirkenden Verbindungen als gerechtfertigt angesehen. (Holler et al., 1996)

Biokonzentration und akute Wirkung

Einer der Hauptunterschiede zwischen klassischer Toxikologie und Ökotoxikologie liegt in der Art der Verabreichung der Substanzen. Während in der herkömmlichen Form die aufzunehmende Stoffmenge vom Körpergewicht abhängt und das Ziel in der Erstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung liegt, werden im Zuge von ökotoxikologischen Tests die Konzentrationen im Umgebungsmedium bzw. Futter der Organismen berücksichtigt. Auf diese Art und Weise wird sichergestellt, dass die erhaltenen Ergebnisse naturnaher und somit umweltrelevanter sind. Die Ermittlung der Wirksamkeit einer Dosis kann nur über die Bioakkumulation erfolgen.

Die Eigenschaft eines Stoffes, welche am meisten zu seiner Toxizität beiträgt, ist jene der Lipophilie: je höher die Lipophilie eines Stoffes ist, desto geringer ist die erforderliche Konzentration im Umgebungsmedium, um einen bestimmten Effekt hervorzurufen. Dies ist damit zu begründen, dass sich die Lipophilie proportional zum Biokonzentrationsfaktor BCF verhält. Dieser wird wie in Formel 1 gezeigt ausgedrückt.

$$BCF = \frac{C_{Organismus}}{C_{Medium}}, \quad (1)$$

wobei C die Konzentration eines Stoffes im Organismus bzw. im Umgebungsmedium bezeichnet. Das oben beschriebene Phänomen gilt jedoch nur solange sich Lipophilie und BCF linear zueinander verhalten, ausgedrückt wird diese Grenze durch einen maximalen P_{OW} von 6 bis 7. Der Ausdruck P_{OW} bezeichnet den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten eines Stoffes zwischen n-Octanol und Wasser, ist also ein Maß für dessen Lipo- bzw. Hydrophilie. Je höher er ist, desto eher löst sich eine Substanz in fetthaltigen Medien. Hat ein

Versuch das Ziel, die wirksame Dosis eines Stoffes nach Zugabe desselben in das Umgebungsmedium zu ermitteln, so wird das Konzept der lethal body burdens, LBB, empfohlen. Hierbei werden die Organismen einer hohen Dosis exponiert, bis der Tod eintritt. Anschließend erfolgt die Messung der Stoffkonzentration im Körper. Mithilfe dieses Verfahrens werden Informationen über Biokonzentration und letale Dosis erhalten, es ist jedoch mit einem hohen analytischen Aufwand verbunden. (Holler et al., 1996:342, 348, 394f.)

Mechanismen akuter Wirkungen

Der bei einem bestimmten Stoff eintretende Wirkmechanismus hängt zu einem großen Teil von der Dosis ab. Neben der Kenntnis des P_{OW} ist Information über die Struktur der Substanz wichtig, um Aussagen über den Wirkmechanismus treffen zu können. Diese Parameter lassen sich in quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungen, sogenannten QSARs zusammenfassen und graphisch darstellen. In einigen Fällen besteht die Möglichkeit, aus der Struktur eines Stoffes dessen Wirkmechanismus abzulesen. Somit lässt sich die Toxizität aus der in der entsprechenden QSAR-Geraden ermittelten Lipophilie in Erfahrung bringen. Dieses vereinfachte Verfahren funktioniert in der Praxis jedoch nur unzureichend, da einerseits eine Vielzahl an Wirkmechanismen weitestgehend unbekannt ist und andererseits niedrigere Konzentrationen in anderen Wirkungen resultieren können, als dies bei höheren Konzentrationen der Fall wäre. So gesehen eignen sich QSARs nur für eine erste Einschätzung der Toxizität eines Stoffes, für Stoffbewertungen sind sie zu unsicher, da hierfür Extrapolationen notwendig wären (Holler et al., 1996:395). Abbildung 3 zeigt ein beispielhaftes QSAR-Diagramm.

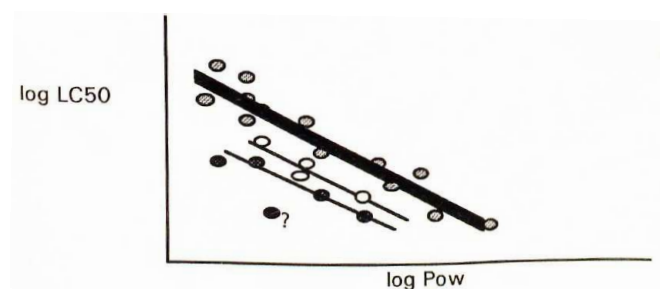


Abbildung 3: QSARs zur Toxizität gegenüber der Lipophilie. Dicker Balken: lipophile Narkotika. Dünne Linien: Korrelationen über Datenpunkte vermuteter spezieller Wirktypklassen (Holler et al., 1996:395)

Der Einsatz von QSARs als Vergleichswerkzeug für Substanzen bezüglich ihres LC_{50} -Wertes ist eine in der Wissenschaft gängige Methode, da auf einer Gerade nebeneinander liegende Stoffe in ihrer Toxizität ausschließlich vom P_{OW} abhängen. Da sie dieselben Wirkdosen aufweisen, liegt oft auch dieselbe Wirktypklasse vor, so beruht beispielsweise das Wirkungsmuster von Narkotika – einer Stoffgruppe die auf einer Kurve minimaler Toxizität liegt – auf unkontrollierten Zusammenbrüchen des Membranpotentials im Zentralnervensystem. Stoffe, welche sich auf einer Geraden unter jener der unspezifisch wirkenden Narkotika

befinden, weisen ein höheres Toxizitätspotential auf, daraus kann das Vorhandensein spezifischer Wirkmechanismen oder aktivierter Metabolite hindeuten. Hinweise auf reaktive Gruppen werden durch den Einfluss von Faktoren wie Reaktivitätskonstanten, sterischen oder topologischen Parametern auf die Korrelation gegeben. (Holler et al., 1996:396)

Bewertung der akuten Toxizität

Zur Bewertung der Toxizität eines Stoffes existiert kein universelles Klassifizierungssystem, da es einer wissenschaftlichen Basis zur Charakterisierung von Empfindlichkeiten entbehrt. Die aktuell gültigen Bewertungsschemata teilen die Toxizität einer Substanz jedoch gemäß Tabelle 1 ein. (Holler et al., 1996:396)

Tabelle 1: Bewertung der Toxizität (nach Holler et al., 1996:396)

EC₅₀/LC₅₀ [mg*L⁻¹]	Toxizität
10 – 100	Schwach bis mäßig toxisch
1 – 10	Toxisch
< 1	Hoch toxisch

Ein anderer Ansatz zur Bewertung der Toxizität einer Substanz wurde von Luckey & Venugopal im Jahre 1977 entwickelt. Die Grundlage bildet hierbei das Auftreten von LC-Werten über einen Bereich von einigen Zehnerpotenzen, woraus in Analogie zur Berechnung des pH-Wertes die Ermittlung des sogenannten pT₅₀-Wertes, also der potentiellen Toxizität erfolgt. Die Berechnung findet gemäß Formel 2 statt.

$$pT_{50} = -\log(LC_{50}) \quad (2)$$

In Tabelle 2 ist eine Einteilung toxischer Substanzen in Klassen entsprechend des zugehörigen pT₅₀-Wertes angegeben. (Fuhrmann, 2006:13)

Tabelle 2: Toxikologische Interpretation der pT₅₀-Klassen (Fuhrmann, 2006:13)

Klassen	pT₅₀	Mol/kg Körpergewicht LC₅₀ oral
Super toxisch	6	0,000 001
Extrem toxisch	5	0,000 001
Hoch toxisch	4	0,000 01
Mäßig toxisch	3	0,000 1
Gering toxisch	2	0,001
Praktisch nicht toxisch	1	0,1
Relativ harmlos	0	1
Harmlos	-1	10,0

2.1.2.2 Chronische Toxizität

Chronische Tests werden, anders als akute Tests, nur in realen Belastungsfällen, bzw. zur Simulation solcher Situationen durchgeführt. Dies hat mehrere Gründe: zum einen müssen die eingesetzten Konzentrationen an Testsubstanz weit unter der akuten Wirkschwelle liegen, dadurch kann sich eine regelmäßige Überprüfung der Konzentrationen als aufwendig herausstellen. Weiters hängt die Wirkung von einer Vielzahl an komplexen Vorgängen innerhalb des Organismus ab, um eine Aussage über die letztendlich für den beobachteten Effekt verantwortlichen Prozesse treffen zu können, ist eine Betrachtung tieferer Integrationsebenen unerlässlich. Der dritte in der Literatur genannte Grund für die schwierige Durchführbarkeit chronischer Toxizitätstests besteht in der hohen Empfindlichkeit der Endpunkte und der erforderlichen langen Zeitspanne bis eine Wirkung zu beobachten ist. Diese zwei Faktoren tragen dazu bei, dass der experimentelle Aufwand im Vergleich zu akuten Toxizitätstests deutlich größer ausfällt.

Chronische Tests können in zwei Formen durchgeführt werden: entweder wird das zu untersuchende Umweltmedium einer konstanten Belastung ausgesetzt, beispielsweise um eine Kontamination zu simulieren oder nur einmalig mit der Testsubstanz in Kontakt gebracht. Letztere Methode ist unter anderem geeignet, um die Auswirkung von Pflanzenschutzmitteln auf Bodenorganismen zu bewerten. Beiden Vorgangsweisen ist gemein, dass sie darauf ausgelegt sein sollen, möglichst empfindliche Endpunkte eindeutig Effekten und Konzentrationen zuzuordnen. Weiters wird von den Testergebnissen oft verlangt, dass sie eine Aussage über die Auswirkungen der Testsubstanz auf das gesamte Ökosystem ermöglichen. Dies wird erreicht, wenn die Endpunkte für die Population eines definierten Umweltmediums von Bedeutung sind. Schließlich resultieren chronische Tests in für verschiedene Endpunkte gültigen NOEC-Werten, welche Unterschiede im Rahmen von Größenordnungen aufweisen können. (Holler et al., 1996:397)

Reaktionen auf die Belastung

Chronischen Tests ausgesetzte Systeme versuchen – sobald die Lebensbedingungen untolerierbar beeinträchtigt wurden – den durch die Teststoffe hervorgerufenen physiologischen Stress zu kompensieren. Abhängig von der jeweiligen biologischen Ebene kann sich dies anders auswirken, so nehmen Organismen physiologische Änderungen vor, während in Populationen genetische Anpassung durch Selektion stattfindet. Abhängig von der genauen Definition der Endpunkte können diese Veränderungen als schlechte oder positive Entwicklung innerhalb des Ökosystems interpretiert werden.

Eine weitere Möglichkeit, wie sich Organismen in chronischen Tests verhalten können ist die Reaktion mit Regulationssystemen. Insbesondere bei niedrigen Dosen toxischer Substanzen kann es vorkommen, dass eine Erhöhung bestimmter physiologischer Leistungen eintritt.

Ebenso kann es vorkommen, dass sich biologische Systeme nach dem Einwirken eines Schadstoffes erholen und so den Ausgangszustand wiederherstellen. Die Erholungsfähigkeit hängt von Faktoren wie eingesetzter Dosis, Einwirkdauer und Wirkmechanismus ab.

Vermeidungsreaktionen sind besonders bei Organismen im Freiland zu beobachten, das heißt in Situationen, bei denen eine indirekte Belastung durch einen toxischen Stoff besteht. Da in Belastungsexperimenten diese Möglichkeit nicht gegeben ist, kann ein dennoch derartiges Verhalten einen Hinweis auf biozönotische Konsequenzen geben. (Holler et al., 1996:398)

2.1.2.3 Genotoxizität

Im Vergleich mit Tests an Organismen oder ihrer Teilsysteme stellen Genotoxizitätstests eine Sonderform dar. In der Literatur werden hierfür drei Gründe genannt:

- Sobald Erfahrungen über den Effekt eines Stoffes auf Nucleinsäuren festgestellt und quantifiziert werden können, lassen sich diese auf sämtliche Zellen aller Organismen übertragen. Die Begründung dafür liegt im einheitlichen Aufbau des genetischen Codes.

Ausgenommen hiervon sind die komplex ausgebildeten Reparatur- und Kompensationsprozesse, wozu auch die Vervielfachung des Chromosomensatzes zählt. Daher liegt bei Genotoxizitätstests vor allem der Nachweis von Mutationen im Fokus, meist werden hierfür Einzeller oder Zellkulturen herangezogen.

Im Unterschied zu Proteinen bieten Nucleinsäuren für äußere Einflüsse nur vergleichsweise wenig spezifische Möglichkeiten, diese sind jedoch breit gefächert. Eine der Konsequenzen von genotoxischen Wirkungen liegt in der Störung des in den Nucleinsäuren hinterlegten Informationsgehaltes. Welche Informationsinhalte im jeweiligen Fall betroffen ist, kann nicht prognostiziert werden, daher kann keine Aussage über die direkte Auswirkung im Organismus gemacht werden. (Holler et al., 1996:399)

- Genotoxisch wirkende Substanzen äußern sich in Mutationen der betroffenen Zellen, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Eintretens einer Veränderung erhöht wird. Im Vergleich mit natürlich auftretenden Mutationsraten lassen sich Beobachtungen bezüglich dieser Eintretenswahrscheinlichkeiten von einem auf andere Merkmale eines gegebenen Systems anwenden.

Mutagene Wirkmechanismen formen sich je nach betroffener Zelllinie anders aus, abhängig vom Wirkort können erbutverändernde, teratogene und cancerogene Effekte beobachtet werden.

Nichtsdestotrotz müssen genotoxische Substanzen nicht immer dieselbe Wirkung auf ein lebendes System aufweisen. In Abhängigkeit zahlreicher Faktoren wie der Lebensweise und dem Entwicklungszustand eines Organismus, aber auch dem Aufenthaltsort der Zellen liegen teilweise sehr voneinander unterschiedliche kinetische Prozesse vor. Dadurch wird die Dosis und damit die einhergehende Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines Effektes am Wirkort direkt beeinflusst.

Weiters haben einzelne Organismen variierende Reparatur- und Kompensationsmechanismen inne. Bakteriologische Genotoxizitätstests werden aus diesem Grund nur für erste Abschätzung des Toxizitätspotentials einer Substanz herangezogen und bei Bedarf durch Versuche an höheren Organismen wie Säugetieren ergänzt.

Ein weiterer Aspekt bei der Betrachtung genotoxisch wirkender Substanzen liegt in ihrer chronischen und stochastischen Eigenschaft. Werden Zellen über einen kurzen Zeitraum hohen Dosen einer toxischen Verbindung ausgesetzt, so können die dadurch hervorgerufenen Zellschäden den Tod derselben hervorrufen. In anderen Fällen kann es jedoch auch zu einer kurzfristigen Erholung kommen, hierbei wird die Wirkung des Stoffes frühestens in der nächsten Zellgeneration innerhalb der DNA verankert. Ab diesem Zeitpunkt ist die Möglichkeit einer Reparatur nicht mehr gegeben, woraus selbst von einer Einzelwirkung eine tödliche Gefährdung ausgehen kann. Die Stelle der Hinterlegung der Fremdwirkung bildet einen Angriffspunkt für weitere Zellgifte, während das cytotoxische Immunsystem nicht mehr ordnungsgemäß arbeitende Zellen entfernt. (Holler et al., 1996:399f.)

- Für genotoxische Substanzen existiert kein Schwellenwert, ihre Wirkungen sind nicht durch Dosis-Wirkungs-Beziehungen darstellbar.

Je weiter der Zeitpunkt des Einwirkens einer genotoxischen Substanz auf ein lebendes System zurückliegt, desto geringer ist der Einfluss der Konzentration des Stoffes; vielmehr haben die den Organismus betreffende Verhaltensweisen Anteil am Eintreten einer Wirkung. In Populationen ist das Eintreten von mutagenen, erbgutverändernden oder cancerogenen vor allem auf einzelne Individuen beschränkt, wodurch sich eine Vergrößerung des Genpools ergibt. In konstanten Umweltverhältnissen hat dies keinen nennenswerten Effekt, da in einem solchen Fall für einen Fortbestand der Kultur untaugliche Mutanten beseitigt werden. Sobald andere Umweltbedingungen vorliegen, kann verändertes Erbgut jedoch Vorteile bieten, ein Beispiel dafür ist Vorhandensein eines Mangels an Ressourcen, wobei sich sogenannte K-Strategen durchsetzen. Diese sind auf das Überleben in Substratarmen Umgebungen spezialisiert, weisen gleichzeitig allerdings eine geringere Wachstumsrate auf. Solche Fälle treten jedoch in der Natur eher selten auf. (Bakke 2016; Holler et al., 1996:400)

2.2 Wirkungsweise toxischer Substanzen

Bei genauerer Auseinandersetzung mit den Wirkmechanismen von toxischen Substanzen lassen sich drei Phasen unterscheiden: im Rahmen der Expositionsphase erfolgt die Aufnahme der fraglichen Stoffe in den Körper des Organismus, in der darauffolgenden toxikokinetischen Phase findet der Transport der Stoffe zum Wirkort innerhalb des Organismus statt. Hierbei wird zwischen Invasion und Evasion unterschieden, auf diese Begriffe wird im folgenden noch näher eingegangen. Die eigentliche Reaktion des

Schadstoffes mit einem Rezeptor am Wirkort wird als toxikodynamische Reaktion bezeichnet. In Abbildung 4 ist die Wechselwirkungen von Schadstoffen mit einem Organismus schematisch wiedergegeben. (Fuhrmann, 2006:18)

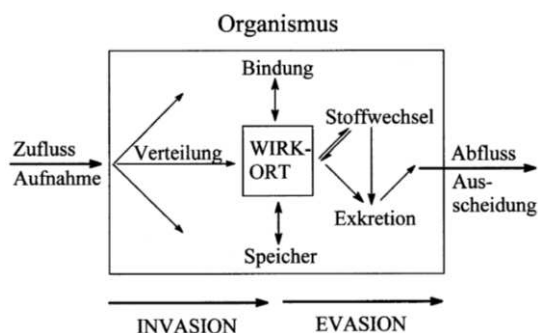


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise eines Schadstoffes auf den Wirkort innerhalb eines Organismus (Fuhrmann, 2006:18)

2.2.1 Expositionsphase

Die Expositionsphase ist durch die Bewegung eines Stoffes durch die umgebende Matrix hin zu den für die Resorption ausgelegten Flächen eines Organismus charakterisiert. Ausschlaggebend für die Qualität der Aufnahme sind neben Faktoren wie Zeit und Temperatur auch die biologische Beschaffenheit der Resorptionsflächen. (Fuhrmann, 2006:18)

Bei der Betrachtung von Wirbeltieren sind die wichtigsten Aufnahmeschnittstellen der Magen-Darm-Trakt für feste wie flüssige Nahrung sowie die Lunge für die Respiration. Beide Organe zeichnen sich durch verhältnismäßig große innere Oberflächen aus und sind daher besonders anfällig für toxische Stoffe. Obgleich die Haut den Körper fast vollständig bedeckt, ist ihre Oberfläche im Vergleich mit den zuvor genannten inneren Organen eher als gering anzusehen. Sie wird durch eine Hornschicht durch äußere Einflüsse geschützt, welche sich neben der Dicke durch die geringe Permeabilität auszeichnet. Die Haut bietet daher nur an verletzten oder sehr dünnen Stellen einen ernstzunehmenden Angriffspunkt für Schadstoffe. Der aus Sicht insbesondere lipophiler Fremdstoffe einfachste Weg, in den Körper einzudringen, führt über die Schleimhäute, diese verfügen nicht über eine Schutzschicht, welche mit jener der Hornschicht vergleichbar wäre. (Fuhrmann, 2006:19ff.)

2.2.2 Toxikokinetische Phase

Invasion

In Bezug auf die Distribution eines aufgenommenen Schadstoffes im Körper, die sogenannte Invasion, sind bei den zu untersuchenden Organismen die möglichen Verteilungsräume zu berücksichtigen. Im Hinblick auf Wirbeltiere wird zwischen drei Kompartimenten unterschieden (Fuhrmann, 2006:36):

- Der intravasale Raum bezeichnet das gesamte von Blut ausgefüllte Volumen des Körpers, hierzu zählen neben dem Blutplasma auch die Zellräume. Die Wände der Blutgefäße stellen die Abgrenzung zum anschließenden Kompartiment dar.
- Der interstitielle Raum erstreckt sich zwischen den Außenwänden der Blutgefäße und den Membranen der Körperzellen.
- Der intrazelluläre Raum bildet das von den einzelnen Zellen umschlossene Volumen.

Sobald ein Schadstoff aufgenommen wurde, sei es über das Respirationssystem, den Verdauungstrakt oder die Schleimhäute, stellt das Blut das am meisten zu berücksichtigende Transportmedium innerhalb des Körpers dar. Über dieses gelangt ein Stoff in sämtliche Bereiche des Organismus und gelangt rasch zu seinem Wirkort. (Fuhrmann, 2006:38)

Evasion

Sobald ein toxischer Stoff Eingang in das organische System gefunden hat, greifen Mechanismen zur Evasion desselben, das heißt der Organismus versucht potentielle Schädigungen möglichst gering zu halten. Dieses Ziel kann durch zweierlei Maßnahmen erreicht werden: entweder durch Bindung und Speicherung des Stoffes, wodurch seine Immobilisierung bewirkt wird, oder durch Umwandlung durch den Stoffwechsel mit anschließender Exkretion.

In der Literatur werden die folgenden Regeln für die Bindung von Substanzen genannt:

- „1. Die immobilisierten Substanzen verursachen keine toxischen Wirkungen – die toxisch wirksamen Konzentrationen sind im allgemeinen die freien Konzentrationen.*
- 2. Die immobilisierten Formen können nicht von Enzymen umgesetzt werden und sind somit dem Stoffwechsel entzogen.*
- 3. Die Bindung und Speicherung verursacht bei fortgesetzter Exposition eine Kumulation im Organismus und verhindert damit eine wirksame Ausscheidung aus dem Körper über die Nieren oder mit den Exkrementen.“*
(Fuhrmann, 2006:57)

Die Bindung einer Substanz hängt maßgeblich von der Kapazität der infrage kommenden Bindungsstellen ab, weiters sind die Konzentration an Schadstoff im Organismus sowie die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit dem Speicher aufgrund eventuell vorhandener physikalisch-chemischer Gemeinsamkeiten zu berücksichtigen.

Die Bindung der meisten toxischen Substanzen erfolgt an Proteinen. Der Vorteil an dieser Bindungsform liegt darin, dass die Adsorption über einen weiten Konzentrationsbereich mit den in Lösung befindlichen Stoffbestandteilen erfolgen kann. Voraussetzung ist in dem Fall das Vorhandensein freier Bindungsstellen. So gesehen lassen sich Proteine als Puffersubstanzen interpretieren. Lipophile Substanzen werden hingegen vorwiegend im

Fettgewebe angereichert, ein Verhalten, das bevorzugt bei Mikroorganismen beobachtet wird. Dadurch erfolgt eine Anreicherung derart beschaffener Stoffe in der Nahrungskette. (Fuhrmann, 2006:58)

In einigen Fällen ist keine Bindung oder Speicherung von Schadstoffen feststellbar, sondern eine Anreicherung an wirkungsspezifischen Stellen. So ist beispielsweise eine Erhöhung der Konzentration von Cadmium in den Nieren oder für HCN an elektronentransportierenden Cytochromen feststellbar. (Fuhrmann, 2006:57)

Die zweite Möglichkeit der Evasion von Schadstoffen ist jene der Biotransformation. Dieser Mechanismus ist jedoch vor allem für lipophile Stoffe gültig, da diese, wie oben beschrieben, bevorzugt im Fettgewebe angereichert werden. Für die Ausscheidung aus dem Organismus ist daher die Erreichung des wasserlöslichen Zustandes notwendig.

Die Biotransformation von Schadstoffen findet im endoplasmatischen Retikulum des Organismus statt und resultiert in der Überführung in eine wasserlösliche Form. Für die Umwandlung sind grundlegende chemische Prozesse wie Oxidation, Reduktion, Hydrolyse und Konjugation verantwortlich, welche sich in zwei Phasen unterscheiden lassen. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung der Biotransformation.

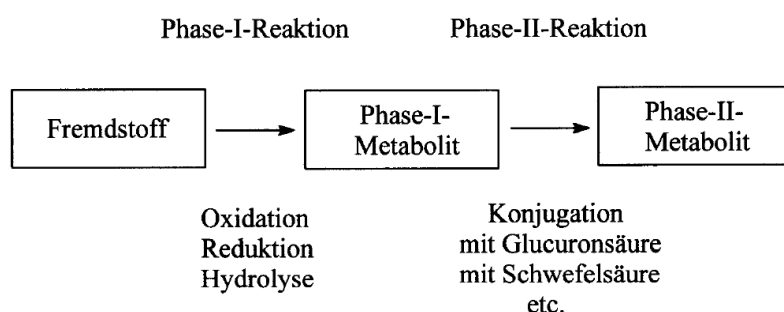


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Vorgänge während der Biotransformation (Fuhrmann, 2006:65)

Phase I übernimmt eine vorbereitende Funktion durch, je nach Beschaffenheit des Schadstoffes, die Entfernung bzw. Addition funktioneller Gruppen; diese können sowohl nukleophil als auch elektrophil sein. Phase II besteht in der Konjugation der mit funktionellen Gruppen versehenen Substanzen mit wasserlöslichen Substraten, wodurch sie in eine vom Körper ausscheidbare Form überführt werden.

Nachdem Stoffe im ersten Schritt der Biotransformation mit kopplungsfähigen Gruppen ausgestattet wurden, werden sie im zweiten Teil mit körpereigenen Substanzen verbunden. Im Allgemeinen sind dies zur Ausscheidung vorgesehene Verbindungen; die Kombination erfolgt durch auf solche Fälle spezialisierte Enzyme, sogenannte Transferasen. Weiters weisen die stattfindenden Vorgänge den Charakter einer Inaktivierung der Schadstoffe auf, da die konjugierten Verbindungen biologisch passiv sind. In einigen Fällen, in der Literatur wird die Einspeisung von biotransformierten Substanzen aus der Galle in den Darm

genannt, kann es zu einem enterohepatischen Kreislauf kommen. Hierunter versteht man die Entfernung des zuvor addierten Wirkstoffes durch Mikroorganismen, wodurch die Möglichkeit einer erneuten Aufnahme der toxischen Verbindung gegeben ist. (Fuhrmann, 2006:80)

Abgesehen von der Ausscheidung wasserlöslicher Verbindungen über die Nieren und mittels der Galle in den Verdauungstrakt kann der betroffene Stoff über andere Organe des Körpers ausgeschieden werden. Hierfür kommen vor allem die Lunge und die Haut infrage, wobei die Schadstoffabgabe über die Haut wiederum einer eher untergeordnete Rolle spielt. Für Gase ist der Austausch über die Lunge relevant, in dieser Beziehung ist der Konzentrationsgradient zwischen Blut und umgebender Luft von Bedeutung. (Fuhrmann, 2006:87, 94)

2.2.3 Toxikodynamische Phase

Um eine Wirkung zu erzielen, ist es notwendig, dass sich ein Stoff mit einem Rezeptor verbindet, diese sind in den meisten Fällen Proteine, deren Substratbindungsstelle analog zu einem Schlüssel-Schloss-Modell an die physikalische Beschaffenheit des zu verbindenden Moleküls ist. Neben der geometrischen Analogie muss auch die elektronische Übereinstimmung gegeben sein. Dies wird durch Anordnung der relevanten funktionellen Gruppen in der notwendigen Konstellation bewerkstelligt. (Fuhrmann, 2006:108)

Die Wirkung eines Schadstoffes auf ein biologisches System ist proportional zur eingesetzten Konzentration. Dieser Zusammenhang wurde durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben, in welchem die durch den Fremdstoff induzierte Wirkung als reversible Reaktion zwischen Rezeptor und adsorbiertem Molekül angesehen wird. Letztendlich lässt sich das Massenwirkungsgesetz in Bezug auf die Wirkung von toxischen Substanzen als Besetzungstheorie ausformulieren, wie es 1920 von Clark dargelegt wurde. (Fuhrmann, 2006:117)

Die in dieser Theorie festgehaltenen wesentlichen Punkte lassen sich wie folgt zusammenfassen (Fuhrmann, 2006:119):

1. Der vom Schadstoff hervorgerufene Effekt verhält sich proportional der Besetzung des Rezeptors; dieses Modell wird als „occupancy assumption“ bezeichnet,
2. Für jeden chemischen Bestandteil der toxischen Verbindung ist die Reaktion mit jeweils einem Molekül des Rezeptors vorgesehen,
3. Die am Rezeptor gebundene Konzentration des Wirkstoffes ist gegenüber der freien Konzentration als vernachlässigbar gering anzusehen. Daher kann die noch für Reaktionen zur Verfügung stehende Konzentration als die Gesamtwirkstoffkonzentration interpretiert werden.

Um Aussagen über das Toxizitätspotential von Metallionen, insbesondere von Kalium und Natrium treffen zu können, wird zunächst auf die physiologischen Bedingungen einer Zelle eingegangen. Für eine ordnungsgemäße Funktion der Zellen eines Organismus ist es erforderlich, die in Abbildung 6 gezeigten Konzentrationen relevanter Ionen und weiterer Verbindungen aufrecht zu erhalten.

	EXTRACELLULAR FLUID	INTRACELLULAR FLUID
Na ⁺	142 mEq/L	10 mEq/L
K ⁺	4 mEq/L	140 mEq/L
Ca ⁺⁺	5 mEq/L	<1 mEq/L
Mg ⁺⁺	3 mEq/L	58 mEq/L
Cl ⁻	103 mEq/L	4 mEq/L
HCO ₃ ⁻	28 mEq/L	10 mEq/L
Phosphates	4 mEq/L	75 mEq/L
SO ₄ ⁻	1 mEq/L	2 mEq/L
Glucose	90 mgm.%	0 to 20 mgm.%
Amino acids	30 mgm.%	200 mgm.?
Cholesterol		
Phospholipids	0.5 gm.%	2 to 95 gm.%
Neutral fat		
PO ₂	35 mm.Hg	20 mm.Hg ?
PCO ₂	46 mm.Hg	50 mm.Hg ?
pH	7.4	7.0
Proteins	2 gm.% (5 mEq./l.)	16 gm.% (40 mEq./l.)

Abbildung 6: Chemische Zusammensetzung der extra- und intrazellulären Flüssigkeiten (Guyton, 1981:41)

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Konzentration von Natrium außerhalb der Zelle einen hohen Wert aufweist, während im Inneren der Zelle das Ion kaum vertreten ist. Im Fall von Kalium ist das Gegenteil festzustellen. Der Austausch chemischer Stoffe zwischen diesen beiden Medien findet mithilfe zweier Verfahren statt: Diffusion durch freie Bewegung der Substanzen sowie aktiver Transport durch Mitwirkung chemisch beeinflusster sogenannter Trägerstoffe. Deren Funktion besteht darin, den Konzentrationsgradienten zwischen den Medien in entgegengesetzter Richtung zu überwinden. (Guyton, 1981:41). Das Prinzip der Diffusion ermöglicht den Transfer von Kalium- bzw. Natriumionen durch die Zellmembran. Obgleich die physische Beschaffenheit der Ionen nur den Transfer geringer Konzentrationen gestattet, besteht die langfristige Folge, dass aufgrund physikalischer Gesetzmäßigkeiten ein Gleichgewicht hergestellt würde. Um einem Ausgleich zwischen dem inneren und äußeren Zellraum entgegen zu wirken und die Einhaltung der in Abbildung 6 dargestellten Konzentrationen sicherzustellen, existiert ein aktiver Transportmechanismus, welcher unter dem Begriff der Natrium-Kalium-Pumpe bekannt ist. Hierbei handelt es sich um eine Verbindung aus zwei Proteinmolekülen, welche dazu in der Lage sind, den Energieträger ATP zu spalten. Die hierdurch freiwerdende Energie wird zum Transport der Natriumionen aus der Zelle eingesetzt, während Kaliumionen im Gegenzug in das Innere der Zelle aufgenommen werden (Guyton, 1981:52). Das Prinzip der Funktionsweise der Natrium-Kalium-Pumpe ist in Abbildung dargestellt.

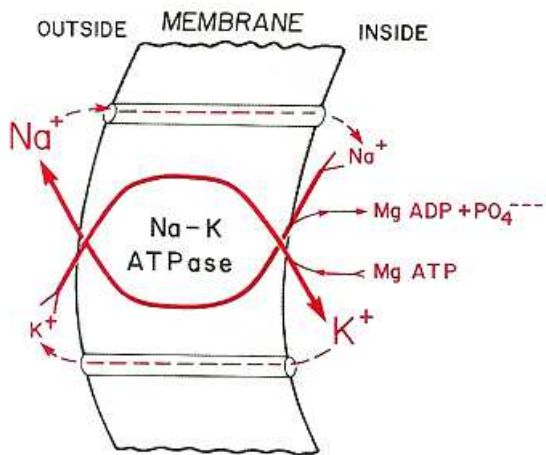


Abbildung 7: Schematische Darstellung des aktiven Transportes von Natrium und Kalium durch die Zellmembran (Guyton, 1981:52)

2.3 Ökotoxikologische Tests

Die ökotoxikologischen Tests lassen sich sowohl nach der Expositionsdauer als auch nach dem observierten Effekt unterscheiden. Während einige Versuche die letale Wirkung eines Analyten auf den Testorganismus zum Kriterium haben, steht bei anderen das Eintreten eines bestimmten Effekts im Vordergrund. Meist bezieht sich der EC-Wert auf die Hemmung des Wachstums der untersuchten Individuen. Das in Abbildung gezeigte Schema gibt einen Überblick über Medien, in denen Toxizitätstests vorgenommen werden können sowie zum Einsatz kommende Versuchsorganismen.

Sämtliche Versuche, welche in der Übersicht gezeigt, bzw. auf den nächsten Seiten skizziert werden, haben nur die Untersuchung bestimmter Wirkungen an jeweils einer Spezies zum Ziel. Forbes & Forbes (1994) stellen fest, dass derartige Tests einzig aufgrund ihrer langjährigen Vorherrschaft in der Bewertung toxischer Potentiale und der einfachen Durchführbarkeit sowie anschließenden Interpretierbarkeit Anwendung finden. Von zahlreichen Positionen in der Wissenschaft wird jedoch der Standpunkt vertreten, die Ergebnisse solcher Tests seien nicht aussagekräftig genug, da mit ihnen keine Möglichkeit besteht, den Einfluss einer Substanz außerhalb des untersuchten biologischen Systems zu beziffern.

Werden mindestens zwei Spezies in einem Versuch herangezogen, so finden zusätzlich zu direkten durch die Testsubstanz hervorgerufenen Auswirkungen auch Wechselwirkungen zwischen den Organismen statt, welche als indirekte Reaktionen auf den Schadstoff interpretiert werden können. Die in so einem Multispezies test eingesetzten Individuen können sowohl aus derselben trophischen Ebene stammen, als auch verschiedenen Teilen der Nahrungskette zuordenbar sein. Sind hingegen Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von Substanzen auf intakte Ökosysteme, welche durch die Simulation kritischer Vorgänge erreicht werden sollen, gefragt, bieten sich Tests an Teilen von oder ganzen Ökosystemen an. Hierzu existieren Versuche in einer Vielzahl an Größenordnungen – vom Labormaßstab über großzügig dimensionierte Tanks bis hin zu abgegrenzten Gebieten im Feld. Forbes & Forbes (1994) unterscheiden zwischen Versuchen an ökologischen Gemeinschaften – das heißt Biozönosen – und an Ökosystemen, wobei erstere die Untersuchung biologischer Auswirkungen zum Ziel haben, während letztere für die Ermittlung des Schicksals sowie der Effekte von Schadstoffen ausgelegt sind.

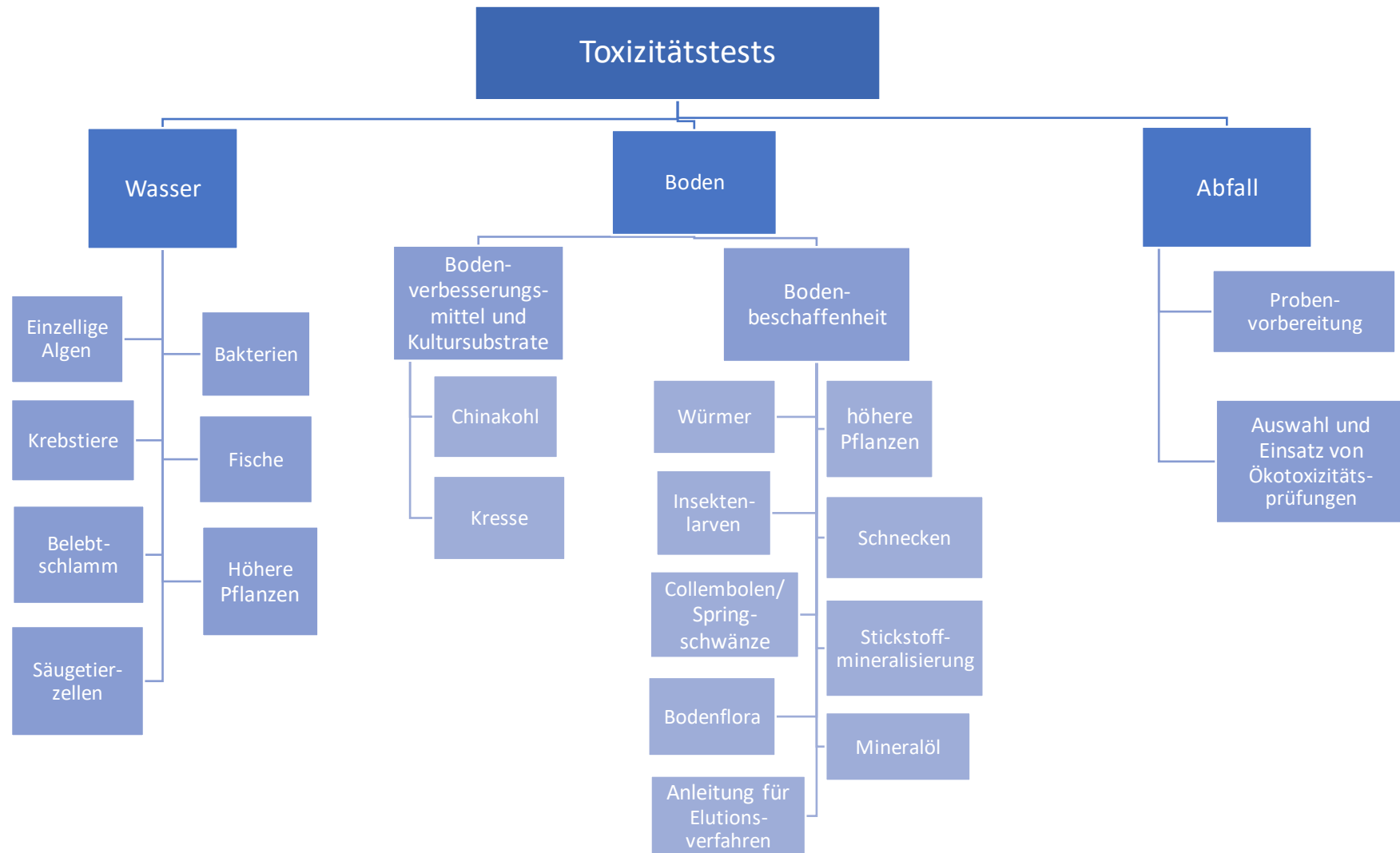


Abbildung 8: Übersicht über derzeit aktuelle Toxizitätstests

2.3.1 Tests zur Ermittlung der Toxizität von Wasserproben

Toxikologische Tests, welche die Untersuchung der Einflüsse von Substanzen auf das Medium Wasser zum Ziel haben, gehören zu den Methoden mit der längsten Erfahrung in der Entwicklung. Dafür werden in der Literatur zwei Hauptgründe genannt: In Wasser eingebrachte Verbindungen verteilen sich homogen, das Verhalten kann unkompliziert prognostiziert werden. Dasselbe gilt für den Ablauf der Aufnahme von Stoffen in Wasserorganismen. Aus diesem Grund sind Ergebnisse aquatischer Tests verhältnismäßig gut reproduzierbar. Der zweite Aspekt liegt in der menschlichen Notwendigkeit am Gut Wasser. Da es einen wichtigen Rohstoff in der Versorgung des Menschen darstellt, wurde in der Vergangenheit bei Wasser am meisten auf das Erreichen und Erhalten hoher Qualität geachtet. Betrachtet man die globale Verteilung der Weltbevölkerung, so erkennt man, dass 70 % der Menschen innerhalb eines 60 km großen Radius um ozeanische Küsten leben. Weiters liegen 43 der 50 weltgrößten Städte an einem Mündungsgebiet, bzw. entlang eines Flusses unweit eines Deltas. Einhergehend mit der hohen wirtschaftlichen und industriellen Bedeutung solcher geographischer Gegebenheiten ist naturgemäß eine hohe Belastung an Schadstoffen wie Schwermetalle oder organischer Komponenten nachweisbar. Heute werden Organismen aus sämtlichen trophischen Regionen eines Wasserkörpers für die Ermittlung der Toxizität von Oberflächenwasser, Abwasser sowie einzelner Chemikalien herangezogen. (Forbes & Forbes, 1994:9; Holler et al., 1996:385)

In Übereinstimmung mit dem Stoffkreislauf lassen sich Organismen nach ihrer Funktion in Produzenten, Primärkonsumenten, Konsumenten höherer Ordnung sowie Destruenten einteilen.

Steht neben der Wirkung einer zu testenden Substanz auf das Wachstum des Versuchsorganismus der Effekt auf die Primärproduktion im Vordergrund der Untersuchung, so bieten sich Versuche an Produzenten an. Diese sind meistens Algen, wobei sowohl einzellige als auch mehrzellige zum Einsatz kommen. Der Vorteil besteht in der einfachen Handhabung der Organismen und der hohen Standardisierbarkeit. Weiters besteht die Möglichkeit, Produzenten als Nahrungsmittel für Vertreter der Primärkonsumenten einzusetzen. (Holler et al., 1996:385)

Primärkonsumenten, welche zum Einsatz für Toxizitätstests kommen, sind Krebstiere wie Daphnien oder Amphipoden. Besonders im Hinblick auf die Untersuchung von Insektiziden, Acariziden oder Schwermetallen sind diese Organismen geeignet, da sie empfindlich auf die genannten Stoffe reagieren. Das wird insbesondere durch den hohen Durchsatz an Umgebungswasser erklärt, welcher für die ordnungsgemäße Funktion als Filtrierer unabdingbar ist. Die Besonderheit der Spezies *Daphnia magna* für den Einsatz in Toxizitätstests liegt in der einfachen Zuchtmöglichkeit und hohen Reproduzierbarkeit der Testergebnisse. Dies liegt in der Natur des Fortpflanzungszyklus dieses Krebstiers: die Testbedingungen werden derart eingestellt, sodass die Ausbildung von Nachkommen ausschließlich nach dem parthogenetischen Kreislauf erfolgt. Somit werden nur weibliche Individuen mit dem selben Erbgut erhalten. (Holler et al., 1996:385f.)

Im Stoffkreislauf folgen auf Primärkonsumenten solche höherer Ordnung. In aquatischen Systemen sind dies vorrangig Fische. Aus zwei Gründen sind Ergebnisse, die durch Tests an Fischen erhalten wurden, von hoher Aussagekraft. Durch ihre Eigenschaft als höhere Konsumenten befinden sie sich gegen Ende der Nahrungskette, wodurch im Umlauf befindliche Substanzen im Organismus konzentriert werden. Für den Menschen sind auf Fischen basierende Tests interessant, da sie einerseits ebenfalls Wirbeltiere sind und andererseits als Nahrungsmittel für ihn dienen. So gesehen stellen Fische, bedingt durch das Phänomen der Biomagnifikation, die Hauptquelle von in Wasser befindlichen Schadstoffen für den Mensch dar. Weltweit kommen unterschiedliche Arten an Fischen in Toxizitätstests zur Verwendung. In Tabelle 3 ist eine Übersicht über in verschiedenen Ländern eingesetzte Fischspezies gegeben.

Tabelle 3: Übersicht über ehemals und derzeit eingesetzte Fischarten (Holler et al., 1996:386)

Einsatzgebiet	Spezies
Angelsächsischer Raum	Regenbogenforelle Oncorhynchus mykiss
Nordamerika	Dickkopfelritze Pimephales promelas
Osteuropa (veraltet)	Karpfen Cyprinus carpio
Österreich	Regenbogenforelle Salmo gairdneri Richardson
EU (lt. ISO)	Zebrabärbling Brachydanio rerio

Insbesondere für Tests mit dem Zebrabärbling sprechen mehrere Eigenschaften: neben seiner unkomplizierten Haltbarkeit ist er für flexible Testkonzepte in Hinblick auf Dauer und Komplexität geeignet. Seine täglich gelegten Eier lassen sich ebenfalls für Tests heranziehen. Dies macht den Fisch zu einem Organismus, mit dem Daten hoher Vergleichbarkeit generiert werden können. (Holler et al., 1996:386)

Zu der Gruppe der Destruenten zählen Bakterien wie jene der Gattung Pseudomonas. Da Bakterien in einer Vielzahl natürlicher aquatischer Ökosysteme vorkommen, eignen sie sich gut für Toxizitätstests. Bei diesen Versuchen werden, im Gegensatz zu den zuvor erwähnten, nicht einzelne Organismen der Probe ausgesetzt, sondern der Einfluss auf gesamte Populationen festgestellt. Die Änderung des Verhaltens der Populationen gilt als Indikator für nicht exakt definierte, durch Chemikalien hervorgerufene Belastung der Bakterien. Inzwischen wurden die Arbeitsschritte bei der Durchführung der Tests soweit

entwickelt, dass eine vollständig automatisierte Untersuchung realisiert werden kann. Dies erhöht die Einsatzmöglichkeit, birgt aber auch die Gefahr der Überinterpretation der Ergebnisse. (Holler et al., 1996:387)

Bezeichnung	Titel
DIN 38412-33: 1991-03	Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L); Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (L 33)
DIN 38412-37: 1999-04	Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) - Teil 37: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf das Wachstum von Bakterien (Photobacterium phosphoreum; Zellvermehrungs-Hemmtest) (L 37)
ÖNORM EN ISO 6341: 2013 05 15	Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) – Akuter Toxizitäts-Test
ÖNORM M 6263-1: 1987 11 01	Testverfahren mit Wasserorganismen; Bestimmung der akuten Toxizität von Wasserinhaltsstoffen gegenüber Salmo gairdneri Richardson (Regenbogenforelle); statischer Test
ÖNORM M 6263-2: 1987 11 01	Testverfahren mit Wasserorganismen; Bestimmung der akuten Toxizität von Wasserinhaltsstoffen gegenüber Salmo gairdneri Richardson (Regenbogenforelle); semistatischer Test
ÖNORM EN ISO 8192: 2007 06 01	Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Belebtschlamm nach Kohlenstoff- und Ammonium-Oxidation
ÖNORM EN ISO 9509: 2006 11 01	Wasserbeschaffenheit – Toxizitätstest zur Bestimmung der Nitrifikationshemmung in Belebtschlamm

Tabelle 4: Übersicht über Normen zur Toxizitätsbestimmung von Wasserproben (vgl. AAEV, 1996: Anlage C)

Vom österreichischen Normungsinstitut wurden seit 1987 zahlreiche Einheitsverfahren herausgegeben, welche sich mit der Beurteilung der Toxizität von Wasserproben befassen. In den folgenden Absätzen werden die grundlegenden Prinzipien der relevanten Toxizitätstests, welche für Wasserproben sowie in Wasser lösliche Substanzen erarbeitet wurden, erläutert sowie der Inhalt der einzelnen Normen umrissen.

Die meisten Verfahren arbeiten nach der gleichen Methode bestehend aus Vor- und Haupttest. Der Vortest dient zur Feststellung des Konzentrationsbereiches an dem fraglichen Analyten. Hierbei wird die kleinstmögliche Konzentration ermittelt, bei welcher der gewünschte Effekt eintritt, sowie die größte Konzentration, bei der keine Wirkung auf die Testorganismen beobachtet wird.

In dem durch den Vortest bestimmten Konzentrationsbereich findet anschließend der Haupttest statt. Dieser ist in den meisten Fällen so aufgebaut, dass eine definierte Anzahl an Testorganismen unterschiedlich hohen Konzentrationen des Testmediums ausgesetzt wird. Als Kontrolle dient Verdünnungswasser. In diesem darf bei keinem der Individuen der von der Probe erwartete Effekt eintreten.

In Anlage C Abs. 8 der allgemeinen Abwasseremissionsverordnung (AAEV) BGBl. Nr. 186/1996 werden Analysemethoden zur Bestimmung unterschiedlicher Parameter in Abwasser genannt. Um den Parameter 2, Toxizität, zu bewerten, werden mehrere Normen genannt. Diese sehen Tests an Algen, Bakterien, Daphnien sowie Fischen vor, weiters stellt die Bewertung der Beeinträchtigung biologischer Abbauvorgänge ebenfalls einen Gegenstand der Verordnung dar. In Tabelle 4 sind die im Gesetzestext angeführten Bestimmungsmethoden angegeben.

Die wesentlichsten Punkte werden in Folge zusammenfassend beschrieben.

DIN 38412-33: 1991 03 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L); Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (L 33) (DIN, 1991)

Das in dieser Norm beschriebene Verfahren hat nicht die direkte Bestimmung der Toxizität einer Abwasserprobe zum Ziel, sondern trifft indirekt eine Aussage über diese. Von Interesse ist jene Verdünnung der Probe, bei der keine giftige Wirkung zu beobachten ist.

Nach einer Expositionszeit von 72 h erfolgt ein Vergleich der Produktion an Algenbiomasse in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Abwassers mit jenem in einem Kontrollansatz. Die Gegenüberstellung zeigt die Hemmwirkung des Abwassers gegenüber dem Algenwachstum auf, wodurch die gerade noch ungiftige Verdünnungsstufe bestimmt wird.

Die Zunahme der Biomasse wird durch die gemessene Chlorophyll-Fluoreszenz bei einer definierten Wellenlänge bestimmt. (DIN, 1991)

DIN 38412-37: 1999 04 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L); Teil 37: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf das Wachstum von Bakterien (*Photobacterium phosphoreum* — Zellvermehrungs-Hemmtest) (L 37) (DIN, 1999)

Ähnlich wie der unten beschriebene Zellvermehrungshemmtest nach ÖNORM EN ISO 10712 basiert auch dieses Verfahren auf einer Trübungsmessung. Testbakterien der Spezies *Photobacterium phosphoreum* werden in Gefäßen mit unterschiedlichen Verdünnungen des Testgutes kultiviert. Die in einem Zeitraum von 7 h eintretende chronische Wirkung auf die Bakterien ist von Interesse. Der Vergleich des Zellwachstums in der Probe mit dem Kontrollansatz erfolgt durch Messung der Trübung. Diese ist ein Maß für die Anzahl an Zellen je Volumeneinheit und gibt somit Auskunft über die Hemmwirkung der Testsubstanz. (DIN, 1999)

ÖNORM EN ISO 6341: 2013 05 15 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) (ASI, 2013)

Das in der vorliegenden Norm beschriebene Verfahren eignet sich für die Ermittlung des Toxizitätspotentials von Wässern, Abwässern aber auch Einzelsubstanzen auf den Wasserfloh der Spezies *Daphnia magna* Straus. Der Vorteil eines Tests an Krebstieren besteht in ihrer Eigenschaft als Primärkonsumenten, das heißt sie bilden zu einem essentiellen Teil das in aquatischen Ökosystemen befindliche Zooplankton.

Das Ziel der Untersuchung besteht in der Bestimmung jener Konzentration an Testsubstanz, die bei 50 % der eingesetzten Versuchstiere Schwimmfähigkeit hervorruft. Dazu ist ein Zeitraum von 24 Stunden, in einigen Fällen auch 48 Stunden vorgesehen. Weiters, insbesondere in Fällen, in denen sich obig beschriebener EC_{50} nicht exakt bestimmen lässt, kann es hilfreich sein, die Konzentrationen an Testgut zu ermitteln, bei denen die Schwimmfähigkeit von 0 bzw. 100 % der Daphnien eintritt. Die Durchführung des Tests erfolgt in zwei Stufen, wobei ein Vortest zur Eingrenzung des Konzentrationsbereiches dient; im anschließenden Haupttest erfolgt die genaue Berechnung des 24 h oder 48 h- EC_{50} . (ASI, 2013)

ÖNORM M 6263: 1987 11 01 Testverfahren mit Wasserorganismen; Bestimmung der akuten Toxizität von Wasserinhaltsstoffen gegenüber *Salmo gairdneri* Richardson (Regenbogenforelle) (ON, 1987; ON, 1987a; ON, 1987b)

Die ÖNORM M 6263 stellt eine weitere Alternative dar, die Toxizität einer Wasserprobe oder einer bestimmten Substanz zu ermitteln. Als Testorganismus wird hierbei die Regenbogenforelle eingesetzt, da dieser Fisch sehr zahlreich in österreichischen Gewässern anzufinden ist. Aus diesem Grund ist eine relativ gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei der Überprüfung von natürlichen Wasserkörpern gegeben.

Ähnlich wie in der ÖNORM EN ISO 7346, welche ebenfalls einen Test an Fischen vorsieht, besteht die Möglichkeit, den Versuch je nach den vorliegenden Bedingungen statisch, semistatisch oder in der Form eines Durchflusstests durchzuführen. Die statische Variante wird gewählt, falls der voraussichtliche Einfluss der Substanz durch physikalisch-chemische Effekte, durch die Fische selbst oder durch die Hälterungsbedingungen als vernachlässigbar gering abgeschätzt wird. Die Durchflussmethode hat den entscheidenden Vorteil, dass sie für nahezu alle Arten von Substanzen eingesetzt werden kann, so auch für instabile Verbindungen. Sowohl bei diesem Test als auch bei der semistatischen Variante kann eine längere Expositionsdauer als 48 Stunden gewählt werden, da die Ausscheidungen der Testfische aufgrund des Austausches des Testmediums die Ergebnisse nicht beeinträchtigen. In der Abwasseremissionsverordnung werden nur die statische und semistatische Variante des Tests zur Analyse der Toxizität genannt.

Die vorliegende Testvorschrift ist analog zu den vorhergehenden ebenfalls aus einem Vor- und einem Haupttest aufgebaut. Der Vortest dient zur Feststellung der niedrigsten Konzentration an Testsubstanz, welche sämtliche Versuchsfische tötet sowie der höchsten Konzentration, bei der kein letaler Effekt eintritt. Anhand dieser Daten wird der Haupttest durchgeführt, mit dem Ziel die Konzentration zu bestimmen, die bei der Hälfte der eingesetzten Fische zum Tod führt. Das Ergebnis wird als 48 h-LC₅₀ bezeichnet.

In Hinblick auf die Testbedingungen ist zu beachten, dass den Fischen in den Aquarien ausreichend Platz zur Verfügung steht. Weiters ist das Wasser konstant auf 15 °C zu halten und kontinuierlich zu belüften, sodass der Sauerstoffgehalt den Wert von 6 mg*L⁻¹ nicht unterschreitet. Als Verdünnungswasser kann entchlortes Trinkwasser verwendet werden. Falls jedoch höhere Ansprüche an die Qualität des Tests sowie dessen Vergleichbarkeit gegeben sind, müssen die Konzentrationen an Calcium- und Magnesium-Ionen den in der Norm genannten Werten entsprechen.

Die in einem normgerecht durchgeführten Versuch zu verwendenden Testfische sollen einen Korpulenzfaktor K von mindestens 0,8 aufweisen. Dieser wird nach Formel 3 berechnet.

$$K = \frac{100 \cdot m}{l^3} \quad (3)$$

Mit K ... Korpulenzfaktor

m ... Masse des Fisches in g

l ... Länge des Fisches in cm (ON, 1987:4)

48 Stunden vor Beginn des Tests sind die Fische nicht mehr zu füttern und im Verdünnungswasser zu hältern. Unmittelbar vor dem Test müssen die Stammlösungen der Testsubstanz angesetzt werden, um ein frühzeitiges Zersetzen oder anderweitige unerwünschte Reaktionen zu vermeiden.

Für den Vortest ist eine Reihe von Konzentrationen des Testgutes herzustellen sowie ein Behältnis mit Verdünnungswasser bereitzustellen. Dieses dient als Kontrollmedium. In jedes

Gefäß ist eine ausreichende Anzahl an Versuchsfischen einzubringen. Dabei ist zu beachten, dass jedem Organismus ein Liter Wasser zur Verfügung steht. Der Richtwert liegt bei fünf Fischen pro Aquarium. In regelmäßigen Zeitabständen ist die Anzahl toter Fische in den einzelnen Gefäßen zu bestimmen, um am Ende des Tests den Konzentrationsbereich zwischen 0 und 100 % Mortalität zu erhalten.

Die auf diese Weise gewonnenen Daten fließen in die Auswahl des Konzentrationsbereiches für den Haupttest. Dieser läuft ähnlich ab wie der Vortest, jedoch ist erwünscht, mindestens drei Mortalitätsangaben im Bereich zwischen 10 und 90 % zu erhalten. Des Weiteren ist die Anzahl an Fischen pro Testgefäß mit fünf genau festgelegt. Zusätzlich zur Überprüfung der letalen Wirkung auf die Fische sind im Haupttest auch der Sauerstoffgehalt, der pH-Wert sowie die Ammoniumkonzentration zu überwachen.

Auch bei dieser Norm werden Gültigkeitskriterien genannt:

„Die Ergebnisse sind gültig, wenn folgende Bedingungen erfüllt sind:

- a) *Die Konzentration des gelösten Sauerstoffes muß am Ende der Untersuchung in allen Aquarien mindestens 6 mg/L betragen.*
- b) *In den Kontrollproben dürfen keine Fische absterben.*
- c) *Wurde die Toxizität einer definierten chemischen Einzelsubstanz bestimmt, so ist die Konzentration dieser Substanz am Ende der Untersuchung ebenfalls zu bestimmen.“ (ON, 1987:5)*

Abhängig von der Testsubstanz werden die Ergebnisse bei Wasserproben als Verdünnungsfaktor und bei chemischen Substanzen in der Form mg/L angegeben. (ON, 1987; ON, 1987a; ON, 1987b)

ÖNORM EN ISO 8192: 2007 06 01 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Belebtschlamm nach Kohlenstoff- und Ammonium-Oxidation (ON, 2007)

In dieser Norm wird die Toxizität von Abwasser oder spezifischen Substanzen auf den Sauerstoffverbrauch von in Belebtschlamm vorliegenden Mikroorganismen ermittelt. Belebtschlamm beinhaltet im Wesentlichen zwei Arten von Mikroorganismen, welche Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch haben. Diese sind einerseits heterotrophe, kohlenstoffoxidierende Bakterien und andererseits autotrophe Nitrifikanten. Letztere oxidieren Ammonium zu Nitrat. Das Testgut kann sowohl einen der beiden Prozesse, als auch beide negativ beeinflussen. Da Belebtschlamm zumeist in biologisch arbeitenden Kläranlagen vorkommt, simuliert das hier beschriebene Verfahren die Bedingungen in solch einer Abwasserreinigungsanlage. (ON, 2007:4f.)

Unter natürlichen Bedingungen führt das Verhalten der im Belebtschlamm befindlichen Mikroorganismen zu einem Verbrauch an Sauerstoff. Dieser Verbrauch erhöht sich, je

leichter hinzugefügtes Substrat abgebaut werden kann. In Anwesenheit eines toxischen Testgutes verringert sich der Verbrauch an Sauerstoff.

Als Testmedium dient ein laut Norm angegebenes synthetisches Abwasser. Die Stammlösung der Testsubstanz wird durch das Lösen einer geeigneten Konzentration in Wasser hergestellt. Bei der Untersuchung der Wirkung von Abwasser ist keine vorherige Verdünnung notwendig. Der bei den Versuchen verwendete initiale Belebtschlamm, das sogenannte Inokulum, entstammt aus dem Belebungsbecken einer Kläranlage. Je nach Anforderungen der Untersuchungen kommt hierfür eine kommunale oder industrielle Anlage in Frage. Zu beachtende Faktoren sind der Substratgehalt sowie die Schlammkonzentration. Diese sollte im Bereich von 2 bis 4 g*L⁻¹ liegen.

Je nach Ziel der Analyse, Einfluss der Testsubstanz auf heterotrophe Atmung oder auf die Nitrifikation, ist nitrifizierender oder nicht-nitrifizierender Schlamm zu wählen.

Im Laufe des Versuches kann es vorkommen, dass erhöhte Schaumbildung eintritt. Insbesondere bei tensidhaltigen Testsubstanzen ist darauf zu achten, dass im Zuge der Belüftung der Mischung nicht zu hohe Anteile des Testgutes entweichen. Bei zu hoher Schaumbildung wird empfohlen, der Mischung eine tensidfreie Siliconemulsion hinzuzufügen. Diese hat eine schaumhemmende Wirkung. Die Zugabe wird durch den Schaumbildner determiniert: wird der Schaum vom Testmedium verursacht, so wird die Beifügung von 5 µL*L⁻¹ Entschäumer vorgeschrieben, liegt die Ursache für den erhöhten Schaumgehalt beim Testgut, so ist die Menge an Entschäumer individuell anhand der höchsten benötigten Konzentration festzustellen.

Das Inokulum wird gemäß der in der Norm beschriebenen Vorgangsweise durch Befreien des Schlammes von groben Partikeln und darauffolgendes Homogenisieren hergestellt. Anschließend erfolgt das Waschen des Schlammes. Nach dem Zentrifugieren ist der Schlamm in chlorfreiem Leitungswasser zu resuspendieren. Der Vorgang ist so oft zu wiederholen, bis der Gehalt an suspendierten Stoffen im Belebtschlamm bei 3 g*L⁻¹ liegt. Der Schlamm ist zu belüften und innerhalb von 24 h zu verwenden.

Die Testmischungen sind durch das Mischen von Wasser, Testmedium und Testgut herzustellen, sodass unterschiedliche Testkonzentrationen vorliegen. Das in der Folge hinzugefügte Inokulum ist derart einzustellen, dass die Belebtschlammkonzentration 1.500 mg*L⁻¹ suspendierte Stoffe aufweist.

Für den Blindwert wird analog verfahren, jedoch entfällt die Zugabe des Testgutes.

Um den Konzentrationsbereich an Testgut für den Haupttest zu ermitteln, ist die Durchführung einer Voruntersuchung vorgesehen. Wird keine Hemmung des Sauerstoffverbrauches gemessen, so ist der Haupttest nicht mehr notwendig. Der Vortest ist mit mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen an Testsubstanz auszuführen, wobei bei der niedrigsten Konzentration möglichst kein Verbrauch an Sauerstoff nachweisbar sein sollte. Abgesehen von einem Gefäß zur Bestimmung des Blindwertes kann bei einem stark

reduzierenden Testgut eine abiotische Kontrolle eingeplant werden. Hierbei werden, in Analogie zu den Testmischungen, ebenfalls Testgut, Testmedium sowie Wasser in einem Gefäß vereint, jedoch entfällt die Zugabe von Biomasse. Der biologische Sauerstoffverbrauch kann durch einen entsprechenden Inhibitor gehemmt werden.

Bevor mit dem Haupttest begonnen wird, ist die Fragestellung zu beantworten, ob die gesamte, die heterotrophe oder die auf Nitrifikation beruhende Hemmung des Sauerstoffverbrauchs Gegenstand der Untersuchungen ist. Für den Gesamtwert werden mindestens fünf Testkonzentrationen sowie ein Blindwert angesetzt. Ist die Ermittlung der Nitrifikationshemmung ebenfalls erwünscht, so ist eine weitere Testreihe mit einem Zusatz von $11,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ des Nitrifikationshemmers ATH anzusetzen. Die durch diese Maßnahme hervorgerufene Verhinderung der Nitrifikation resultiert in alleiniger heterotropher Oxidation. Die durch Nitrifikation hervorgerufene Hemmung des Sauerstoffverbrauchs lässt sich durch Subtraktion des Wertes für die heterotrophe Oxidation vom Gesamtwert berechnen.

Nach Zugabe des Inokulums in die Testgefäße erfolgt die Belüftung derselben bis zur Sauerstoffsättigung. Anschließend werden die Behältnisse bei einer Temperatur von $22 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

Nach einer Inkubationsdauer von 30 min ist der Sauerstoffverbrauch zu messen, im Falle schwerlöslicher Teststoffe kann dieser Zeitraum auf 180 min verlängert werden.

Um die Gültigkeit der Ergebnisse sicherzustellen, wird nahegelegt, die Empfindlichkeit des Belebtschlammes regelmäßig mit einer Referenzsubstanz zu überprüfen. Als solche kann beispielsweise Dichlorphenol herangezogen werden. (ON, 2007)

ÖNORM EN ISO 9509: 2006 11 01 Wasserbeschaffenheit – Toxizitätstest zur Bestimmung der Nitrifikationshemmung in Belebtschlamm (ON, 2006)

Diese Norm beschäftigt sich mit der Hemmwirkung toxischer Substanzen auf nitrifizierende Bakterien im Belebtschlamm von Kläranlagen. Abhängig von der Nitrifikationsstärke dauert der Test zwischen drei und 24 Stunden. Vor Beginn der Untersuchungen muss die Nitrifikationsrate bestimmt werden, dies wird unter Zuhilfenahme eines Inhibitors, wie z.B. N-Allylthioharnstoff erreicht. Liegt die Rate im Bereich zwischen 2 und $6,5 \text{ mg N}^*(\text{g}_{\text{susp. Stoff}} \cdot \text{h})^{-1}$, so kann der Schlamm ohne weitere Maßnahmen eingesetzt werden, anderenfalls muss er modifiziert werden.

Die Verfahrensweise basiert auf Messung der Hemmung des Umsatzes von Ammoniumsalzen zu Nitrit und Nitrat. Die Differenz der Konzentrationen dieser Verbindungen in unterschiedlich stark verdünnten Testansätzen resultiert in der prozentualen Nitrifikationshemmung der Testsubstanz bzw. des Abwassers.

Weitere, nicht in der Abwasseremissionsverordnung genannte Normen zur Bestimmung der Toxizität von Wasserproben sind:

ÖNORM EN ISO 10712: 1996 02 01 Wasserbeschaffenheit – Pseudomonas putida Wachstumshemmtest (Pseudomonas-Zellvermehrungshemmtest) (ON, 1996)

Das in dieser Norm beschriebene Verfahren testet Wasser und in Wasser lösliche Proben auf ihre Hemmwirkung gegenüber dem Bakterium *Pseudomonas putida*. Dieses stellt einen Vertreter für ähnlich beschaffene heterotrophe Mikroorganismen in Süßwasser dar. Da das grundlegende Messverfahren auf einer optischen Auswertung des Ergebnisses basiert, ist von Proben, welche die Matrix zu sehr verändern können, abzusehen. Dazu zählen stark färbende Substanzen, aber auch solche, die sich während des Tests verändern oder zu unerwünschten Reaktionen führen.

Das Verfahrensprinzip besteht darin, dass eine Bakterienkultur unterschiedlich starken Verdünnungen an Testsubstanz ausgesetzt wird. Nach 16 Stunden wird das Wachstum mit dem einer Kontrollkultur verglichen. Das Ziel des Tests ist es, festzustellen, bei welcher Konzentration der Testsubstanz eine Hemmung des Wachstums um 10 bzw. 50 % eintritt.

Für die ordnungsgemäße Durchführung des Tests ist es zunächst wichtig, eine Vorkultur anzusetzen. Diese hat die Funktion, eine ausreichende Anzahl an Bakterien für den eigentlichen Test zu züchten. Weiters stimmen die Wachstumsbedingungen in der Vorkultur mit den in der Testkultur herrschenden Bedingungen überein; auf diese Art ist es den Bakterien möglich, sich der Umgebung anzupassen. Das Vorkultur-Medium wird durch Homogenisierung der in der Norm angegebenen Stammlösungen im vorschriftsgetreuen Verhältnis erhalten. Das so gewonnene Medium wird dazu eingesetzt, die Bakteriensuspension auf einen Trübungswert von FNU = 10 zu verdünnen, das Resultat stellt das sogenannte Vorkultur-Inokulum dar. FNU steht für Formazin-nephelometrische Einheiten und stellt ein Maß für die Trübung einer Bakteriensuspension dar. Um den Wert zu ermitteln, wird die optische Dichte der vorliegenden Suspension bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen. Das Inokulum wird dem Vorkultur-Medium entnommen und zur Herstellung der Vorkultur herangezogen.

Nach einer Inkubationszeit von 5 h bei 23 °C wird die Bakteriensuspension entnommen und mit Testkultur-Medium verdünnt. Dieses wird gemäß Tabelle 1 der Norm produziert. Hier ist ebenso der letztendlich erhaltene FNU-Wert ein entscheidender Parameter für das weitere Vorgehen.

Für die Testkultur müssen zunächst die einzelnen Verdünnungen des Testgutes hergestellt werden. Diese werden mit Inokulum versetzt. Die eingesetzte Menge hängt von dem zuvor eingestellten Trübungswert ab – es ist jedenfalls zu beachten, dass in den einzelnen Testgefäßen eine Trübung von FNU = 5 vorliegt. Zu jeder Verdünnung sind drei Parallelansätze vorzusehen. Der Kontrollansatz enthält lediglich Verdünnungswasser, Nährmedium sowie Inokulum.

Nach Fertigstellung der einzelnen Ansätze erfolgt die Inkubation der Testgefäße bei 23 °C über einen Zeitraum von 16 Stunden. Wichtig in diesem Schritt ist die regelmäßige Bewegung der Behältnisse, um ein Anhaften der Bakteriensuspension an den Gefäßwänden zu verhindern. Unmittelbar nach Ablauf der Inkubationszeit findet die photometrische Messung der Trübung statt. Sollte durch eine Reaktion mit dem Testgut eine Farbänderung eingetreten sein, so ist es möglich, einen Ansatz zu filtrieren und diesen vor den Parallelansätzen mit der gleichen Verdünnungsstufe zu messen. Das Resultat wird als Leerwert betrachtet. (ON, 1996)

Wie bei den anderen Normen sind auch hier Gültigkeitskriterien zu beachten:

„Der Test kann als gültig betrachtet werden

- a) *wenn sich das Inokulum im Kontrollansatz (FNU = 5) innerhalb der Testzeit mindestens um den Faktor 60 vervielfacht hat und*
- b) *wenn die EC 50 der Referenzsubstanz 3,5-Dichlorphenol im Bereich von 10 mg*L⁻¹ und 30 mg*L⁻¹ liegt.“* (ON, 1996:9)

ÖNORM EN ISO 7346: 1998 03 01 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] (ON, 1998; ON, 1998a; ON, 1998b)

Diese Norm besteht aus drei Teilen: ÖNORM EN ISO 7346-1 beschreibt ein statisches Verfahren, ÖNORM EN ISO 7346-2 schildert die semistatische Variante und in ÖNORM EN ISO 7346-3 wird die Durchführung des Durchflusstests wiedergegeben. Das zugrundeliegende Prinzip ist jedoch bei allen Formen der vorliegenden Norm das gleiche und wird nun zusammenfassend beschrieben:

Die Norm ist geeignet, um die akute, letale Toxizität einer Substanz auf den Zebraabärbling zu bestimmen. Es ist unter Beibehaltung der Versuchsbedingungen möglich, andere Süßwasserfische als den Zebraabärbling als Testorganismus einzusetzen, geeignete Spezies werden in der Norm genannt. Falls erwünscht wird, das Verfahren auf marine Fische anzuwenden, so müssen lediglich Änderungen in Temperatur und Zusammensetzung des Verdünnungswassers vorgenommen werden.

Durch das Verfahren wird, analog zum oben beschriebenen Daphnien-Test, die Konzentration einer zu untersuchenden Substanz, die bei 50 % der eingesetzten Individuen nach einer zuvor definierten Expositionszeit letale Auswirkungen hat, festgelegt. Die genannten Zeiträume des Aussatzes mit der Probe sind 24, 48, 72 sowie 96 Stunden.

Auch diese Testergebnisse werden in einem Haupttest ermittelt, dessen Konzentrationsbereich zuvor in einem Vortest bestimmt wurde.

Die für die Versuchsreihe herangezogenen Fische müssen zur Eingewöhnung an die Testbedingungen mindestens eine Woche in normgerecht hergestelltem

Verdünnungswasser gehärtet werden, welches während dieser Zeit mit Luftblasen belüftet wird. Weiters dürfen ausschließlich gesunde Organismen eingesetzt werden. Eine allfällige medizinische Behandlung würde die Testergebnisse negativ beeinflussen, daher ist von dieser Maßnahme abzusehen. Falls ein neuer Fischstamm zur Verwendung kommt, so ist ein Toxizitätstest mit einer Referenzsubstanz durchzuführen. In der Norm wird das Beispiel $K_2Cr_2O_7$ genannt.

Die Zusammensetzung des Verdünnungswassers in Hinblick auf die darin enthaltenen Salze ist in der Norm genau beschrieben. Wichtig sind der pH-Wert von 7,8 sowie eine $CaCO_3$ -Härte von $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. (ON, 1998:4)

Vor Durchführung des Vortests sieht die Norm einen Test an der Grenze der Wasserlöslichkeit der Testsubstanz oder mit einer Konzentration von $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ vor. Dieser Limittest dient zur Feststellung, ob weitere Untersuchungen notwendig sind: im Falle des Überlebens sämtlicher Individuen entfallen weitere Analysen. Dies gilt als Beweis, dass der LC_{50} -Wert nach 96 Stunden höher ist. Sollte letale Wirkung auf die Testfische observiert werden, so wird nahegelegt, den Toxizitätstest vollständig durchzuführen.

Für den Vortest werden fünf mit einem Volumen zwischen 2,5 und 5 L vorgelegte Testgefäße in unterschiedlichem Ausmaß mit Stammlösung versetzt. Das Ziel ist die Herstellung einer geometrischen Konzentrationsabstufung. Anschließend werden die Gefäße auf eine Temperatur von $23\text{ }^\circ\text{C}$ gebracht sowie der Gehalt an gelöstem Sauerstoff auf einen Wert von 90 % des Sättigungswertes gebracht. Im Laufe der nächsten vier Tage sind regelmäßig die Anzahl toter Fische und die Sauerstoffkonzentration festzuhalten.

Der Haupttest läuft in ähnlicher Weise wie der Vortest ab, jedoch werden 10 L Standard-Verdünnungswasser pro Testgefäß eingesetzt und eine größere Anzahl Testorganismen herangezogen. Die Konzentrationen an Testlösung sollen erneut einer geometrischen Reihe entsprechen, es ist jedenfalls zu beachten, dass die geringste nicht-letale Konzentration sowie die höchste Konzentration an Testlösung, bei der kein Effekt an den Individuen beobachtet wird, Teil des Haupttests sind.

Analog zum Vortest werden über den Zeitraum der nächsten vier Tage sowohl die Anzahl der toten Fische als auch der Sauerstoffgehalt regelmäßig festgestellt. Bei einer stabilen Testsubstanz ist die Konzentration zu Beginn und Ende des Tests zu determinieren. Wird nach der semi-statischen Methode vorgegangen, so muss bei einer instabilen Substanz die Konzentration jeweils vor und nach dem Umsetzen der Testfische in ein neues Gefäß mit Testlösung bestimmt werden.

Bei beiden Tests ist jeweils ein Testgefäß ausschließlich mit Verdünnungswasser zu füllen. Dieses dient als Kontrollansatz. (ON, 1998; ON, 1998a; ON, 1998b)

Diese Norm verweist auf die folgenden Gültigkeitskriterien der Ergebnisse:

„Die Ergebnisse werden als gültig angesehen, wenn folgende Anforderungen erfüllt sind:

- a) *Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff in der Testlösung betrug während des Tests mindestens 60 %;*
- b) *Die Konzentrationen der Testsubstanz haben sich während des Tests nach Kenntnisstand bzw. nach Verdacht nicht signifikant verringert;*
- c) *Die Mortalität in den Kontrollansätzen überstieg je Testgefäß nicht 10 %;*
- d) *Der Anteil an Fischen mit abnormem Verhalten überstieg in den Kontrollansätzen je Testgefäß nicht 10 %;*
- e) *Die 24 h-LC 50 der Referenzsubstanz (z.B. Kaliumdichromat $K_2Cr_2O_7$) war, sofern bestimmt, für die Fische im Vorratsbecken in Übereinstimmung mit Untersuchungen, die in früheren Tests in dem gleichen Labor erhalten worden waren.“ (ON, 1998:7)*

Sollte die zu untersuchende Substanz nach dem vorgesehenen Zeitraum von 96 h nicht ausreichende Stabilität aufweisen, so empfiehlt sich das Verfahren semi-statisch oder kontinuierlich durchzuführen. In der ersten Variante wird die Testlösung je nach Beschaffenheit in einem Intervall von 24 oder 48 h ausgetauscht. Dadurch kann die Konzentration auf einem ausreichend konstanten Niveau gehalten werden. Falls die vorliegende Testsubstanz die Eigenschaft hat, sich sehr schnell abzubauen und auf diese Art die Wassergüte zu beeinträchtigen, so kann die Testlösung im Durchfluss mit einer Rate von $25 \text{ L} \cdot \text{d}^{-1}$ kontinuierlich ausgetauscht werden. Diese Methode eignet sich auch für in Wasser instabile Substanzen. (ON, 1998b:3, 7)

ÖNORM EN ISO 16712: 2006 12 01 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der akuten Toxizität mariner Sedimente oder von Sedimenten aus Flussmündungsgebieten gegenüber Amphipoden (ON, 2006b)

Soll die akute Toxizität von festen Abfällen oder Klärschlamm, welcher in marinen Sedimenten oder Flussmündungsgebieten auftritt, bzw. der marinen Sedimente selber bestimmt werden, so eignet sich diese Norm dafür.

Die Versuchsorganismen, Flohkrebse – sogenannte Amphipoden, werden über einen Zeitraum von zehn Tagen der Probe ausgesetzt, wobei die prozentuale Sterblichkeit nach Ablauf des Versuchszeitraumes den Endpunkt der Untersuchungen darstellt. Die erhaltenen Ergebnisse werden durch die Beobachtungen eines Kontrollansatzes unterstützt.

Die genauen Testbedingungen wie Salinität oder Temperatur hängen von der eingesetzten Art an Flohkrebsen ab. (ON, 2006b)

ÖNORM EN ISO 20079: 2006 12 01 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (Lemna minor) - Wasserlinsen-Wachstumshemmtest (ON, 2006c)

Neben der Feststellung der wachstumshemmenden Wirkung auf Wasserlinsen werden im Zuge der Untersuchungen in dieser Norm auch andere substanzabhängige Effekte dokumentiert.

Die Testpflanzen werden über einen Zeitraum von sieben Tagen verschiedenen Verdünnungen der Testsubstanz sowie einem Kontrollansatz ausgesetzt. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgt die Bestimmung der Frondanzahl, und -fläche, des Chlorophyllgehaltes, der Trockenmasse sowie eventuell anderer Biomasseparameter. Den eigentlich für diesen Test aussagekräftigsten Parameter stellt jedoch die Wachstumsrate dar. Im Vergleich mit dem Kontrollansatz wird jene Konzentration an Testgut ermittelt, welche das Wachstum um einen definierten Prozentwert hemmt. (ON, 2006c)

ÖNORM EN ISO 15088: 2009 05 01 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (ASI, 2009)

Diese Norm bestimmt die innerhalb von 48 h akut eintretende toxische Wirkung von Abwasser auf Eier des Zebraäbrlings und ist als Alternative zur oben beschriebenen ÖNORM EN ISO 7346 Teil 1 und 2 gedacht, welche die toxische Wirkung an lebenden Exemplaren des selben Fisches untersucht. Laut Anmerkung in der Norm sind die für die Untersuchung von Abwasser erhaltenen Ergebnisse vergleichbar.

Der Test wird mit einer Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Abwassers mit ganzzahligen Volumenverhältnissen durchgeführt. Der Probe werden die befruchteten Fischeier in Mikrotiterplatten über einen Zeitraum von 48 h ausgesetzt. Die Testdauer ist unbedingt einzuhalten, da die Embryonen nach 72 bis 96 h bei einer Temperatur von 26 °C schlüpfen. Von Interesse ist jene Konzentration, bzw. Verdünnung, bei der kein toxischer Effekt mehr zu beobachten ist. Als akute toxische Effekte gelten einerseits das direkte Eintreten des Todes als auch zum Tod führende Schäden in der Embryonalentwicklung.

Im Hinblick auf die Gültigkeit des Tests ist zu beachten, dass im Kontrollansatz eine Überlebensrate von mindestens 90 % im Versuchszeitraum dokumentiert wird, weiters soll die Referenzsubstanz eine Wirkung von mindestens 10 % aufweisen. Diese Positivkontrolle ist parallel zu jedem Ansatz vorzusehen. (ASI, 2009)

ÖNORM EN ISO 21427-2: 2009 08 01 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Gentoxizität mit dem In-vitro-Mikrokerntest – Teil 2: Verwendung einer nicht-synchronisierten V79-Zellkulturlinie (ASI, 2009a)

Grundlage dieser Untersuchungsmethode ist die gentoxische Wirkung von Abwasser auf Säugetierzellen. Durch Abwasser hervorgerufene zytogenetische Schäden an den Chromosomen oder dem Mitoseapparat der untersuchten Zellen können hiermit

dokumentiert werden. Für die Durchführung des Versuches werden Zellen des Chinesischen Hamsters herangezogen.

Bei der Zellteilung erfolgt eine Integration der Chromatidfragmente in die Kerne der Tochterzellen. Das Einwirken einer toxischen Substanz kann jedoch dazu führen, dass einige Chromatidfragmente keinen Kern aufweisen, diese bewegen sich frei im Zytoplasma der Zelle. Ein weiterer durch die unerwünschte Verbindung hervorgerufener Effekt besteht in der Schädigung ganzer Chromosomen. In der Folge entwickeln sich diese zu Mikrokernen, welche ebenfalls im Plasma verbleiben.

Das in der Norm beschriebene Verfahren vergleicht die Anzahl an Mikrokernen in mit Testgut behandelten Zellen mit solchen, die nicht der Substanz ausgesetzt wurden nach einem Zeitraum von 24 h. Ein erhöhtes Auftreten deutet auf das Vermögen der Testsubstanz hin, Schädigungen des Spindelapparates in V79-Zellen zu verursachen. (ASI, 2009a)

ÖNORM EN ISO 8692: 2012 04 15 Wasserbeschaffenheit – Süßwasseralgen-Wachstumshemmtest mit einzelligen Grünalgen (ASI, 2012)

Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren bestimmt die wachstumshemmende Wirkung von Abwasser oder in Wasser leicht löslicher Substanzen auf einzellige Grünalgen. In der Norm werden die planktischen Süßwasseralgen *Desmodesmus subspicatus* und *Pseudokirchneriella subcapitata* genannt. Wird die Untersuchungsmethode nach ISO 14442 und ISO 5667-16 modifiziert, lässt sich das Spektrum an Testsubstanzen auf schwer lösliche Stoffe, flüchtige Verbindungen und Schwermetalle erweitern.

Für den Test werden Ansätze unterschiedlicher Konzentrationen an zu prüfender Substanz, Wachstumsmedium sowie einem Inokulum an Versuchsalgen hergestellt. Innerhalb einer Inkubationsdauer von 72 h erfolgt die regelmäßige Messung der Zelldichte in den Testgefäßen. Durch den Vergleich der Wachstumsrate der Zellen in den Testansätzen mit jenem des Kontrollansatzes lässt sich eine Aussage über die Wachstumshemmung der Testsubstanz treffen. (ASI, 2012)

ÖNORM EN ISO 10710: 2013 07 01 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Wachstumshemmung auf die marine und ästuarine Makroalge *Ceramium tenuicorne* (ASI, 2013a)

Dieses Verfahren zur Bestimmung der Wachstumshemmung bezieht sich auf Meerwasserproben oder Abwässer mit einer Salinität zwischen 4 und 32 S, bzw. darin enthaltenen wasserlöslichen Substanzen.

Wie in der zuvor beschriebenen Norm erfolgt auch in diesem Fall ein Vergleich der Wachstumsrate der den Verdünnungen der Probe ausgesetzten Algen mit dem Kontrollansatz nach einer siebentägigen Inkubationsdauer. Das Wachstum wird an der Längenzunahme der Pflanzen festgestellt, wobei die relative Reduktion derselben als Wachstumshemmung gilt.

Ist das Ziel der Untersuchungen ein Vergleich der Toxizität von Proben mit jener von anderen Chemikalien, so kann für die Durchführung der Tests synthetisches Meerwasser herangezogen werden. Sind Wässer von Vorflutern Gegenstand der Fragestellung, sind zu diesem Zweck an die Salinität des Untersuchungswassers adaptierte Algen einzusetzen. (ASI, 2013a)

ÖNORM EN ISO 10253: 2016 02 01 Wasserbeschaffenheit – Wachstumshemmtest mit marinen Algen *Skeletonema sp.* und *Phaeodactylum tricornutum* (ASI, 2016)

Ein weiterer Wachstumshemmtest ist in dem Entwurf zur ÖNORM EN ISO 10253 beschrieben. Die Testorganismen in diesem Fall sind marine einzellige Algen der Spezies *Skeletonema sp.* oder *Phaeodactylum tricornutum*. Der Fokus in dieser Untersuchung liegt auf Substanzen im Meerwasser oder umweltrelevanten Proben wie beispielsweise Abwässer.

Für die Durchführung des Tests werden Nährstoff-Medium, Meerwasser, ein Inokulum von Algenzellen sowie Stammlösungen des Testgutes in Prüfgefäßen vereint, um eine Reihe unterschiedlicher Verdünnungen zu erhalten. Während einer Kultivationsdauer von 72 h erfolgt in einem Intervall von 24 h eine Messung der Zelldichte in jeder Lösung. Die Verminderung der Wachstumsrate im Vergleich mit einem Kontrollansatz stellt ein Maß für die Hemmwirkung der Testsubstanz dar. (ASI, 2016)

ÖNORM EN ISO 20227: 2016 06 01 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung von Abwässern, natürlichen Wässern und Chemikalien auf die Wasserlinsenart *Spirodela polyrhiza* – Verfahren mittels Stammkultur unabhängigem mikrobiologischem Test (ASI, 2016b)

Wasserlinsen sind für einen Toxizitätstest aus zwei Gründen sehr gut geeignet: einerseits wachsen sie relativ schnell und können daher problemlos für einen Test kultiviert werden. Andererseits fungieren sie als Primärproduzenten in Ökosystemen, wodurch sich Rückschlüsse auf das untersuchte Umweltmilieu ziehen lassen. Für den vorliegenden Versuch werden Wasserlinsen der Spezies *Spirodela polyrhiza* eingesetzt; diese bilden – im Unterschied zu anderen Arten – sogenannte Turionen aus. Darunter werden ruhende vegetative Knospen verstanden, welche unabhängig von der Lagerungsdauer für den Test herangezogen werden können.

Die grundsätzliche Verfahrensweise des Toxizitätstests beruht auf der wachstumshemmenden Wirkung von Substanzen auf die Fronds, das heißt Keimblätter, der Wasserlinse. Hierfür werden Turionen einer dreitägigen Keimungsdauer ausgesetzt, in der sich ein Frond ausbildet. Anschließend werden fünf Verdünnungen der zu untersuchenden Substanz sowie ein Kontrollansatz hergestellt. Insgesamt sind acht Parallelansätze vorgesehen, sodass eine 6 x 8 – Matrix aus Versuchsnäpfchen vorliegt. In jedes Testgefäß wird ein Turion mit ausgebildetem Frond inokuliert und für 72 h bei 25 °C und einer gleichmäßigen Beleuchtung von 6.000 lx inkubiert.

Für die anschließende Auswertung der Ergebnisse und ordnungsgemäße Feststellung der Wachstumshemmung ist es notwendig, den Flächenunterschied der Keimblätter vor und nach dem Test fotografisch zu dokumentieren. Das Wachstumsmedium dient gleichzeitig auch als Lösung, um das zu untersuchende Wasser für den Test zu verdünnen. Hierbei kommt ein modifiziertes Steinberg-Medium zum Einsatz, dessen Zusammensetzung in der Norm genannt wird.

In ähnlicher Weise zu den zuvor angeführten Normen lässt sich auch bei dieser Vorschrift zwischen einem Vortest und einem Haupttest unterscheiden. Der hier bezeichnete Bereichsfeststellungstest dient bei einer Probe mit unbekannter Toxizität zur Feststellung der Konzentrationen, die das Wachstum der Wasserlinse zu 0 bzw. 100 % hemmen. Nach dem Erhalt dieser Daten kann mit den Vorbereitungen zum definitiven Test begonnen werden, wobei die Ergebnisse des Bereichsfeststellungstests dazu genutzt werden, die niedrigste Konzentration mit einer Wirkung von 100 % sowie die höchste Konzentration mit einem Effekt auf die Entwicklung der Pflanze von weniger als 10 % zu berücksichtigen. Die anzufertigende Verdünnungsreihe hat logarithmisch zu erfolgen.

Nach Ende des Tests ist zu erwarten, dass die Fronds der Kontrollansätze an Fläche zugenommen haben, während die mit Probe behandelten Keimblätter ein stark vermindertes Wachstum erfahren haben. Dieser Sachverhalt wird zur Auswertung herangezogen und mit Formel 4 erfolgt die prozentuale Ermittlung der Wachstumshemmung. Die Fronds der Kontrollansätze müssen mindestens 10 mm² an Fläche zunehmen, um ein gültiges Ergebnis zu erzielen.

$$\frac{A-B}{A} * 100 \% \quad (4)$$

Mit A ... Durchschnittswachstum des ersten Fronds in der Kontrolle

B ... Durchschnittswachstum des ersten Fronds in den fünf Testkonzentrationen

(ASI, 2016b:18)

In der Norm wird empfohlen, in regelmäßigen Abständen Referenztests durchzuführen. Diese dienen zur Sicherstellung der Empfindlichkeit der Testorganismen, der Übereinstimmung mit dem Testverfahren sowie der Überprüfung desselben. In diesem Fall wird auf 3,5-Dichlorophenol bzw. auf Kaliumchlorid zurückgegriffen. Der EC₅₀-Wert nach 72 h soll für die erstgenannte Verbindung zwischen 2,2 und 3,8 mg*L⁻¹ liegen, während für KCl Werte im Bereich von 5,5 und 10,0 mg*L⁻¹ zu erwarten sind. (ASI, 2016b:19)

2.3.2 Tests zur Ermittlung der Toxizität von Bodenproben

Behandelten die oben beschriebenen Normen die Ermittlung der Toxizität von Wasserproben, so sind in der Tabelle 5 Beispiele für Tests gegeben, welche zur Bestimmung der Umweltgefährlichkeit von Bodenproben vorgesehen sind.

Tabelle 5: Übersicht über Normen zur Toxizitätsbestimmung von Bodenproben

Bezeichnung	Titel
ÖNORM EN ISO 15952: 2011 08 01	Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Jungtiere von Landschnecken – Bestimmung der Wirkungen auf das Wachstum durch Bodenverunreinigung
ÖNORM EN 16086-1: 2011 12 15	Bodenverbesserungsmittel und Kultursubstrate — Bestimmung der Pflanzenverträglichkeit – Teil 1: Wachstumstest mit Chinakohl im Topf
ÖNORM EN 16086-2: 2011 12 15	Bodenverbesserungsmittel und Kultursubstrate — Bestimmung der Pflanzenverträglichkeit – Teil 2: Petrischalentest mit Kresse
ÖNORM EN ISO 20963: 2011 08 15	Bodenbeschaffenheit – Auswirkungen von Schadstoffen auf Insektenlarven (<i>Oxythyrea funesta</i>) - Bestimmung der akuten Toxizität
ÖNORM EN ISO 22030: 2011 08 15	Bodenbeschaffenheit – Biologische Verfahren – Chronische Toxizität in höheren Pflanzen
ÖNORM EN ISO 11269-1: 2013 02 01	Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora – Teil 1: Verfahren zur Messung der Wurzelwachstumshemmung
ÖNORM EN ISO 11269-2: 2013 04 01	Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora – Teil 2: Wirkung von verunreinigten Böden auf Saataufwurf und frühes Wachstum höherer Pflanzen
ÖNORM EN ISO 11267: 2014 05 15	Bodenbeschaffenheit – Hemmung der Reproduktion von Collembolen (<i>Folsomia candida</i>) durch Verunreinigungen
ÖNORM EN ISO 14238: 2014 01 15	Bodenbeschaffenheit – Biologische Verfahren – Bestimmung der Stickstoffmineralisierung und -nitrifizierung in Böden und der Einflüsse von Chemikalien auf diese Prozesse
ÖNORM EN ISO 16387: 2014 12 15	Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Verunreinigungen auf Enchytraeidae (<i>Enchytraeus</i> sp.) – Bestimmung der Wirkungen auf die Reproduktion

ÖNORM EN ISO 18772: 2014 05 01	Bodenbeschaffenheit – Anleitung für Elutionsverfahren für die nachfolgende chemische und ökotoxikologische Prüfung von Böden und Bodenmaterialien
ÖNORM EN ISO 11268-1: 2015 11 15	Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer – Teil 1: Bestimmung der akuten Toxizität auf Eisenia fetida / Eisenia andrei
ÖNORM EN ISO 11268-2: 2015 11 15	Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer – Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von Eisenia fetida / Eisenia andrei
ÖNORM EN ISO 11504: 2015 09 01	Bodenbeschaffenheit – Beurteilung der Wirkung von mit Mineralölkohlenwasserstoffen verunreinigten Böden
ÖNORM EN ISO 18187: 2016 08 01	Bodenbeschaffenheit – Feststoffkontakttest unter Verwendung der Dehydrogenaseaktivität von Arthrobacter globiformis

Die in der Tabelle genannten Tests zur Toxizitätsbestimmung in Böden werden auf den nächsten Seiten in Kürze beschrieben.

ÖNORM EN ISO 15952: 2011 08 01 Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Jungtiere von Landschnecken – Bestimmung der Wirkungen auf das Wachstum durch Bodenverunreinigung (ASI, 2011)

Der Test zu Ermittlung der Wirkungen von Prüfsubstanzen auf das Wachstum und das Überleben von Jungschnecken der Spezies *Helix aspersa aspersa* Müller ist als semistatisches Verfahren ausgeführt. Die Schadstoffe werden von den Tieren über den Verdauungstrakt sowie die Haut aufgenommen und können folgende Stoffgruppen umfassen: Substanzen, kontaminierte Böden, Böden unbekannter Zusammensetzung oder auch Abfälle.

Nach Herstellen der Prüfmischung mit den gewünschten Konzentrationen an zu prüfender Substanz werden die Schnecken dieser über einen Zeitraum von 28 Tagen ausgesetzt. Die Mischung ist regelmäßig nach sieben Tagen zu erneuern. Nach Ablauf der Prüfzeit erfolgt die Vermessung der Gehäusedurchmesser sowie der Frischmasse – diese Parameter sind ein Maß für das Wachstum. Weiters wird die Anzahl der Überlebenden Individuen festgestellt. Ein Vergleich der erhaltenen Daten mit den Ergebnissen einer Kontrollprüfung resultiert in der Schätzung der Konzentration an Testsubstanz, bei welcher das Wachstum der Organismen um die Hälfte reduziert wird. (ASI, 2011)

ÖNORM EN 16086-1: 2011 12 15 Bodenverbesserungsmittel und Kultursubstrate — Bestimmung der Pflanzenverträglichkeit – Teil 1: Wachstumstest mit Chinakohl im Topf (ASI, 2011a)

Der Versuch zur Ermittlung der Einflüsse von Böden auf Chinakohl wird je nach als Kultursubstrat eingesetztem Material in zwei Varianten durchgeführt. Liegt grobkörniges und daher wasserdurchlässiges Substrat wie beispielsweise Blähton, Lava oder Bimsstein vor, so ist es erforderlich, mit einem Extrakt der Probe zu arbeiten. In diesem Fall bedient man sich Nährlösung als Extraktionsmittel. Die Versuchstöpfe werden anschließend mit Perlit gefüllt, welches zuvor mit dem hergestellten Extrakt gesättigt wurde. Anderenfalls kann die Probe ohne weitere Maßnahmen eingesetzt werden. Hierbei werden Samen des Chinakohls unter definierten Bedingungen kultiviert. Nach Ablauf der Versuchszeit werden die Keimrate, die Frischmasse, das Gesamtpflanzenwachstum sowie eventuelle Abnormitäten dokumentiert. Die exakte Wirkung der Prüfsubstanz erfolgt durch Vergleich der Werte eines Kontrollansatzes. Sollten im Prüfboden grasbekämpfende Herbizide vorhanden sein oder der Verdacht darauf bestehen, so ist zusätzlich zum Chinakohl Sommergerste anzupflanzen. (ASI, 2011a)

ÖNORM EN 16086-2: 2011 12 15 Bodenverbesserungsmittel und Kultursubstrate — Bestimmung der Pflanzenverträglichkeit – Teil 2: Petrischalentest mit Kresse (ASI, 2011b)

Der zweite Teil der ÖNORM EN 16086 bestimmt die Auswirkungen von in den Boden eingebrachten Substanzen im Hinblick auf die Keimung von Kresse sowie die Entwicklung der Wurzeln kurz nach der Keimung. Die Ursache für den negativen Effekt auf die Jungpflanzen kann in phytotoxischen Substanzen liegen. Bei einer elektrischen Leitfähigkeit von mehr als $80 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$ wird empfohlen, die Probe mit Sphagnumtorf zu vermischen, diese Maßnahme führt jedoch dazu, dass die durch die hohe elektrische Leitfähigkeit hervorgerufenen Effekte nicht Teil der Untersuchungen sind.

Analog zur Vorgehensweise bei der Untersuchung der Effekte auf Chinakohl muss auch in diesem Fall auf die Beschaffenheit der Proben geachtet werden. Die meisten Kultursubstrate können direkt mit den Samen in den Petrischalen in Kontakt gebracht werden. Die Verwendung grobkörniger Materialien verlangt dagegen nach der Herstellung eines Extraktes. Mit diesem wird Filterpapier getränkt, welches anschließend mit den Kressesamen in Kontakt gebracht wird.

Die genaue Wirkung der Testsubstanzen wird durch einen Vergleich mit Kontrollansätzen festgestellt. (ASI, 2011b)

ÖNORM EN ISO 20963: 2011 08 15 Bodenbeschaffenheit – Auswirkungen von Schadstoffen auf Insektenlarven (*Oxythyrea funesta*) - Bestimmung der akuten Toxizität (ASI, 2011c)

Das in dieser Norm geschilderte Verfahren bestimmt die Wirkung von Prüfböden bzw. Testsubstanzen auf die Überlebensfähigkeit von Larven der Spezies *Oxythyrea funesta*. Die Aufnahme der Schadstoffe erfolgt sowohl über die Nahrung als auch über die Haut. Nach Ermittlung des erforderlichen Konzentrationsbereiches in einem Vortest findet der Haupttest statt. In diesem wird die Mortalität der Larven nach einem Zeitraum von zehn Tagen festgestellt. Das Ziel des Versuches ist die Bestimmung des LC₅₀-Wertes nach Vergleich der Mortalitätsrate in den Prüfböden mit der in einem Kontrollboden erhaltenen Rate. (ASI, 2011c)

ÖNORM EN ISO 22030: 2011 08 15 Bodenbeschaffenheit – Biologische Verfahren – Chronische Toxizität in höheren Pflanzen (ASI, 2011d)

In dieser Norm wird ermittelt, inwieweit Böden den Saataufwurf, das Wachstum sowie die Reproduktionsfähigkeit von höheren Pflanzen negativ beeinflussen. Für die Versuchsdurchführung wird die Verwendung einer schnell wachsenden Sorte der Stoppelrübe und von Hafer empfohlen. Der Test dient als Hilfsmittel zur Beurteilung der Qualität des Bodens als Lebensraum für Pflanzen, falls Prüfböden natürlichen Ursprungs eingesetzt werden.

Für die Durchführung des Tests werden vier Prüftöpfe herangezogen, in denen je zehn Samen gesät werden. Nach dem Auflaufen der Pflanzen in einer temperatur- und lichtgeregelten Umgebung wird die Auflauftrate gemessen sowie die Anzahl der Keimlinge pro Topf reduziert. Nach zwei Wochen erfolgt das Ernten des ersten Teils der Pflanzen, um Parameter an der Biomasse bestimmen zu können. Abhängig von der Wachstumsrate der eingesetzten Pflanzen findet nach drei bis sechs Wochen das Ernten der restlichen Pflanzen statt. Diese werden für Tests eingesetzt, die Aussagen über fortpflanzungsrelevante Faktoren treffen. (ASI, 2011d)

ÖNORM EN ISO 11269-1: 2013 02 01 Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora – Teil 1: Verfahren zur Messung der Wurzelwachstumshemmung (ASI, 2013b)

Der Einfluss von Bodenproben auf das Wurzellängenwachstum von Landpflanzen ist Gegenstand dieser Norm. Sie ist geeignet für die Untersuchung von Böden und Kompost, aber auch von Abfall und Klärschlamm. Die Dauer des Verfahrens hängt ab von den eingesetzten Pflanzen und beginnt mit der Aussaat der vorgekeimten Samen. Nach Abschluss der Wachstumsperiode erfolgt der Vergleich der Wurzellängen der Pflanzen in dem zu testenden Material mit denen in den Kontrollansätzen. Lassen sich signifikante Unterschiede in der Länge feststellen, gilt dies als Indikator für einen Einfluss des Bodens.

In der Norm werden die Getreidesorten Wintergerste, Hafer und Weizen für die Durchführung der Untersuchungen empfohlen. Bei Verwendung anderer einkeimblättriger Pflanzen ist zu berücksichtigen, dass die Wurzeln ungehindert in den Böden wachsen können. (ASI, 2013b)

ÖNORM EN ISO 11269-2: 2013 04 01 Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora – Teil 2: Wirkung von verunreinigten Böden auf Saataufbau und frühes Wachstum höherer Pflanzen (ASI, 2013c)

Ähnlich wie in der ÖNORM EN ISO 22030 wird auch in diesem Standardverfahren der Einfluss von Böden und Bodenbestandteilen auf das Wachstum und den Saataufbau von Pflanzen bestimmt. Dafür werden die Pflanzen im zu untersuchenden Boden sowie in einem Kontrollboden ausgesät. Falls erwünscht, können vom zu prüfenden Boden Verdünnungsreihen angesetzt werden. Nach Beginn des Keimens unter artspezifischen Bedingungen wird die Messung der Auflaufrate vorgenommen und die Pflanzen je Topf auf eine definierte Anzahl ausgedünnt. Nach etwa drei Wochen werden die Pflanzen geerntet, um Aussagen über deren Biomasse treffen zu können. Die relativ zum Kontrollboden ermittelte Wachstumshemmung im unverdünnten Prüfboden dient zur Feststellung, ob sich der Boden als Lebensraum für Pflanzen eignet.

Für die Prüfung werden sowohl ein- als auch zweikeimblättrige Arten parallel untersucht. Hierfür empfiehlt die Norm Hafer und Rübsen oder Stoppelrüben. Je nach genauer Fragestellung können auch andere Pflanzenarten herangezogen werden. (ASI, 2013c)

ÖNORM EN ISO 11267: 2014 05 15 Bodenbeschaffenheit – Hemmung der Reproduktion von Collembolen (*Folsomia candida*) durch Verunreinigungen (ASI, 2014)

Der Test zur Ermittlung der reproduktionshemmenden Wirkung von Bodenverunreinigungen oder einzelnen Substanzen auf Collembolen stellt einen chronischen Langzeitversuch dar. Die Aufnahme der Testsubstanzen findet über die Haut und die Nahrung statt. Für die Prüfung werden etwa zehn Tage alte Versuchstiere inkubiert bis die Eiablage und das anschließende Schlüpfen der Jungtiere erfolgt ist. Bis zu diesem Zeitpunkt vergehen im Kontrollansatz normalerweise 28 Tage. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse der Kontrolle mit den Resultaten der einzelnen Konzentrationen der Testsubstanz liefert die prozentuale Abnahme der im Versuchszeitraum geschlüpften Jungtiere sowie jene Konzentration, bei der kein negativer Effekt auf die Reproduktion der Collembolen beobachtet werden konnte. (ASI, 2014)

ÖNORM EN ISO 14238: 2014 01 15 Bodenbeschaffenheit – Biologische Verfahren – Bestimmung der Stickstoffmineralisierung und -nitrifizierung in Böden und der Einflüsse von Chemikalien auf diese Prozesse (ASI, 2014a)

In der vorliegenden Norm wird ein Verfahren zur Ermittlung des Grades der Stickstoffmineralisierung in den zu testenden Böden angegeben, welches dazu dient, Aussagen über die Bodenbeschaffenheit zu treffen. Die Wirkung von Chemikalien, insbesondere in toxischer Hinsicht, wird in einem weiteren Verfahren festgestellt. Im Boden vorhandene beziehungsweise, je nach Zielsetzung des Tests, hinzugefügte organische Stickstoffverbindungen werden durch Mikroorganismen in Ammonium, Nitrit, sowie Nitrat umgewandelt. Die Messung der Konzentration dieser Komponenten stellt den wichtigsten Schritt des Versuches dar. Ist der Einfluss bestimmter Chemikalien auf die Mineralisierung von Interesse, so werden unterschiedliche Mengen der Testsubstanz dem mit einer leicht abbaubaren Stickstoffquelle angereicherten Boden beigemischt. Die Hemmung der Produktbildung durch die Chemikalien wird mit einem Kontrollansatz verglichen. (ASI, 2014a)

ÖNORM EN ISO 16387: 2014 12 15 Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Verunreinigungen auf Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) – Bestimmung der Wirkungen auf die Reproduktion (ASI, 2014b)

In der in diesem Dokument geschilderten chronischen Prüfung wird die Wirkung von bodenverunreinigenden Substanzen auf die Fortpflanzungsfähigkeit von Würmern der Spezies *Enchytraeus sp.* festgestellt, um auf diese Weise die Eigenschaften des zu prüfenden Bodens als Lebensraum zu beurteilen.

Die Prüfung setzt sich aus einem kurzen Versuch, welcher einen Zeitraum von zwei Wochen überdauert und einem sechs Wochen andauernden Langzeit-Haupttest zusammen. Der Vorversuch dient zur Feststellung des Konzentrationsbereichs an Prüfsubstanz, welcher bei den Versuchsorganismen toxische Wirkungen hervorruft. In der Hauptprüfung wird das Überleben der adulten Würmer sowie die Anzahl der Jungtiere bestimmt. Falls erforderlich, kann der Versuch in zwei Schritte aufgeteilt werden, bei dem der erste in der Bestimmung der akuten Toxizität besteht, gefolgt von der Ermittlung der Effekte der Testsubstanz auf die Reproduktion. Den Abschluss der Auswertung bildet ein Vergleich der Ergebnisse der Prüfsubstanz mit den in einem Kontrollboden erhaltenen Daten. (ASI, 2014b)

ÖNORM EN ISO 18772: 2014 05 01 Bodenbeschaffenheit – Anleitung für Elutionsverfahren für die nachfolgende chemische und ökotoxikologische Prüfung von Böden und Bodenmaterialien (ASI, 2014c)

Diese Norm stellt eine Anleitung zur ordnungsgemäßen Durchführung von Elutionsprüfungen von Böden dar. Für den Einsatz derartiger Prüfungen wird zwischen zwei Fällen unterschieden: der Bestimmung des Elutionsverhaltens eines Bodens zur Abschätzung der Wirkung und für Vergleiche bzw. die Untersuchung auf Übereinstimmung.

Im ersten Fall setzt sich das Elutionsverfahren aus insgesamt sieben Schritten zusammen: nach der genauen Definition des Problems sowie des Lösungsansatzes erfolgt die Beschreibung von Szenario und Quelle. Sowie der Einfluss der szenariobezogenen Parameter auf die Elution ermittelt wurde, kann mit der Modellierung des Elutionsverhaltens begonnen werden. Die letzten zwei Schritte bestehen in der Validierung des Verhaltensmodells und einer zusammenfassenden Schlussfolgerung.

Elutionsprüfungen, welche die Untersuchung auf Übereinstimmung oder Vergleichszwecke zum Ziel haben, werden je nach den individuellen Anforderungen ausgearbeitet. Allen Prüfungen ist gemein, dass der zu testende Boden entweder chargiert oder dynamisch der Elutionslösung über eine definierte Zeitdauer ausgesetzt wird. Das gewonnene Eluat wird anschließend physikalisch, chemisch oder ökotoxikologisch untersucht. Bei der genauen Durchführung ist die Änderung einer Vielzahl von Parametern möglich. (ASI, 2014c)

ÖNORM EN ISO 11268-1: 2015 11 15 Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer – Teil 1: Bestimmung der akuten Toxizität auf Eisenia fetida / Eisenia andrei (ASI, 2015)

Die ÖNORM EN ISO 11268 setzt sich aus drei Teilen zusammen. Der erste Teil widmet sich der Bestimmung der akuten Toxizität, das heißt der unmittelbar letalen Wirkung auf die Testorganismen. Der zweite Teil beschreibt einen Test zur Bestimmung der chronischen Toxizität. Im engeren Sinne ist damit der Einfluss der Testsubstanz auf die Reproduktionsleistung der Regenwürmer gemeint. Der dritte Teil bestimmt schließlich die Wirkung von Schadstoffen unter Freilandbedingungen.

Die Norm ist darauf ausgelegt, sowohl Bodenproben im Hinblick auf ihre Eigenschaften als Lebensraum zu bewerten als auch die Toxizität von Bodenverunreinigungen bzw. Chemikalien zu bestimmen. Die zur Untersuchung herangezogenen Böden können einem breiten Spektrum entstammen, beispielsweise der Landwirtschaft oder der Sanierung kontaminierter Flächen.

Das Ziel des Toxizitätstests ist es, die letale Wirkung des zu prüfenden Bodens auf Regenwürmer der Arten *Eisenia fetida* oder *Eisenia andrei* im Vergleich mit einem Kontrollboden festzustellen. Ähnlich wie bei den Tests zur Bewertung der Toxizität von Wasserproben können auch hier Verdünnungsreihen angesetzt werden. In diesem Fall werden die Wirkungen auf die Würmer nach 7 und 14 Tagen bestimmt. Das Endergebnis soll einerseits den NOEC-Wert – diejenige Konzentration an Prüfsubstanz, bei der kein Effekt eintritt – und andererseits den nach 14 Tagen gültigen LC₅₀-Wert liefern. Wie die zuvor genannten Normen besteht auch diese aus einem Vortest zur Bestimmung des Konzentrationsbereiches für den Haupttest und einem anschließenden Hauptteil, in welchem die Konzentrationen ermittelt werden, welche eine Mortalität zwischen 10 und 90 % bewirken.

Der zu prüfende Boden sollte so schnell wie möglich nach der Probenahme dem Test unterzogen werden. Dadurch werden ein Abbau flüchtiger Stoffe, eine Änderung des pH-Wertes und eine Abweichung anderer bodenbezogener Eigenschaften verhindert.

Die Norm schreibt die Bestimmung der folgenden Faktoren bei der Untersuchung von Böden aus Freiflächen vor: pH-Wert, Textur, Wassergehalt, Wasserhaltekapazität, Kationenaustauschkapazität, sowie organischer Kohlenstoff. Vor Beginn der Versuche ist der Boden zu sieben, zu homogenisieren und bei Bedarf zu trocknen.

Für die Herstellung von Verdünnungen bzw. der Kontrollprobe kann je nach vorliegender Situation zwischen Referenzboden und Standardboden entschieden werden. Falls in der Nähe des beprobten Standortes Boden ähnlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften zur Verfügung steht, so ist dieser für die Referenzmessungen heranzuziehen. Anderenfalls, das heißt bei zu hoher toxischer Belastung, ist einem künstlich hergestellten Standardsubstrat der Vorzug zu geben. Dies trifft auch bei Toxizitätstests zu, die den Eintrag von Substanzen in den Boden vorsehen, um deren Wirkung festzustellen. Die Zusammensetzung des Standardbodens sowie seine Synthese sind in der Norm beschrieben.

Wie bereits erwähnt, kann ein Vorversuch angesetzt werden. Hierbei wird entweder der zu prüfende Boden mit aufsteigenden Anteilen an Kontrollboden im Bereich zwischen 0 und 100 % vermischt oder eine Prüfsubstanz dem Standardboden beigegeben. Hierbei erfolgt die Mengenangabe in der Einheit [mg Prüfsubstanz * (kg Kontrollboden)⁻¹]. Alternativ besteht die Möglichkeit, den Boden unvermischt zu testen.

Falls mit Verdünnungen gearbeitet wird, ist beim Haupttest eine geometrische Mischungsreihe zu erstellen. Weiters müssen von jeder Verdünnung mindestens vier Wiederholungen angesetzt werden.

Bei der Herstellung der Prüfmischungen ist folgendes zu beachten: soll ausschließlich eine Bodenprobe untersucht werden, so ist diese mit dem Kontrollboden im gewünschten Verhältnis zu homogenisieren und der Wassergehalt auf 40 bis 60 % einzustellen. In jedem Prüfgefäß soll sich die gleiche Masse befinden. Handelt es sich bei der Prüfsubstanz um wasserlösliche Verbindungen, so sind diese in Wasser zu lösen und dieses ist mit dem Bodensubstrat zu vermischen. Hierbei sind der letztendlich geforderte Wassergehalt sowie die angegebenen Anforderungen an den Kontrollboden zu berücksichtigen. Hydrophobe Substanzen sind in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel zu lösen. Nach Verflüchtigung desselben kann die notwendige Menge an Standardboden hinzugegeben werden. In dieser Situation muss zusätzlich zur Kontrollprobe eine weitere Kontrolle mit dem Lösungsmittel vorbereitet werden. Im Fall von Substanzen, welche weder in Wasser noch in organischen Lösungsmitteln löslich sind, ist eine Mischung aus Quarzsand und der Verbindung vorgesehen. Diese ist direkt mit dem Standardboden zu vermischen.

Nach Vorbereiten der Kontrollbehälter erfolgt die Zugabe der Regenwürmer in die einzelnen Gefäße. Hierfür werden für jede Verdünnung sowie die Wiederholungsmessungen inklusive

der Kontrollen je zehn Würmer eingesetzt. Diese sollen einer homogenen Population in Hinblick auf die Faktoren Alter, Größe und Masse entstammen. Vor Beginn der Versuche ist eine sorgfältige Reinigung der Würmer erforderlich. Anschließend sind die Testgefäße über einen Zeitraum von 14 Tagen in einen auf 20 °C temperierten Brutschrank zu stellen.

Nach sieben Tagen werden die Anzahl der toten Würmer sowie eventuell aufgetretene Symptome bei den lebenden Individuen festgehalten. Nach 14 Tagen findet der zweite Teil der Messungen statt: neben der Anzahl und Masse der überlebenden Tiere werden auch der Wassergehalt und der pH-Wert notiert. Der pH-Wert muss nur einmal pro Prüfkonzentration ermittelt werden; der Wassergehalt nur in einer der Kontrollbehälter. (ASI, 2015)

Betreffend der Gültigkeit der Ergebnisse schreibt die Norm die folgenden Bedingungen vor:

„Die Ergebnisse werden als valid angesehen, wenn:

- a) *die beobachtete prozentuale Mortalität der Kontrollen < 10 % ist, und*
- b) *der mittlere Biomasseverlust der Würmer in der Kontrolle 20 % nicht übersteigt.“*

(ASI, 2015:13)

ÖNORM EN ISO 11268-2: 2015 11 15 Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer – Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von Eisenia fetida / Eisenia andrei (ASI, 2015a)

Die Verfahrensweise dieser Norm ähnelt dem im ersten Teil der ÖNORM EN ISO 11268 beschriebenen Ablauf. Da das Ziel des Tests der Effekt toxischer Komponenten auf die Reproduktionswirkung der Würmer ist, dauert der Versuch insgesamt acht Wochen. Nach vier Wochen werden die Anzahl der überlebenden Tiere sowie beobachtete Auswirkungen auf die Biomasse festgehalten. Nach weiteren vier Wochen erfolgt das Auszählen der im Versuchszeitraum geschlüpften Nachkommen. Neben Prüfbehältern mit unterschiedlichen Verdünnungen an Versuchsboden wird ein Behälter mit Kontrollboden zur Ermittlung des Blindwerts herangezogen. Die Menge der anzusetzenden Prüfkonzentrationen hängt vom gewählten Messparameter – NOEC / NOER oder EC_x – ab. (ASI, 2015a)

ÖNORM EN ISO 11504: 2015 09 01 Bodenbeschaffenheit – Beurteilung der Wirkung von mit Mineralölkohlenwasserstoffen verunreinigten Böden (ASI, 2015b)

Im Fokus auf der Bewertung umweltbezogener Risiken aber auch Einflüsse auf die menschliche Gesundheit und anderer Gefährdungen werden in diesem Normenentwurf Empfehlungen für die Auswahl von auf Mineralöl basierenden Kohlenwasserstoffen für weitergehende Analysen abgegeben. Diese können sich in Böden, bodenähnlichen Materialien oder Sedimenten befinden. Mineralöl stellt eine Zusammensetzung aus Verbindungen unterschiedlicher Eigenschaften wie Migration, Verbleib und Toxizität dar. Um eine sinnvolle Aussage treffen zu können, ist es daher erforderlich, die einzelnen Bestandteile des Gemisches als auch das Gemisch selber insbesondere in Bezug auf die

Toxizität zu bewerten. Aufgrund der großen Anzahl an Verbindungen und ihrem in ihrer Gesamtheit unvorhersehbaren Verhalten ist es fast unmöglich, eine Expositionsbestimmung für das ganze Gemisch vorzunehmen. Aus diesem Grund wird nur eine im Hinblick auf die toxikologischen Eigenschaften repräsentative Gruppe an Verbindungen, die sogenannten Surrogatverbindungen, für die Prüfung herangezogen. Bei der Auswahl der Surrogatverbindungen ist, abgesehen von der Repräsentativität, zu beachten, dass angewandte Maßnahmen zur Risikominimierung auch die nicht quantifizierten Substanzen des Ölerzeugnisses berücksichtigen. Weiters sollen angewandte Analyseverfahren zur Risiko- und Expositionsbeurteilung nicht nur den Bereich Boden, sondern auch die Umweltsysteme Wasser und Luft in Betracht ziehen. (ASI, 2015b)

ÖNORM EN ISO 18187: 2016 08 01 Bodenbeschaffenheit – Feststoffkontakttest unter Verwendung der Dehydrogenaseaktivität von *Arthrobacter globiformis* (ASI, 2016a)

Dieser Normenentwurf beschreibt einen Test zur Beurteilung von Feststoffproben wie Böden oder Abfällen in Hinblick auf biologisch verfügbare toxische Substanzen. Das Testprinzip besteht in der Messung der Hemmwirkung der toxischen Substanzen auf die Dehydrogenaseaktivität der Testorganismen.

Nach Zugabe des Bakteriums *Arthrobacter globiformis* zur Probe und einer Bebrütungsdauer von 2 h bei 30 °C erfolgt die Zugabe des Redox-Farbstoffes Resazurin. Bedingt durch die Dehydrogenaseaktivität des Bakteriums wird der Farbstoff in Resorufin, eine fluorometrisch bestimmbare Substanz, umgewandelt. Über einen Zeitraum von einer Stunde findet eine regelmäßige Messung der Fluoreszenz und damit der Resorufinbildungsrate sowohl in der Probe als auch in einem Kontrollansatz statt. Da die Bildung von Resorufin und damit die Fluoreszenzemission proportional zur Dehydrogenaseaktivität sind, lässt sich eine Hemmung dieser Aktivität durch eine in der Probe reduzierte Fluoreszenz relativ zu jener in der Kontrolle feststellen. (ASI, 2016a)

2.3.3 Tests zur Ermittlung der Toxizität von Abfällen

Mit dem ökotoxikologischen Verhalten von Abfällen beschäftigen sich zwei europaweit gültige Dokumente: die ÖNORM EN 14375 beschreibt, wie Abfallproben für eine anschließende Ökotoxikologische Prüfung hergestellt werden sollen, während die Durchführung solcher Prüfungen im Technischen Bericht ONR CEN/TR 16610 geschildert wird. In Folge werden diese Vorschriften zusammengefasst.

ÖNORM EN 14735: 2006 08 01 Charakterisierung von Abfällen – Herstellung von Abfallproben für ökotoxikologische Untersuchungen (konsolidierte Fassung) (ON, 2006a)

Die Herstellung von Proben umfasst die Probenahme, den Transport sowie die Lagerung von Abfällen. Die Vereinheitlichung dieser Tätigkeiten sowie weitere Vorbereitungen zur Bestimmung der ökotoxikologischen Eigenschaften von Abfällen sind Gegenstand dieser Norm. Untersuchungen, die von der Norm berücksichtigt werden, schließen biologische

Prüfungen an Rohabfällen sowie an Eluaten ein. Die Prinzipien lassen sich auf feste wie auf flüssige Abfälle anwenden.

Bevor mit den Toxizitätsprüfungen begonnen werden kann, ist eine Charakterisierung der Proben erforderlich. Die wichtigsten zu bestimmenden Merkmale sind der pH-Wert, die Trockenmasse und das Wasserhaltevermögen; weiters ist darauf zu achten, das Material auf eine geeignete Korngröße zu bringen. Die Korngröße von mindestens 95 % der eingesetzten Probe darf nicht größer als 4 mm sein.

Der letzte Teil der Norm besteht aus Anweisungen, welche bei an Boden-, bzw. Wasserorganismen durchzuführenden Proben zu beachten sind. (ON, 2006a)

ONR CEN/TR 16110: 2011 02 01 Charakterisierung von Abfällen – Anleitung zur Anwendung von Ökotoxizitätsprüfungen auf Abfälle (CEN, 2010)

Für die Durchführung von Toxizitätstests auf Abfälle wird zwischen zwei grundlegenden Beweggründen unterschieden: von Interesse können entweder umweltgefährdende Eigenschaften sein, die von einem vorliegenden Abfall ausgehen oder die Modellierung eines spezifischen Expositionsszenarios inklusive der damit verbundenen Risiken. Dieser Technische Bericht befasst sich im Schwerpunkt mit vier Hauptanwendungsbereichen für Toxizitätsprüfungen.

Diese sind:

- a) *„grundlegende ökotoxikologische Charakterisierung;*
- b) *standortspezifisches Expositionsszenarium;*
- c) *Deponiemanagement [...];*
- d) *Abfallwiederverwertung[...].“ (CEN, 2010:5)*

Bei deponiebezogenen Tests wird weiter zwischen der Überwachung des anfallenden Sickerwassers sowie der Ablagerung mineralischer Abfälle auf Deponien, deren Parameter nicht ständig kontrolliert werden, differenziert. Die Wiederverwertung von Abfällen kann sich entweder auf Schlamm in der Landwirtschaft oder auf mineralische Abfälle im Straßenbau beziehen. Andere ökotoxikologische Untersuchungen sind ebenfalls möglich, jedoch werden sie nicht von dem vorliegenden Dokument behandelt. In solchen Fällen kann die Erarbeitung neuer Prüfmethode vonnöten sein. (CEN, 2010)

2.4 Auswahl eines geeigneten Toxizitätstests

Nach erfolgter Literaturrecherche über den derzeitigen Stand an gültigen Normen zur Bestimmung des Toxizitätspotentials von Umweltproben wurden diverse Kriterien zur Auswahl eines geeigneten Tests, welcher im Rahmen dieser Masterarbeit angewendet werden soll, beleuchtet. Nachdem die Entscheidung zugunsten des Versuches an Krebstieren der Gattung *Daphnia magna* Straus nach ÖNORM EN ISO 6341 getroffen

wurde, stellte der Bezug der Organismen sowie des Testequipments einen weiteren Teil der Recherchen dar.

2.4.1 Entscheidung für die Durchführung des vorliegenden Tests

Von Beginn an stand bei der Auswahl eines für eine Laborübung geeigneten Toxizitätstests ein solcher zur Beurteilung der Beschaffenheit von Wasser im Vordergrund. Weiters war wichtig, eine Übereinstimmung mit gesetzlich vorgesehenen Verfahren aufrechtzuerhalten. Auf diese Weise eingeschränkt, verblieben Normen mit einzelligen Grünalgen, Bakterien, Daphnien, Fischen sowie Tests zur Beeinträchtigung biologischer Abbauvorgänge an Belebtschlamm. Letztendlich ist die Entscheidung zu Gunsten des Daphnientests gefallen und dies aus mehreren Gründen:

- a) Da der Test wie oben bereits erwähnt nur für eine Laborübung entwickelt wird und nicht den Erwerb neuer Erkenntnisse zum Ziel hat, entfallen Versuche an höheren Organismen wie Fischen. Diese sind weder mit den ethischen Grundsätzen des Verfassers noch mit Paragraph 6 des Tierschutzgesetzes, in welchem ein Verbot der ungerechtfertigten Beibringung von Schmerzen und Leiden an Tiere ausgesprochen wird, konform.
- b) Die Tests an Bakterien entfallen aus praktischen Gründen: hierfür werden sterile Umgebungsbedingungen gefordert, wodurch sich die zeitliche Gesamtdauer der Versuche einhergehend mit einem vermehrten apparativen Aufwand erhöht. Da im Zuge der Lehrveranstaltung *Laborübungen zu Angewandte Umweltanalytik* mehrere Übungen zu absolvieren sind, soll der von den einzelnen Versuchen eingenommene Arbeitsaufwand ein vertretbares Maß nicht übersteigen. Selbiges Argument ist für die Validierung des Verfahrens, welche einen Teilschritt der Ausarbeitung des Versuches für zuvor erwähnte Übung darstellt, gültig – die Handhabung eines als steril auszuführenden Tests würde den zeitlichen wie experimentellen Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen.
- c) Tests an Grünalgen wären prinzipiell ebenfalls durchführbar, aus praktischen Gründen muss jedoch auch auf diese verzichtet werden: die Sammlung von Algenkulturen (SAG) der Universität Göttingen, Deutschland bietet ausschließlich lebende Kulturen zum käuflichen Erwerb an. Da für die Zucht und Hälterung einer solchen Kultur im Labor des Lehrstuhles für Abfallwirtschaft und Abfallverwertungstechnik die notwendige Infrastruktur nicht vorhanden ist und die Kulturen nur für einige Wochen im Jahr benötigt werden, empfiehlt sich deren Anschaffung nicht.
- d) Prüfungen zur Beeinträchtigung biologischer Abbauvorgänge, welche die negative Beeinflussung der ordnungsgemäßen Funktion von Belebtschlamm im Hinblick auf die Hemmung des Sauerstoffverbrauchs bzw. der Nitrifikation zum Ziel haben, sind vom gesetzlichen Standpunkt ebenfalls als Methode zur Feststellung des

Toxizitätspotentials von Abwasser vorgesehen. Einige der bereits bestehenden Einheiten der Laborübungen beschäftigen sich mit dem Ablauf von Kläranlagen und Parametern, welche mit Belebtschlamm und der Arbeitsweise von Wasserreinigungsanlagen assoziiert werden. Die auszuarbeitende Übung sieht sich als Ergänzung zu den vorliegenden, aus diesem Grund wird der Fokus auf eine in dem Zusammenhang neue Beurteilung des Umweltmediums Wasser gelegt.

- e) Obwohl der Test an Krebstieren der Gattung *Daphnia magna* nicht deren Tod sondern die Immobilisierung zum Endpunkt hat, widersprechen seine Ziele mit § 5 (2), Punkt 10 des Tierschutzgesetzes, welcher vorschreibt, dass die Exposition von Tieren gegenüber Witterungseinflüssen oder Bewegungseinschränkungen, woraus das Zufügen von Schmerzen, Leid oder anderen Schäden resultiert, verboten ist. Andererseits wird in der Literatur das Erreichen der Bewegungsunfähigkeit mit dem Eintreten des Todes gleichgesetzt, somit kann die Durchführung der Versuche unter Berufung auf § 6 (3) legitimiert werden, hierbei ist der Daphnientest als Alternative zu einem Test an Fischen zu sehen.

„Die Tötung von Tieren zum Zweck der Aus-, Fort- und Weiterbildung ist nur an wissenschaftlichen Einrichtungen und nur insoweit zulässig, als sie für den angestrebten Zweck unerlässlich ist und nicht durch alternative Methoden ersetzt werden kann“ (Tierschutzgesetz 2004, § 6 (3)).

- f) Die für den Test benötigten Organismen werden von dem in Belgien ansässigen Unternehmen MicroBioTests, Inc. bezogen. Neben bereits validierten Testkits, welche neben den Organismen auch Nährstoff- sowie Verdünnungslösungen enthalten, werden ruhende Ehippien mit einer Haltbarkeit von einigen Monaten zum Erwerb angeboten. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die Eier nach Bedarf durch Bebrüten unter Licht einer bestimmten Intensität zum Schlupf zu bringen. Dadurch entfällt der Aufbau einer gesonderten Infrastruktur, wodurch einerseits räumliche Kapazitäten im Labor als auch finanzielle Aufwendungen unter Kontrolle gehalten werden.

2.4.2 Einsatz von Krebstieren der Gattung *Daphnia magna* zur Beurteilung der Qualität von Wasser

Die Verwendung von Organismen der Spezies *Daphnia magna* im Zuge von Toxizitätstests bildet das zentrale Element unterschiedlicher Versuche welche an zahlreichen Instituten durchgeführt wurden. So beschäftigte sich unter anderem die in Nordspanien gelegene Universität des Baskenlandes mit dieser Thematik.

Die von Rodriguez et al. im Jahr 2006 durchgeführte Studie beschäftigte sich mit der Bewertung der Toxizität von kommunalem wie industriellem Abwasser in Nordspanien. Hierzu wurden drei auf dem Organismus *Daphnia magna* basierende Tests eingesetzt:

zweierlei akute Toxizitätstests sowie ein chronischer Reproduktionstest. (Rodriguez et al., 2006:560)

Die Proben setzten sich aus 45 Abwässern industriellen Ursprungs zusammen, wobei darauf geachtet wurde, ein möglichst breites Spektrum an Branchen abzubilden. So finden sich in der Liste an Probenahmestellen Abfallbehandlungsanlagen und metallverarbeitende Unternehmen neben Vertretern der chemischen Industrie.

Die durchgeführten akuten Toxizitätstests lassen sich gemäß ihrer eigentlichen Ausführung in die zwei Formen *pass/fail test* und *multi-concentration test* einteilen, wobei ersterer den Empfehlungen der amerikanischen Umweltschutzbehörde EPA entspricht und letzterer nach der ISO-Norm realisiert wurde.

Für den akuten Test nach EPA wurden je Probe zwei Ansätze mit Konzentrationen zu je 90 und 65 % sowie zwei Kontrollansätze mit entsprechend der Vorschrift zubereitetem Verdünnungswasser hergestellt. In jedes Testgefäß inklusive vier Wiederholungen pro Konzentration wurden fünf Daphnien eingebracht und über einen Zeitraum von 48 h darin belassen. Die Feststellung der Immobilität erfolgte sowohl nach 24 h als auch nach 48 h. (Rodriguez et al., 2006:563)

Der zweite akute Toxizitätstest wurde wie bereits erwähnt nach den Bestimmungen der international gültigen Norm ISO 6341 durchgeführt. Hierbei wurde zunächst ein Vortest welcher den Konzentrationsbereich von 0,01 bis 90 % abdeckte und anschließend ein Haupttest welcher jene Konzentrationen beinhaltetete, die im Vortest 0 bzw. 100 % Schwimmunfähigkeit hervorriefen, verwirklicht. Für den Haupttest waren sechs bis zwölf Verdünnungen pro Probe mit jeweils vier Replikaten vorgesehen. Während der zuvor beschriebene Versuch nur einen qualitativen Charakter besitzt, liefert der Test nach ISO eine quantitative Aussage – das Ziel besteht in der Ermittlung des EC_{50} . Beide akuten Toxizitätstests wurden mit sämtlichen zur Verfügung stehenden Proben ausgeführt (Rodriguez et al., 2006:563).

18 der 45 Proben wurden neben den akuten Auswirkungen auf Versuchstiere auf ihre chronischen Effekte hin untersucht. Für diesen Zweck wurden zunächst Verdünnungen hergestellt, deren Höchstwert dem zuvor bestimmten EC_{50} entsprachen und deren niedrigster Wert 1 % des EC_{50} betrug. Ein Zeitraum von etwa zwei Wochen wurde gewählt, um den Organismen die Möglichkeit der Entwicklung von drei Generationen zu bieten, während dieser Zeit wurde neben anderen Parametern regelmäßig die Beweglichkeit der Versuchsorganismen geprüft. Bei keiner der untersuchten Proben konnten auf die Reproduktion abträgliche Effekte oder eine Zunahme der Immobilität festgestellt werden. (Rodriguez et al., 2006:563f.)

Rodriguez et al. (2006) kommen im Zuge der von ihnen durchgeführten Studie zu mehreren Hauptaussagen bezüglich des Einsatzes ökotoxikologischer Tests zur Beurteilung des Auswirkungen von Abwässern auf aquatische Ökosysteme. Der vor allem in den USA

verbreitete *pass/fail test*, welcher nur zwei Konzentrationen der Probe untersucht, wird aufgrund seiner preiswerten und einfachen Durchführbarkeit als Mittel zur raschen Feststellung des Toxizitätspotentials einer Substanz oder eines Stoffgemisches sowie zur kontinuierlichen Qualitätsüberprüfung empfohlen. Weiters wurden keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen weder nach einer Exposition von 24 h bzw. 48 h noch bei einer Verdünnung von 65 oder 90 % beobachtet. Aus diesem Grund schlagen die Autoren vor, bei diesem Test eine Konzentration von 90 % über einen Zeitraum von 48 h, also das worst case-Szenario vorzusehen. (Rodriguez et al., 2006:569)

Bezüglich der Aussagekraft des EC_{50} wird darauf hingewiesen, dass dieser nur unter Laborbedingungen Gültigkeit besitzt, da in realen Bedingungen mit zahlreichen biotischen wie abiotischen Faktoren zu rechnen ist. Deren Einfluss auf die Entwicklung des Toxizitätspotentials einer Probe ist nur schwer zu prognostizieren. Im Hinblick auf Proben, bei welchen ein EC_{50} von über 100 % erhalten wird, besteht die Möglichkeit des Auftretens langfristiger toxischer Wirkungen, weswegen in solchen Fällen chronische Tests vorzusehen sind. Oft ist es jedoch aus Gründen wie den verbundenen Kosten oder der praktischen Umsetzbarkeit nicht möglich, neben einem akuten Test einen chronischen umzusetzen. Um diese Problemstellung zu adressieren, wurden Modelle entwickelt, welche eine Beziehung zwischen akuten Toxizitätswerten und chronischen Parametern herstellen. Doch auch hierbei ist Vorsicht bei der Interpretation geboten, da die Effekte auf die Organismen in Abhängigkeit der Einwirkdauer unterschiedlich sein können. (Rodriguez et al., 2006:569f.)

Letztendlich wird darauf aufmerksam gemacht, dass die Notwendigkeit besteht, eine Reihe an Tests mit Organismen unterschiedlicher Spezies sowie diverser trophischer Stufen durchzuführen. Hierdurch bietet sich ein breiteres sowie differenzierteres Bild über das Toxizitätspotential einer Probe wodurch das Setzen von Grenzwerten erleichtert wird. In der Praxis reicht die Anwendung des Tests an Daphnien zur Beurteilung von Abwässern aus. (Rodriguez et al., 2006:570)

2.4.3 Akuter Toxizitätstest zur Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von *Daphnia magna* Straus nach ÖNORM EN ISO 6341

Daphnien, kleine Krebstiere, sind für die Ermittlung der Toxizität von Wässern von Interesse, da sie in aquatischen Ökosystemen vorkommen. In ihrem natürlichen Lebensraum bilden sie zu einem Großteil das Zooplankton (ASI, 2013:4). Einflüsse auf diesen kleinsten Teil der Nahrungskette wirken sich auf sämtliche weiteren Wasserorganismen aus. Anthropogene Einflüsse, wie beispielsweise die Erhöhung der Toxizität von Wasser oder Abwasser lassen sich aus diesem Grund unter anderem auf Daphnien zurückverfolgen. Dies spricht für die Tauglichkeit von Krebstieren für den Einsatz als Testorganismus. Die ÖNORM EN ISO 6341 ist für die Untersuchung von Abwässern, Süßwasser, Eluaten bzw. Porenwasser von Süßwassersedimenten, wässrigen Extrakten und Sickerwasser vorgesehen. Weiters ist es möglich, mit der Vorschrift Chemikalien zu testen, sofern diese unter den Testbedingungen löslich sind; anderenfalls müssen sie stabile Suspensionen ausbilden.

Das grundlegende Element des Verfahrens liegt in der Bestimmung des EC_{50} -Wertes nach einem bestimmten Zeitraum, dieser beträgt entweder 24 oder 48 Stunden. Unter dem EC_{50} -Wert versteht man in diesem Falle die Konzentration an toxischer Substanz, die bei der Hälfte der eingesetzten Daphnien Schwimmunfähigkeit hervorruft.

Daphnien verfügen über die Fähigkeit, sich sowohl geschlechtlich als auch ungeschlechtlich fortzupflanzen, unter natürlichen Bedingungen sind beide Formen anzutreffen. Um den vorliegenden Toxizitätstest ordnungsgemäß durchführen zu können, ist es erforderlich, ausschließlich Individuen aus dem parthenogenetischen Vermehrungskreislauf einzusetzen. Das Erfüllen dieser Voraussetzung wird dadurch sichergestellt, dass den Tieren etwa eine Woche vor Beginn des eigentlichen Tests die Möglichkeit gegeben wird, sich auf die Testumgebung einzustellen. Sobald die Hälterungsbedingungen von den verlangten Umständen abweichen, kann dies als Stressfaktor empfunden werden. Dazu zählen die Anwesenheit von Männchen, Dauereier oder auch blasse Tiere. Im Allgemeinen gelten Überpopulation und Futterknappheit als die in der Natur am häufigsten eintretenden Stressoren. Die ungewohnte Änderung der Umgebung resultiert in einer Modifikation der Fortpflanzungsmethode der Krebstiere in die sexuelle Form und eine Entwicklung von weiblichen und männlichen Exemplaren. Durch die auf diese Weise bedingte Änderung in der Zusammensetzung der Testorganismen kann ein Vergleich der Versuchsergebnisse nicht mehr in aussagekräftiger Form herangezogen werden (ASI, 2013:7, 22). In Abbildung ist der Lebenszyklus der *Daphnia magna* schematisch wiedergegeben.

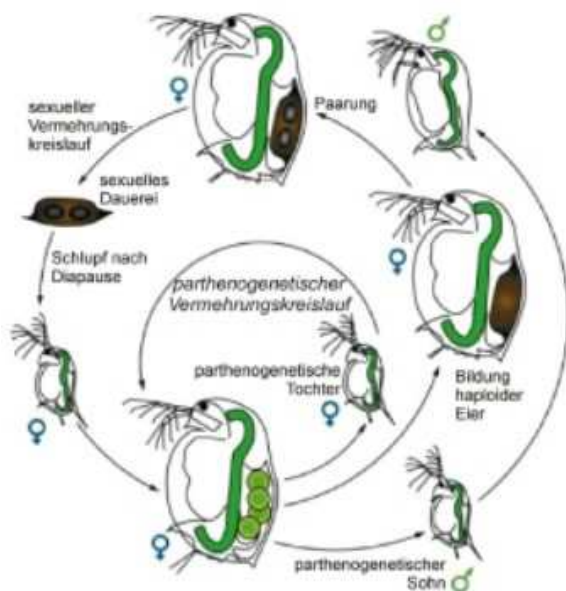


Abbildung 9: Lebenszyklus von *D. magna* (ASI, 2013:22)

Das Hälterungswasser muss jedenfalls so beschaffen sein, dass sich dieses für die Krebstiere nicht als Stressor auswirkt. In der Norm wird ein pH-Wert im Bereich von 6 bis 9 sowie eine $CaCO_3$ -Härte zwischen 140 und 275 $mg \cdot L^{-1}$ empfohlen (ASI, 2013:7). Hierfür kann natürliches Wasser, eigens zubereitetes Wasser oder entchlortes Leitungswasser

verwendet werden. Für die Stammhalterung der Daphnien ist M4-Medium ebenfalls geeignet. Seine Herstellung wird in der Norm beschrieben.

Der Test ist in einem möglichst kurzen Zeitraum – maximal 12 h – nach der Probenahme durchzuführen. Die Probe ist zu homogenisieren und bei Vorhandensein von starken Trübungen sind diese durch ein in der Norm beschriebenes Verfahren zu entfernen.

Die Norm ist sowohl für die Testung von festen als auch flüssigen Proben vorgesehen. Unabhängig davon sind die Proben in einem definiertem Volumen Verdünnungswasser zu lösen, um Stammlösungen herzustellen. Die Testlösungen werden durch das Hinzufügen von Stammlösung zum Verdünnungswasser gewonnen. Je nach Beschaffenheit der Probe sind unterschiedliche Verdünnungsfaktoren auszuwählen, für den eigentlichen Test sollen fünf Konzentrationen der Testsubstanz vorliegen. Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wird nahegelegt, für jede Konzentration vier Parallelansätze anzulegen und diese ebenfalls zu untersuchen. Dasselbe gilt für den Kontrollansatz.

Für den Test sind zunächst Testkonzentrationen herzustellen, indem volumengleiche Gefäße mit unterschiedlichen Verhältnissen an Testlösung und Verdünnungswasser aufgefüllt werden. Anschließend sind in jedes Gefäß fünf Daphnien einzusetzen, zusammen mit den Parallelansätzen werden daher zwanzig Tiere pro zu untersuchender Konzentration an Substanz benötigt. Hierbei ist das empfohlene Volumen von 20 mL Testlösung pro Versuchstier zu berücksichtigen. Während des Tests ist darauf zu achten, die Gefäße bei einer Temperatur von 20 °C zu lagern. Am Ende der Testzeit sind die schwimmunfähigen Krebstiere in den einzelnen Konzentrationsstufen zu ermitteln sowie der Konzentrationsbereich zu determinieren, bei dem eine Schwimmunfähigkeit von 0 bzw. 100 % der eingesetzten Testorganismen eintritt.

Sollte ein Vortest erforderlich sein, um den Konzentrationsbereich für den Haupttest zu bestimmen, so ist es nicht notwendig, mehr als eine Testreihe anzusetzen.

Der Haupttest hingegen muss mit Parallelansätzen durchgeführt werden. Von diesem Unterschied abgesehen verläuft der Test genauso wie auch der Vortest: fünf Daphnien pro Testgefäß werden bei 20 °C für 24 bzw. 48 h gehältert. Anschließend wird die Anzahl der schwimmunfähigen Individuen bestimmt. Zusätzlich muss der Sauerstoffgehalt in den Behältnissen mit dem Kontrollansatz und der höchsten Konzentration an Testsubstanz gemessen werden. Nachdem die folgenden Berechnungen so genaue Ergebnisse wie möglich liefern sollen, ist es erwünscht, mindestens drei Prozentwerte der Schwimmunfähigkeit zwischen 10 und 90 % zu erhalten. (ASI, 2013:12)

In der Norm werden abschließend zwei Kriterien genannt, welche erfüllt werden müssen, um die Ergebnisse als gültig ansehen zu können. Diese sind:

- a) *„Der Prozentsatz der schwimmunfähigen Daphnien in den Kontrollansätzen überschreitet 10 % nicht;*
- b) *Die 24 h-EC₅₀ von Kaliumdichromat liegt zwischen 0,6 mg*L⁻¹ und 2,1 mg*L⁻¹.“*
(ASI, 2013:13)

2.4.4 Herkunft der Organismen

Bei der Auswahl des für die Versuche einzusetzenden Testorganismus *Daphnia magna* stellt sich die Frage der Herkunft der Versuchstiere. Grundsätzlich bestehen zwei Möglichkeiten des Bezuges: entweder aus im Labor vor Ort gezüchteten Kulturen oder aus inaktiven Eiern, welche bei Bedarf ausgebrütet werden können.

Diese Entscheidung hängt zum einen von praktischen Gründen ab, wozu die im Labor vorhandene Infrastruktur zur dauerhaften Zucht der Tiere zählt. Hierbei muss neben der generellen Verfügbarkeit von für die Haltung notwendigen Ressourcen und Parametern wie Nährstoffe, Licht und Temperatur auch auf deren einheitliche Qualität geachtet werden. Bleibt beispielsweise die Zusammensetzung der zugeführten Nahrung nicht das ganze Jahr über konstant, so wirkt sich dies direkt auf die Daphnien und somit auf die Aussagekräftigkeit der Versuche aus. Dasselbe gilt für die Temperatur und chemische Beschaffenheit des Hälterungswassers sowie die Intensität des für die Zucht notwendigen Lichtes. Weiters ist die durchgehende Zucht von Testorganismen mit hohen laufenden Kosten verbunden, ein zusätzlicher Faktor, der zur Spezialisierung einiger weniger Labors auf Toxizitätstests geführt hat. Um die einfache und kostengünstige Durchführung solcher Überprüfungen einer größeren Anzahl von Institutionen zugänglich zu machen, wurden Anfang der 1980er Jahre Bestrebungen angestrengt, welche schließlich in der Entwicklung von Toxizitätsschnelltests gemündet ist. (Persoone et al., 2009)

Neben einer Vielzahl an Tests, welche mit unterschiedlichen Organismen arbeiten, wurde im Jahr 1998 der Toxizitätstest an Daphnien, Daphtoxkit F magna, im heutigen Laboratorium für Umwelttoxikologie der Universität Gent, Belgien entwickelt. Der Vorteil an diesem Test besteht darin, dass kryptobiotische Eier zur Verfügung gestellt werden, diese zeichnen sich durch lange Haltbarkeit unter Beibehaltung der Lebensfähigkeit über einen Zeitraum von mehreren Jahren aus. Unter dem Einfluss bestimmter äußerer Anreize wird die embryonale Entwicklung fortgesetzt und resultiert im Schlupf von Neonaten. Kryptobiotische Eier zeichnen sich durch eine Reduktion der Stoffwechselforgänge auf ein Mindestmaß aus; sie entstehen sowohl in der Natur als Resultat sexueller Fortpflanzung als auch im Labor unter bestimmten Bedingungen. (Persoone et al., 2009)

Ein weiterer wichtiger Punkt, welcher zur Entscheidung des Bezugs der Versuchstiere beiträgt, ist jener des Einflusses auf die Ergebnisse der Toxizitätsüberprüfungen. Hierzu wurde im Jahr 2009 von Persoone et al. eine Studie veröffentlicht, welche einen Vergleich der Organismen aus unterschiedlichen Kulturen im Hinblick auf die Präzision und

Empfindlichkeit der unternommenen Versuche zum Ziel hatte. Im Rahmen der Studie wurden Daten von insgesamt elf europäischen Instituten, welche die eingesetzten Organismen sowohl von Laborkulturen als auch aus inaktiven Eiern beziehen, ausgewertet. Die von den Labors durchgeführte Qualitätskontrolle bezieht sich auf die Ermittlung des 24 h-EC₅₀ der Referenzsubstanz Kaliumdichromat. In Abbildung sind die Ergebnisse graphisch dargestellt, erweitert durch den von der ISO ermittelten mittleren EC-Wert aus 1.700 Referenztests.

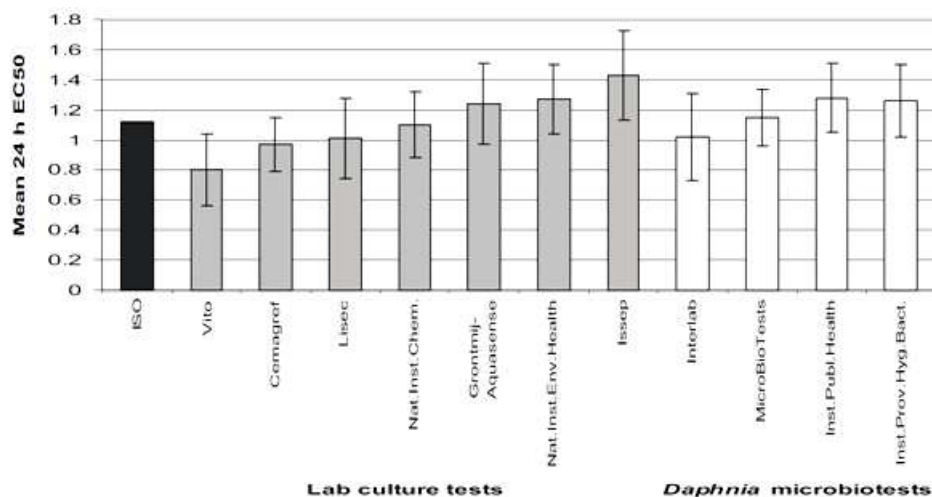


Abbildung 10: Mittlerer 24 h-EC₅₀ in mg*L⁻¹ für K₂Cr₂O₇. Neben dem Durchschnittswert ist auch die Standardabweichung der Ergebnisse angegeben (Persoone et al., 2009).

Die Auswertung der Daten zeigt, dass die meisten EC-Werte im Bereich der laut ISO gültigen 1,2 mg*L⁻¹ liegen. Wie in der Graphik ersichtlich, besteht bei den mit Daphnien aus Laborzucht erhaltenen Ergebnissen eine größere Schwankungsbreite des EC-Wertes als bei jenen Labors, welche auf vorgefertigte Tests zurückgreifen. Dies wird einerseits mit den von Institut zu Institut unterschiedlichen Zuchtbedingungen, andererseits mit dem Einsatz verschiedener Stämme an Krestieren erklärt. Als Maß für die Präzision der Testergebnisse wird der Variationskoeffizient herangezogen, dieser liegt bei den mit Laborkulturen durchgeführten Tests zwischen 18 und 30 %, während die Versuche mit Individuen aus kryptobiotischen Eiern Abweichungskoeffizienten im Bereich von 16 bis 28 % aufweisen. Beide Prozentangaben sind einander sehr ähnlich und können daher als ident angesehen werden. (Persoone et al., 2009)

Ferner wurden in der genannten Studie intra- wie auch interlaboratorielle Untersuchungen herangezogen, um der Frage nachzugehen, welche Bezugsform der Organismen besser für Toxizitätstests geeignet sei.

Testempfindlichkeit

Die Auswertung der Ergebnisse diverser Studien hat ergeben, dass Krestiere beider Bezugsquellen dasselbe Maß an Empfindlichkeit zeigen. Dies trifft sowohl auf einzelne Chemikalien als auch auf Umweltproben zu. Diese Beobachtungen werden durch die Aussagen mehrerer sich über einige Jahre erstreckender Qualitätskontrollen sowie

Ringversuche gefestigt, aus welchen hervorgeht, dass sich der EC einerseits stets nahe des von der ISO genannten Mittelwertes von $1,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ als auch in der Schwankungsbreite von $0,6 - 2,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ befindet. Letzterer Parameter stellt ein in der Norm verankertes Gültigkeitskriterium dar (Persoone et al., 2009).

Testgenauigkeit

Bei der Beobachtung des Einflusses der Herkunft der Organismen auf die Testgenauigkeit muss zwischen Tests, welche im Rahmen von Versuchsreihen in kurzer zeitlicher Folge wiederholt werden und über mehrere Jahre wiederkehrenden Qualitätsüberprüfungen differenziert werden. Für letztere Beurteilungen ist eine Abweichung der Genauigkeit zu erwarten, da die betroffenen Labors ihre Fähigkeiten, Routineprüfungen durchzuführen, kontinuierlich erweitern und verbessern. Wird ein Vergleich zwischen mehreren Laboratorien angestellt, besteht das Ziel in der Ermittlung einer mittleren Wiederholbarkeit; hierbei werden auch Institute mit einbezogen, welche das gegenständliche Verfahren nur selten einsetzen. In Zahlen ausgedrückt, befindet sich die Schwankungsbreite der Ergebnisse von auf einzelne Labors bezogene Langzeituntersuchungen im Bereich von 20 bis 30 %, einem Wert, der auch in der 1990 veröffentlichten Richtlinie zur Kontrolle der Genauigkeit von Toxizitätstests des kanadischen Umweltministeriums genannt ist. (Persoone et al., 2009)

Die hohe Schwankung der Präzision der Ergebnisse von interlaboratoriellen Untersuchungen mit einerseits sehr niedrigen Variationskoeffizienten im Bereich von 20 % aber andererseits auch verhältnismäßig hohen Werten von bis zu 90 % lässt sich auf zwei wesentliche Faktoren zurückführen: bei der Prüfung von Chemikalien hängt der Abweichungskoeffizient zu einem hohen Grad von der vorliegenden Substanz ab; wird hingegen ein Stoffgemisch im Hinblick auf seine Toxizität ermittelt, so ist – insbesondere bei Ringversuchen – auf eine einheitliche Probenvorbereitung Wert zu legen. Unterschiedliche Vorgangsweisen in dieser Beziehung können sich unvorteilhaft auf den Variationskoeffizient auswirken. (Persoone et al., 2009)

Letztendlich kommen Persoone et al. (2009) zu dem Schluss, dass mit Daphnien aus Ehippien durchgeführte Tests eine niedrigere Varianz und somit höhere Genauigkeit als solche mit Organismen aus Laborkulturen aufweisen.

Ein vom slowenischen National Institute of Chemistry (NIC) durchgeführter Ringtest an zwei Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen von etwa 20 Labors über einen Zeitraum von sieben Jahren war einer der Tests, welcher von Persoone et al. (2009) in deren Erhebung aus dem Jahr 2009 mit einbezogen wurde. Die Ziele der Studie waren im einzelnen (Cotman et al., 2009):

- Feststellung der Standardabweichung der Ergebnisse der einzelnen Institute,
- Ermittlung des Prozentsatzes an Teilnehmern, welche die Untersuchungen erfolgreich durchgeführt haben,

- die Beantwortung der Frage nach der Varianz in Abhängigkeit der chemischen Zusammensetzung diverser Metalle und ihrer unterschiedlichen Konzentrationen in den geprüften Proben, sowie
- die Erhebung des Einflusses der Herkunft des jeweils zum Einsatz kommenden Testorganismus.

Die vom NIC eingesetzten Versuchsorganismen entstammen einer Laborzucht, welche am Institut für Wasser, Boden und Lufthygiene des deutschen Umweltbundesamtes kultiviert werden. Die Zucht erfolgt bei einer Temperatur von 21 °C und einem 12 : 12 h Licht-Dunkel-Zyklus bei einer Lichtstärke von 1.800 lx gemäß den in der Norm genannten Bedingungen. Einige der an der Versuchsreihe teilnehmenden Laboratorien verfügen ebenfalls über eigene Laborzuchten an Daphnien, während andere auf Organismen aus in Testkits zur Verfügung gestellten Ehippien zurückgreifen. Die zu untersuchenden Proben waren mit Reinchemikalien simulierte Abwässer; die Herstellung, Prüfung auf Homogenität und Stabilität sowie anschließende Auslieferung an die Teilnehmer erfolgte durch das NIC. Probe T1 beinhaltete $K_2Cr_2O_7$, eine Verbindung, welche von der Norm als Referenzsubstanz bezeichnet wird, T2 setzte sich zum Großteil aus Zinkacetat zusammen.

Nach Auswertung der Ergebnisse wurde die in den Abbildungen 11 und 12 gezeigte graphische Darstellung des Variationskoeffizienten erhalten.

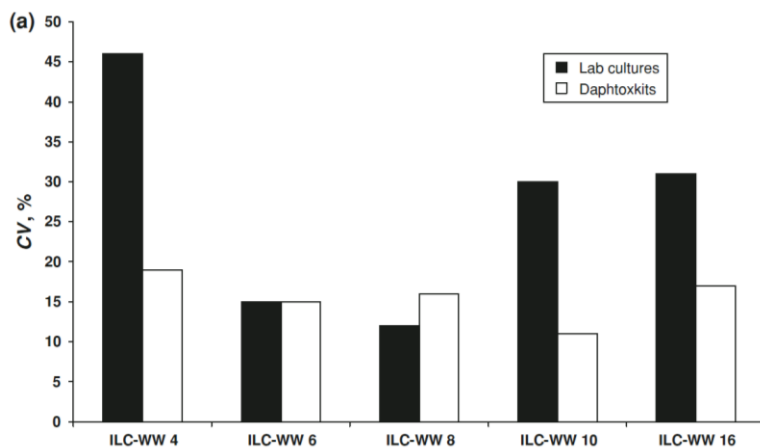


Abbildung 11: Variationskoeffizienten der für Probe T1 erhaltenen Ergebnisse im Vergleich von Daphnien aus Laborzuchten mit Organismen aus vorkultivierten Ehippien (Cotman et al., 2009)

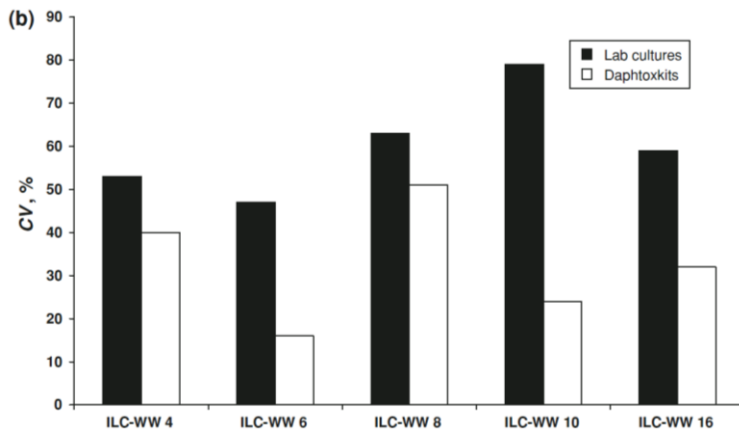


Abbildung 12: Variationskoeffizienten der für Probe T2 erhaltenen Ergebnisse im Vergleich von Daphnien aus Laborzuchten mit Organismen aus vorkultivierten Ehippien (Cotman et al., 2009)

Die Studienautoren kommen zu dem Schluss, dass die Differenz in den Variationskoeffizienten unabhängig von der untersuchten Probe ist, weiters ist keine Abnahme der Werte im Verlauf des Zeitraumes, in dem die Studie durchgeführt wurden zu beobachten. Eine solche Entwicklung wäre mit zunehmender Erfahrung des Laborpersonals zu erwarten gewesen. Die biologische Herkunft der Testorganismen hat keinen nennenswerten Einfluss auf die erhaltende 24 h-EC₅₀, bei Betrachtung der auf die Resultate im Vergleich zwischen den einzelnen Laboratorien bezogenen Genauigkeit werden jedoch beträchtliche Unterschiede zwischen Daphnien aus Laborzuchten und Versuchstieren aus kryptobiotischen Eiern deutlich. Dies wird dadurch erklärt, dass die Stammkulturen der Laborzuchten von Institut zu Institut unterschiedlich sein können, während die Ehippien in sämtlichen Fällen von dem oben bereits erwähnten belgischen Unternehmen MicroBioTests, Inc. bezogen wurden.

3 Experimenteller Teil






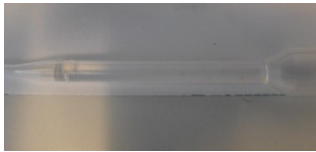

Toxizitätstests zeichnen sich dadurch aus, dass für ihre ordnungsgemäße Durchführung in den meisten Fällen Equipment herangezogen werden muss, welches in einem herkömmlichen Labor nicht vorhanden ist. Für den in gegenständlicher Arbeit umgesetzten Test ist ein kommerziell erhältliches Testkit verfügbar, welches die notwendigen Materialien inklusive der Organismen für die Versuchsdurchführung enthält. Neben einem Vergleich der Testmethode nach der Norm mit jener mittels des Toxkits im Hinblick auf die Praktikabilität waren die zu berücksichtigenden Kosten für einen Versuch von Interesse.

3.1 Beschreibung des notwendigen Equipments

Das Verfahren zur Toxizitätsbestimmung von Proben mittels Organismen der Spezies *Daphnia magna* ist durch den hohen Spezialisierungsgrad der benötigten Materialien charakterisiert. Die in einem herkömmlichen chemischen Labor vorhandene Ausstattung muss oft für die ordnungsgemäße Durchführung des Versuches erweitert werden. Neben der Beschaffung der einzelnen Gegenstände besteht die Möglichkeit des Bezugs von zusammengestellten Garnituren durch darauf spezialisierte Unternehmen. Ein Beispiel für ein solches Set ist das Daphtoxkit F magna des belgischen Anbieters Microbiotests, Inc.

Das Toxkit zeichnet sich dadurch aus, dass sämtliche für den Versuch benötigte Chemikalien sowie Materialien beinhaltet sind. Neben Phiolen mit Ehippien und den zur Herstellung des Verdünnungswassers erforderlichen Salzlösungen umfasst der Lieferumfang Mikrosiebe, Pipetten, Petrischalen sowie Testgefäße. Zusätzlich sind Algen enthalten, welche bei Bedarf, insbesondere bei einer Testdauer von 48 h, als Futtermittel für die Organismen dienen. Zur Aufzeichnung der Ergebnisse sind entsprechende Tabellen zur Aufzeichnung der Beobachtungen beigelegt. In Tabelle 6 ist eine Übersicht über den Lieferumfang des Toxkits gegeben, die beinhaltet sechs Folien Parafilm zur Versiegelung der Oberfläche der Testgefäße, um Verdunstungseffekte auszuschließen sind nicht abgebildet. Der Inhalt eines Toxkits ist für die Durchführung von sechs Versuchen vorgesehen.

Tabelle 6: Übersicht über den Lieferumfang des Toxkits



Produkt	Beschreibung	Anzahl	Abbildung
Phiole mit Ehipprien	Zum Schutz vor Licht in Folie verpackt, eine Einheit reicht für einen Test.	6	
Flasche mit NaHCO ₃ -Lösung	Die in einer Flasche enthaltene Menge Salzlösung reicht für 2 L Verdünnungswasser.	2	
Flasche mit CaCl ₂ * 2 H ₂ O - Lösung	Die in einer Flasche enthaltene Menge Salzlösung reicht für 2 L Verdünnungswasser.	2	
Flasche mit MgSO ₄ * 7 H ₂ O - Lösung	Die in einer Flasche enthaltene Menge Salzlösung reicht für 2 L Verdünnungswasser.	2	
Flasche mit KCl - Lösung	Die in einer Flasche enthaltene Menge Salzlösung reicht für 2 L Verdünnungswasser.	2	
Pipetten	Dienen zur Überführung der Daphnia magna vom Zuchtgefäß in die Testgefäße.	6	
Mikrosieb	Wird beim Ansatz einer neuen Zucht benötigt.	1	

<p>Petrischalen</p>	<p>Werden zur Zucht der Organismen benötigt.</p>	<p>6</p>	
<p>Algensubstrat</p>	<p>Liegt in getrockneter Form vor, kann bei Bedarf als Futtermittel eingesetzt werden.</p>	<p>6</p>	
<p>Testgefäße</p>	<p>Das Raster enthält Vertiefungen für die Kontrolle und fünf Verdünnungen der Probe, weiters sind je vier Replikate möglich.</p>	<p>6</p>	
<p>Bedienungsanleitung</p>	<p>Detaillierte Beschreibung des Verfahrens.</p>	<p>1</p>	
<p>Kurzanleitung</p>	<p>Zusammenfassung des Verfahrens.</p>	<p>1</p>	
<p>Ergebnistabelle</p>	<p>Dient zur Aufzeichnung der Beobachtungen.</p>	<p>6</p>	
<p>Spezifikationsangabe</p>	<p>Enthält Informationen zu den mitgelieferten Ehippien.</p>	<p>1</p>	

Zur Zucht sowie zur Inkubation der Organismen während der Dauer des Versuches ist es erforderlich, eine Umgebungstemperatur von 20 bis 22 °C sicherzustellen. Hierzu werden von diversen Herstellern Inkubatoren angeboten, welche sich durch unterschiedliche Eigenschaften auszeichnen. Ein solches Gerät ist das Modell HIP110Plus des deutschen Unternehmens Memmert. Dieses ist neben einem einstellbaren Temperaturbereich von 0 bis 70 °C mit zahlreichen Zusatzfunktionen ausgestattet. Dazu zählen eine Netzwerkverbindung zur Online-Protokollierung der Daten, ein USB-Anschluss sowie ein integriertes Speichermodul um Daten über einen Zeitraum von bis zu zehn Jahren zu sichern (Lactan GmbH, 2017). Durch die angewandte Peltier-Technologie verspricht der Hersteller ein Energieeinsparungspotential von maximal 90 % gegenüber dem in herkömmlichen Modellen zum Einsatz kommenden Kompressorbetrieb (Memmert GmbH, 2017:16). Der Nachteil des Systems liegt darin, dass die Beleuchtungselemente nicht ab Werk vorhanden sind, sondern eigens dazu bestellt werden müssen. Wird das Gerät mit Licht betrieben, so kann die Innentemperatur nur mehr im Bereich von 10 bis 40 °C reguliert werden (Lactan GmbH, 2017). Ein weiterer Punkt, welcher gegen dieses Modell spricht, ist die fehlende Möglichkeit der Inbetriebnahme weiterer Geräte. Einige Toxizitätstests, insbesondere solche an Bakterien, verlangen eine kontinuierliche Bewegung der Testgefäße während des Versuchszeitraumes. Eine vergleichsweise einfach umzusetzende Option diese Anforderung zu realisieren besteht im Anschluss eines Schüttelmoduls im Inkubator, hierzu ist das Vorhandensein einer Steckdosenleiste im Innenraum wünschenswert. Solch ein Bauteil ist, ähnlich wie die Beleuchtung, nur als Zubehör verfügbar (Memmert GmbH, 2017:19).

Ein von Liebherr hergestelltes Alternativgerät wird von MicroBioTests vertrieben. Bei diesem handelt es sich um einen temperaturisolierten Schrank mit einem Nutzvolumen von 180 L und einem einstellbaren Temperaturbereich zwischen 2 und 40 °C. Die Innenbeleuchtung kann über vier voneinander unabhängige Leuchtstoffröhren reguliert werden, weiters ist eine Steckdosenleiste mit drei Anschlüssen integriert, um bei Bedarf weitere Geräte anzuschließen (MicroBioTests, Inc., 2017). Dieses Modell überzeugt durch seine einfache Ausstattung, welche dennoch sämtliche Anforderungen an einen Brut- und Inkubationsschrank erfüllt. In Tabelle 7 ist ein Vergleich der Geräte gegeben.

Tabelle 7: Vergleich zur Verfügung stehender Brutschränke (Lactan GmbH, 2017; Memmert GmbH, 2017; Microbiotests, Inc., 2017)

Modell	Memmert IPP110plus	Liebherr FKU 1800
Nutzvolumen [L]	108	180
Temperaturbereich ohne Licht [°C]	0 – 70	2 – 40
Temperaturbereich mit Licht [°C]	10 – 40	2 – 40
Beleuchtung integriert	Nein	Ja, 4 Leuchtstoffröhren zu je 8 W
Steckdosen integriert	Nein	Ja, 4 Stk.
Kühltechnologie	Peltier-Element	Kompressor
Listenpreis ohne Zubehör [€]	4.179,00	2.259,40
Abbildung		

3.2 Gegenüberstellung von Norm und Toxkit

Betrachtet man die für die Ausführung der Versuche zusätzlich zu den bereits im Labor vorhandenen notwendigen Materialien, lässt sich eine Gegenüberstellung der Kosten aufstellen. In Tabelle 8 sind die Kosten der bereits in einem Labor befindlichen Gegenstände angeführt, hierbei handelt es sich fast ausschließlich um Pipetten sowie Messkolben.

Tabelle 8: Kosten der für den Versuch notwendigen Pipetten sowie Messkolben

Produkt	Modell	Anbieter	Preis [€]
Pipette 5 mL	Blaubrand Eterna	Lactan GmbH	5,35
Pipette 10 mL	Blaubrand	Lactan GmbH	5,90
Pipette 25 mL	Blaubrand Eterna	Lactan GmbH	7,65
Pipette 100 mL	Blaubrand	Lactan GmbH	14,10
Pipettierball	Universalmodell	Lactan GmbH	13,60
Kolbenhubpipette 1.000 µL	Eppendorf Research, 100 – 1.000 µL	Lactan GmbH	242,00
Pipettenspitzen	50 – 1.000 µL	Lactan GmbH	21,70 (1.000 Stk.)
Messkolben 50 mL	Blaubrand	Lactan GmbH	17,20
Messkolben 100 mL	Blaubrand	Lactan GmbH	94,75 (5 Stk.)
Messkolben 1.000 mL	Blaubrand	Lactan GmbH	47,70
Messkolben 2.000 mL	Blaubrand	Lactan GmbH	65,30

Tabelle 9 bietet einen Überblick über Produkte, welche zusätzlich erworben werden müssen, ergänzend ist der Preis des Toxkits angegeben.

Tabelle 9: Übersicht über die für den Versuch zu erwerbenden Materialien

Produkt	Anbieter	Verpackungseinheit	Preis einer Einheit [€]	Preis für die benötigte Menge [€]
Ehippien	Microbiotests, Inc.	10 Stk.	280,00	28,00
Mikropipetten	Microbiotests, Inc.	10 Stk.	7,80	0,78
Mikrosiebe	Microbiotests, Inc.	10 Stk.	41,70	4,17
Petrischalen, d = 55 mm	Microbiotests, Inc.	15 Stk.	2,90	0,19
CaCl₂ * 2 H₂O ≥ 99,0 %, p.a., ACS	Carl Roth GmbH	500 g	12,40	0,29
MgSO₄ * 7 H₂O ≥ 99,0 %, p.a., ACS	Carl Roth GmbH	500 g	17,20	0,17
NaHCO₃ ≥ 99,5 %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH	500 g	13,80	0,07
KCl, ≥ 99,5 %, p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH	500 g	12,95	0,006
Testwells	Microbiotests, Inc.	10 Stk.	86,85	8,68
Parafilm-Folien	Microbiotests, Inc.	10 Stk.	9,30	0,93
Inkubator	Microbiotests, Inc.	1 Stk.	2.259,40	2.259,40
Daphtoxkit F magna	Microbiotests, Inc.	1 Stk, geeignet für 6 Tests	290,00	48,33

In Tabelle 10 sind die Kosten für die Durchführung eines Tests nach den einzelnen Verfahren angeführt.

Tabelle 10: Gegenüberstellung der Kosten für einen Test

Kosten bei Einzelkauf aller Materialien [€]	Kosten bei Erwerb des Toxkits [€]
2.772,64	2.795,28

Unter der Annahme, dass die standardmäßig vorhandenen Ausstattungsgegenstände inklusive des Inkubators zur Verfügung stehen, kommt man auf den in Tabelle 11 gezeigten Kostenvergleich.

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Kosten für einen Test bei Vorhandensein der gängigen Laborutensilien sowie des Inkubators

Kosten bei Einzelkauf aller Materialien [€]	Kosten bei Erwerb des Toxkits [€]
43,29	48,33

Fällt die Entscheidung zugunsten des Erwerbs des Toxkits, so ist mit erhöhten Ausgaben von ca. 5 € pro Test zu rechnen. Muss zusätzlich noch das passende Labormaterial beschafft werden, so entsteht durch den zur Herstellung des Verdünnungswassers notwendigen Messkolben mit einem Volumen von 2 L eine Kostendifferenz von etwa 22 €. Der Kolben, welcher für die Mischung des normgemäß synthetisierten Verdünnungswassers eingesetzt wird, weist ein Volumen von einem Liter auf. Die Vorteile des Toxkits liegen in der Auslieferung der meisten Materialien in einer Einheit, insbesondere bei den für die Herstellung des Verdünnungswassers benötigten Chemikalien ist das Labor nicht von eventuellen Lieferschwierigkeiten eines weiteren Händlers abhängig. Die sonstigen Produkte wie Epphippen oder Testgefäße werden vom selben Anbieter wie jenem des Toxkits vertrieben, in diesem Punkt ist als Vorteil zu sehen, dass die Suche der benötigten Komponenten aus dem Katalog des Lieferanten entfällt.

Sollte ein Labor, welches die Durchführung eines Versuches zur Ermittlung der Toxizität an Organismen der Spezies *Daphnia magna* plant, die zur Synthese des Verdünnungswassers erforderlichen Salze zur Verfügung haben, so ist es ratsam, die weiteren Materialien einzeln zu beziehen, statt auf das fertig zusammengestellte Toxkit zurückzugreifen. Da die genannten Salze oft Verwendung im analytischen Bereich finden, kann davon ausgegangen werden, dass ein durchschnittliches Laboratorium diese in seinen Beständen besitzt. Weiters umfasst der Lieferumfang der meisten Materialien zehn Einheiten, somit besteht die Möglichkeit mehr Tests, als mit dem Inhalt des Toxkits durchzuführen.

3.3 Versuchsbeschreibung

Im Wesentlichen lässt sich der Versuch in drei Schritte wie in Abbildung 13 gezeigt unterteilen: zunächst musste das Verdünnungswasser hergestellt werden, welches sich aus Lösungen der Salze $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 sowie KCl zusammensetzt. Hierbei ist zu beachten, dass das Toxkit Stammlösungen dieser Salze in der erforderlichen Konzentration beinhaltet, wodurch das Abwägen der erforderlichen Menge entfiel.

Unter Zuhilfenahme des Verdünnungswassers erfolgte die Anzucht der Organismen. Für einen Versuch wurde der Inhalt einer Phirole an Ehippien von etwaigen Rückständen befreit bevor der Transfer in ein Zuchtgefäß erfolgte. Anschließend fand die Zucht bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ über einen Zeitraum von 72 h und konstanter Beleuchtung statt.

Für die eigentliche Versuchsdurchführung war eventuell eine Vorbereitung der Probe und gegebenenfalls der Ansatz eines Eluats erforderlich. Im Anschluss daran wurden die Verdünnungsreihen hergestellt und Testorganismen in die mit verdünnter Probe befüllten Testgefäße eingesetzt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach einer Inkubationszeit von 24 h im Dunkeln bei einer Temperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$.



Abbildung 13: Übersicht über die notwendigen Schritte zur Versuchsdurchführung

3.3.1 Vorbereitungen für die experimentellen Versuchsreihen

3.3.1.1 Herstellung des Verdünnungswassers

Vor Beginn des Versuches wurde das Verdünnungswasser laut der in der Vorschrift genannten Zusammensetzung hergestellt. Das Verdünnungswasser nach der Norm und jenes des Toxkits wurden nach leicht unterschiedlichen Methoden erzeugt.

Verdünnungswasser nach der Norm

Das normgemäß hergestellte Verdünnungswasser setzte sich aus den folgenden in Tabelle 12 genannten Lösungen zusammen.

Tabelle 12: Stammlösungen des Verdünnungswassers gemäß den Vorgaben in der Norm

Komponente	Konzentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	11,7635
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	4,9312
NaHCO_3	2,5918
KCl	0,2299

Um das Verdünnungswasser zu erhalten, wurden je 25 mL jeder Lösung in einem Messkolben vereint und dieser auf ein Volumen von 1 L aufgefüllt. Die Belüftung des Wassers erfolgte durch Rühren für mindestens 15 min bis der Sättigungswert an Sauerstoff erreicht wurde. Der pH-Wert des Wassers sollte im Bereich von $7,8 \pm 0,5$ liegen. Das für die Zucht der kryptobiotischen Eier erforderliche Volumen wurde dem Gefäß entnommen, während die verbleibende Menge zur Vermeidung eines eventuellen Abbaus der Salze bei max. 5 °C eingekühlt wurde.

Verdünnungswasser des Toxkits

Im Toxkit sind zwei Sätze an Stammlösungen enthalten, wovon einer für die Durchführung von drei Tests ausgelegt ist. In Tabelle 13 ist die Menge der Salze in den Flaschen sowie die Konzentration der Lösung angegeben.

Tabelle 13: Stammlösungen des Verdünnungswassers wie im Toxkit mitgeliefert

Komponente	Menge in der 12 mL fassenden Flasche [mg]	Konzentration in [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$] nach Auflösung in 2 L
NaHCO_3	129,5	64,75
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	588,0	294,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	246,5	123,25
KCl	11,5	5,75

Für die Herstellung des Verdünnungswassers wurde zunächst 1 L zuvor über Ionentauscher und Aktivkohlefilter gereinigtes Leitungswasser mit einer Leitfähigkeit unter $0,055 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ in einen 2.000 mL – Messkolben vorgelegt. Anschließend wurden die Stammlösungen der Salze in der in Tabelle 13 angegebenen Reihenfolge dem Kolben hinzugefügt und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Nach Homogenisierung erfolgte, analog zum normgemäß hergestellten Verdünnungswasser eine Belüftung der Lösung für mindestens 15 min. Bei diesem Wasser wurden ebenso pH-Wert und Sauerstoffgehalt gemessen, bevor das für die Zucht benötigte Volumen entnommen wurde.

3.3.1.2 Zucht der Organismen

Die Anzucht der für den Versuch benötigten Organismen lässt sich in mehrere Teilschritte aufteilen:

- Überführen des Inhalt eines Röhrchens an Ehipprien in ein Mikrosieb der Maschenweite $100 \mu\text{m}$,
- Ausspülen des Siebes mit Leitungswasser, um eventuelle Rückstände zu entfernen,
- Transferieren der Ehipprien aus dem Sieb in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 5,5 cm mithilfe von 15 mL Verdünnungswasser und
- Inkubieren der Eier bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und kontinuierlicher Beleuchtung von mindestens 6.000 lx über einen Zeitraum von 72 h.

Die Abbildungen 14 bis 18 veranschaulichen die einzelnen Schritte bei der Vorgehensweise eines Zuchtansatzes.



Abbildung 14: Benötigte Materialien zur Zucht: 15 mL Verdünnungswasser, Mikrosieb, Petrischale und ein Tube Ehipprien



Abbildung 15: Überführen des Inhaltes der Phirole in das Mikrosieb



Abbildung 16: Transfer der Ehippien vom Sieb in die Petrischale mithilfe von Verdünnungswasser

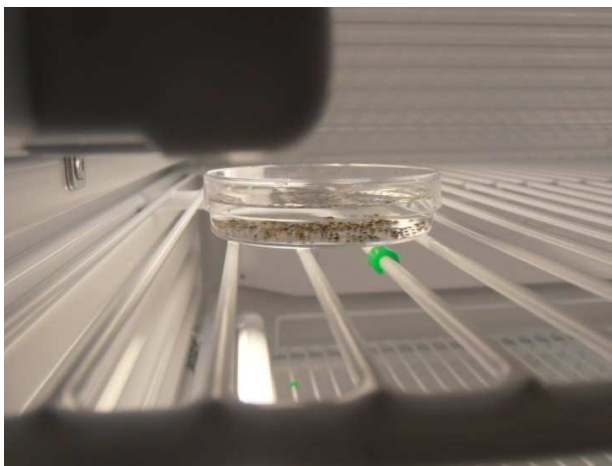


Abbildung 17: Inkubation der Eier im Brutschrank bei konstanter Beleuchtung von 6.000 lx; Positionierung der Petrischale 1 cm unter der Lichtquelle

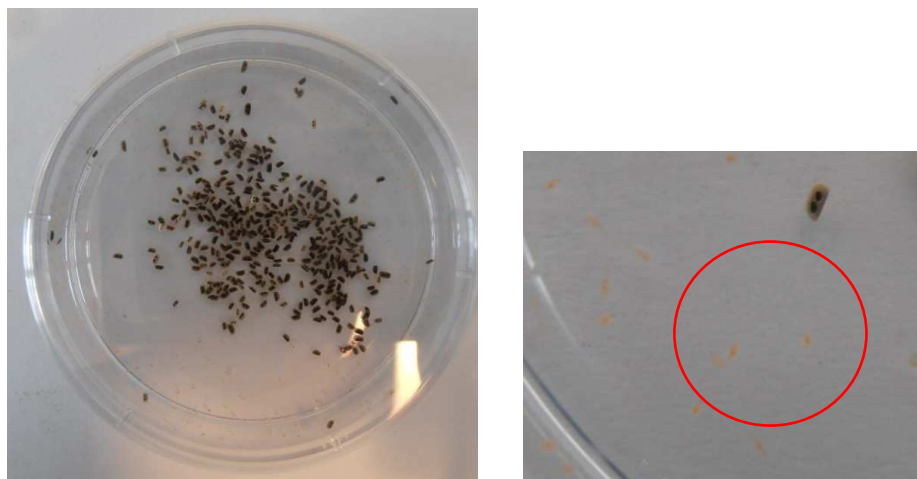


Abbildung 18: Schlupf der ersten Neonaten nach 72 h

3.3.2 Durchführung der experimentellen Versuchsreihen

Vor Herstellung der Verdünnungen wurden Sauerstoffgehalt sowie pH-Wert des auf 20 °C temperierten Verdünnungswassers sowie der Probe gemessen. Anschließend wurde eine geometrische Verdünnungsreihe angefertigt, welche zum Ziel hatte, den Verdünnungsfaktor G zu bestimmen (vgl. Anhang F der Norm). Unter dem Faktor G versteht man den am höchsten konzentrierten Testansatz, bei dem – mit Ausnahme der testspezifischen Schwankung – nur geringfügige Effekte beobachtet werden. Anders ausgedrückt steht der G-Wert für die niedrigste unwirksame Verdünnung (ASI, 2013:25). Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, Verdünnungsreihen wie in Tabelle 14 dargestellt hergestellt.

Tabelle 14: Für die Versuche hergestellte Verdünnungen

Verdünnungsstufe G	Volumen Probe [mL]	Volumen Verdünnungswasser [mL]
1	100	0
2	50,0	50,0
4	25,0	75,0
6	16,70	83,30
8	12,50	87,50

Von den Verdünnungen wurden, analog zum Verdünnungswasser und der Probe ebenfalls der pH-Wert sowie der Sauerstoffgehalt bestimmt. Von jeder Verdünnung wurden 10 mL in jedes Testgefäß pipettiert, ebenso wurde mit dem als Kontrolle dienenden Verdünnungswasser verfahren. In die linke Spalte der Testgefäß-Matrix wurden je mindestens 20 Daphnien vom Zuchtgefäß transferiert. Diese Becken haben die Funktion einer Reinigungsstufe, um so wenig Verdünnungswasser wie möglich von der Petrischale in

das Testmedium zu übertragen und so einen systematischen Fehler durch unerwünschte Verdünnung auszuschließen. Ausgehend von diesen ersten Becken erfolgte die Überführung von je fünf Individuen in jedes der Testwells. Hierbei war auf die Reihenfolge der Verdünnungen zu achten, um die Ergebnisse nicht durch die Übertragung höher konzentrierten Mediums in eine Verdünnung niedrigerer Stufe zu beeinträchtigen. Die Testbecken wurden mit Parafilm bedeckt, um etwaige Verdunstungseffekte auszuschließen sowie mit einem Deckel verschlossen. Die gewählte Testdauer betrug 24 Stunden, daher wurden die Organismen über diesen Zeitraum im Dunkeln bei 20 °C inkubiert.

3.3.3 Auswertung

Nach Ablauf der Testzeit erfolgt die Auswertung der Ergebnisse. Hierzu wird die Zahl der noch schwimmfähigen *Daphnia magna* in den einzelnen Becken bestimmt. Weiters werden pH-Wert und Sauerstoffgehalt der Verdünnungsstufen inklusive der Kontrollen erneut gemessen. Bei der Feststellung der Messwerte für die Verdünnungen werden jene sich noch im Messkolben befindliche Volumina, welche nicht für den Versuch herangezogen wurden, ebenfalls berücksichtigt.

Die Ermittlung des EC_{50} -Wertes erfolgt in Anlehnung in dem in Anhang B der Norm beschriebenen graphischen Verfahren (ASI, 2013:18f.). Hierbei wird die Zahl der schwimmunfähigen Organismen in Abhängigkeit der Konzentration in einem logarithmischen Diagramm aufgetragen. Die dem Diagramm zugehörige Regressionsgerade wird eingezeichnet, aus der Gleichung der Regressionsgerade lässt sich der EC-Wert ermitteln.

Die EC-Werte für 16, 50 und 84 % der Probe dienen zur Berechnung des Anstiegs S gemäß Formel 5:

$$S = \left(\frac{EC_{84}}{EC_{50}} + \frac{EC_{50}}{EC_{16}} \right) / 2 \quad (5)$$

N' bezeichnet die Anzahl der eingesetzten Tiere im Konzentrationsbereich der Probe zwischen 16 und 84 %, in den Fällen, bei welchen die in Tabelle 8 genannte Verdünnungsreihe eingesetzt wurde, sind dies 60. S und N' dienen zur Berechnung des Faktors $f_{EC_{50}}$, wie in Formel 6 gezeigt.

$$f_{EC_{50}} = S^{(2,77/\sqrt{N'})} \quad (6)$$

Anschließend kann die untere Grenze des 95 % – Vertrauensbereiches, T_0 ,

$$T_0 = \frac{EC_{50}}{f_{EC_{50}}} \quad (7)$$

sowie dessen obere Grenze, T_1 ,

$$T_1 = EC_{50} * f_{EC_{50}} \quad (8)$$

bestimmt werden. (ASI, 2013)

3.4 Proben und Probenvorbereitung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche Proben im Hinblick auf ihre Toxizität untersucht. Neben flüssigen Proben wurden auch Feststoffe auf ihren Effekt gegenüber Krebstieren überprüft. Von diesen musste vor Beginn der Versuche ein Eluat angesetzt werden, in einigen Fällen war das Umsetzen weiterer Schritte notwendig, um die Probe in eine für den Test zugängliche Form zu bringen. Eine Übersicht über die getesteten Proben findet sich in Abbildung 19.

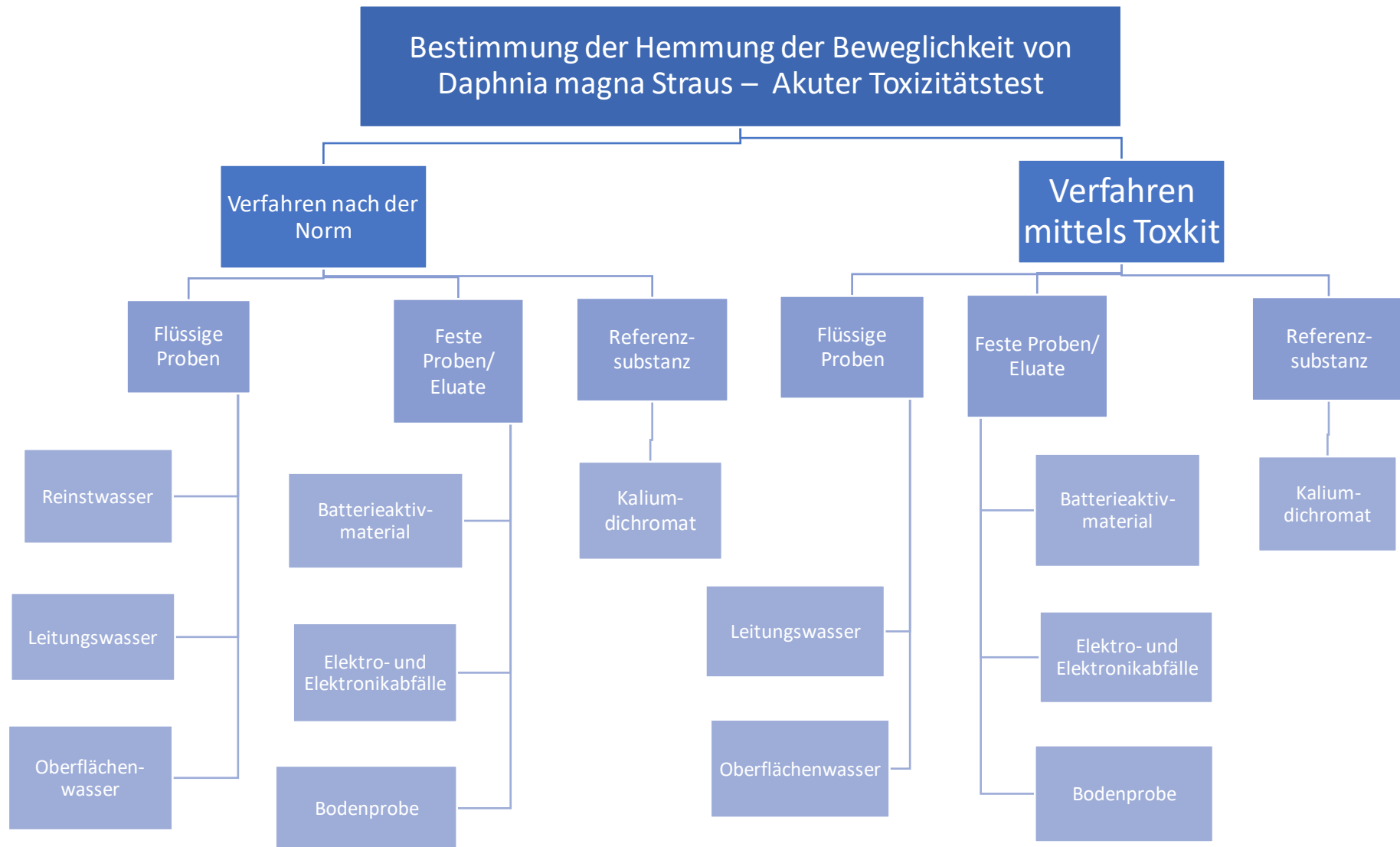


Abbildung 19: Übersicht der mit dem Verfahren nach ÖNORM EN ISO 6341 bzw. mittels Toxkit untersuchten Proben

3.4.1 Reinstwasser

Vorrangig um mit der Vorgangsweise der Versuche vertraut zu werden, wurde der erste Test mit Reinstwasser durchgeführt. Mit dem Begriff Reinstwasser wird Wasser bezeichnet, aus welchem gelöste Bestandteile durch eine Anordnung von Ionentauschern und Aktivkohlefiltern entfernt wurden. Dadurch wird eine Leitfähigkeit unter $0,055 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ erreicht. Beim Versuch zur Bestimmung der Toxizität von Reinstwasser wurde lediglich die in der Norm beschriebene Methode angewandt. Die Ergebnisse der Überwachungsparameter der unverdünnten Probe sind in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 15: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für Reinstwasser

pH	T [°C]	O ₂ [ppm]	O ₂ [%]
8,7	21,4	5,69	67,6

3.4.2 Leitungswasser

Der Test zur Ermittlung der Toxizität von Leobner Leitungswasser wurde sowohl mit normgemäß hergestelltem Verdünnungswasser als auch mit jenem aus den im Toxkit mitgelieferten Lösungen durchgeführt. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Überwachungsparameter der Probe nach Entnahme angegeben.

Tabelle 16: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für Leobner Leitungswasser nach Entnahme der Probe

pH	T [°C]	O ₂ [ppm]	O ₂ [%]
7,5	20,4	6,96	68,4

3.4.3 Oberflächenwasser

Das zur Untersuchung gewählte Oberflächenwasser wurde einem als Bach ausgebildeten Seitenarm der Mur in Leoben entnommen. Eine Abfrage der Daten der Zentralanstalt für Meteorologie und Geodynamik für den Tag der Probenahme ist in Tabelle 17 zusammengefasst. Abbildung 20 zeigt den Ort der Probenahme, Abbildung 21 die zu untersuchende Probe.

Tabelle 17: Umgebungsbedingungen der Probenahme von Oberflächenwasser (ZAMG, 2017)

Datum und Uhrzeit der Probenahme	GPS-Koordinaten	Wetter	Lufttemperatur [°C]	Luftdruck [hPa]	Rel. Feuchte [%]
27.03.17, 08:38	47,3878, 15,0935	sonnig	-1	1030	68



Abbildung 20: Ort der Probenahme des Oberflächenwassers

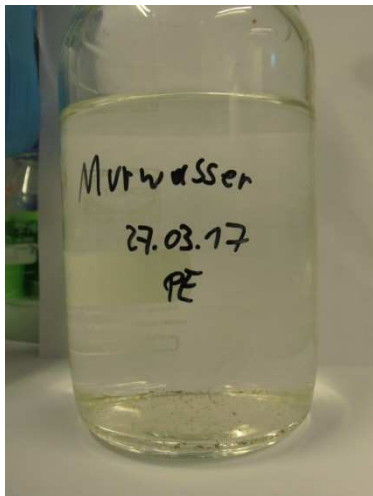


Abbildung 21: Die zu untersuchende Probe Oberflächenwasser

Das Wasser weist – abgesehen von einer leichten gelblichen Färbung, welcher von sedimentierten Ablagerungen am Gefäßboden herrührt – keine besonderen Eigenschaften auf. Die Probe wurde ohne weitere Vorbehandlung gemäß den Vorgaben in der Versuchsbeschreibung untersucht. Die Parameter der unbehandelten Probe sind in Tabelle 18 angegeben.

Tabelle 18: Parameter von Oberflächenwasser nach Entnahme der Probe

pH	T [°C]	O ₂ [ppm]	O ₂ [%]
7,8	11,8	5,12	56,7

3.4.4 Elektro- und Elektronikabfälle

Bei dieser Probe handelt es sich um vorbehandelte, auf eine Korngröße < 6 mm zerkleinerte Elektronikaltgeräte wie in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt. Abfälle aus Elektro- und Elektronikaltgeräten werden oft mit der Abkürzung WEEE bezeichnet, dies steht für Waste of Electrical and Electronic Equipment.



Abbildung 22: Auf eine Korngröße < 6 mm zerkleinerte Elektronikabfälle

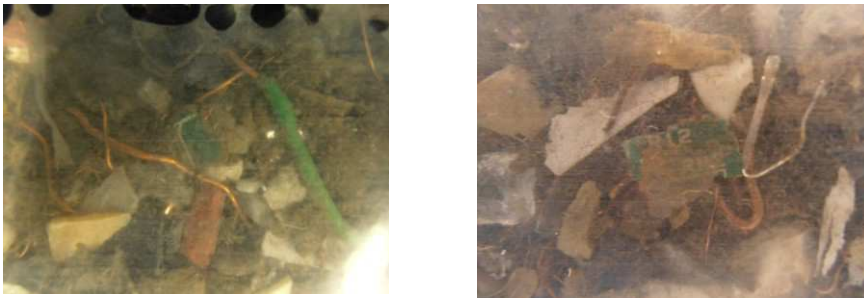


Abbildung 23: Elektro- und Elektronikabfälle

Um die Probe in eine analysierbare Form zu bringen, war es zunächst erforderlich, ein Eluat anzusetzen. Dieses wurde gemäß den Angaben in der ÖNORM EN 12457-4 in einem Flüssigkeits-/ Feststoffverhältnis von $10 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$ angesetzt. Das Material wurde anschließend über einen Zeitraum von 24 h ausgelaugt. Vom Eluat wurden die Parameter pH-Wert sowie Sauerstoffgehalt der Probe bestimmt, bevor dieses zentrifugiert wurde. Hierfür wurde die Zentrifuge auf eine Drehzahl von 5500 min^{-1} für 10 min eingestellt. Die Abbildung 24 zeigt das Eluat sowie die zentrifugierte Probe.



Abbildung 24: Links: das unbehandelte Eluat der Elektronikabfall-Probe. Rechts: das Eluat nach dem Zentrifugieren

Die Probe wies nach Eluierung die in Tabelle 19 angeführten Ergebnisse der Überwachungsparameter auf.

Tabelle 19: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für das aus Elektronikabfällen hergestellte Eluat

pH	T [°C]	O ₂ [ppm]	O ₂ [%]
8,7	20,5	5,92	71,0

3.4.5 Batterieaktivmaterial

Bei dem untersuchten Material handelte es sich um metallentfrachtetes Batterieaktivmaterial aus Alkali-Mangan-Batterien mit einer Korngröße unter 2 mm, wie in Abbildung 25 ersichtlich.



Abbildung 25: Batterieaktivmaterial, Korngröße < 2 mm

Eluat des Batterieaktivmaterials

Analog zur Probe aus Elektronikabfall wurde auch in diesem Fall ein Eluat gemäß ÖNORM EN 12457-4 angesetzt, von welchem ausgewählte Überwachungsparameter bestimmt wurden. Diese sind in Tabelle 20 ersichtlich. Aufgrund der Beschaffenheit des Eluates musste nach dem Zentrifugieren der Probe eine Filtration mittels eines 0,45 µm-Filters vorgenommen werden. In Abbildung 26 sind das Eluat im unbehandelten Zustand sowie nach dem Zentrifugieren und Filtrieren gezeigt.



Abbildung 26: links: Eluat des Batterieaktivmaterials, rechts: zentrifugiertes sowie filtriertes Eluat des Batterieaktivmaterials

Tabelle 20: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für Batterieaktivmaterial nach Herstellung des Eluats

pH	T [°C]	O ₂ [ppm]	O ₂ [%]
12.3	20.4	5.23	64.6

Eluat des Batterieaktivmaterials nach Einstellung des pH-Wertes

Da der hohe pH-Wert des Eluats der Probe nicht mit dem Überleben der Organismen vereinbar ist, wurde ein zweiter Versuch mit Eluat durchgeführt, dessen pH-Wert in den Bereich zwischen 6,0 und 9,0 gebracht wurde. Hierzu wurde gemäß den Angaben in der Norm eine HCl-Lösung der Konzentration 1 mol*L⁻¹ hergestellt. Mit dieser wurde der pH-Wert der Probe auf 7,8 bei einer Temperatur von 21,7 °C eingestellt. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte analog zum unvorbehandelten Eluat.

3.4.6 Bodenprobe

Die Bodenprobe entstammt aus der niederösterreichischen Stadtgemeinde Eggenburg. Eine Abfrage der Daten der Zentralanstalt für Meteorologie und Geodynamik für den Tag der Probenahme ist in Tabelle 21 zusammengefasst. Abbildung 27 zeigt den Ort der Probenahme sowie die zu untersuchende Probe.



Abbildung 27: Links: Ort der Entnahme der Bodenprobe. Rechts: die untersuchte Bodenprobe

Tabelle 21: Umgebungsbedingungen zum Zeitpunkt der Entnahme der Bodenprobe (ZAMG, 2017)

Datum und Uhrzeit der Probenahme	GPS-Koordinaten	Wetter	Lufttemperatur [°C]	Luftdruck [hPa]	Rel. Feuchte [%]
11.04.17, 19:00	48,6374, 15,8121	Sonnig, Regen am Tag vor der Probenahme	11	1022,5	45

Um die Probe in eine untersuchbare Form zu bringen, wurde ein Eluat nach den standardisierten Vorgaben der ÖNORM EN 12457-4 angesetzt. Vom Eluat wurden pH-Wert sowie Sauerstoffgehalt bestimmt, anschließend wurde die Probe zentrifugiert. Hierzu wurde eine Drehzahl von 5500 min^{-1} für 10 min gewählt. Die Ergebnisse der Überwachungsparameter nach Herstellung des Eluats sind in Tabelle 22 gezeigt.

Tabelle 22: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für die Bodenprobe nach Herstellung des Eluats

pH	T [°C]	O ₂ [ppm]	O ₂ [%]
8,6	22,1	6,16	65,9

3.4.7 Kaliumdichromat

Bei $K_2Cr_2O_7$ handelt es sich um die in der Norm genannte Referenzsubstanz.

Innerhalb eines Monats nach Durchführung des ersten Versuches ist die Empfindlichkeit der Testorganismen auf Kaliumdichromat festzustellen. Hierbei soll der 24 h- EC_{50} zwischen $0,6$ und $2,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ liegen (ASI, 2013:13).

Zunächst wurde eine Stammlösung der Konzentration $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in nach obiger Schilderung gewonnenem Reinstwasser hergestellt. Von dieser wurden pH-Wert sowie Sauerstoffgehalt gemessen, die Ergebnisse der Überwachungsparameter sind in Tabelle 23 wiedergegeben.

Tabelle 23: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für die Kaliumdichromat-Lösung

pH	T [°C]	O ₂ [ppm]	O ₂ [%]
5,7	20,4	6,11	71,7

Um die von der Norm genannte Schwankungsbreite des Wertes für die EC_{50} der Referenzsubstanz abzudecken, wurde für die Versuche die in Tabelle 24 ersichtliche Verdünnungsreihe gewählt.

Tabelle 24: Für die Versuche mit Kaliumdichromat gewählte Verdünnungsreihe

Konzentration $K_2Cr_2O_7$ [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]	Volumen Stammlösung [mL]	Volumen Verdünnungswasser [mL]
4,8	48	52
2,4	24	76
1,2	12	88
0,6	6	94
0,3	3	97

4 Ergebnisse / Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der zuvor beschriebenen Proben dargestellt sowie diskutiert.

4.1 Reinstwasser

Die Ergebnisse des normgemäß durchgeführten Tests an Reinstwasser sind in Tabelle 25 sowie in Abbildung 28 angegeben.

Tabelle 25: Ergebnisse des Tests an Reinstwasser

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
38,23	20,00	73,05	30,32	48,19

Reinstwasser, Norm

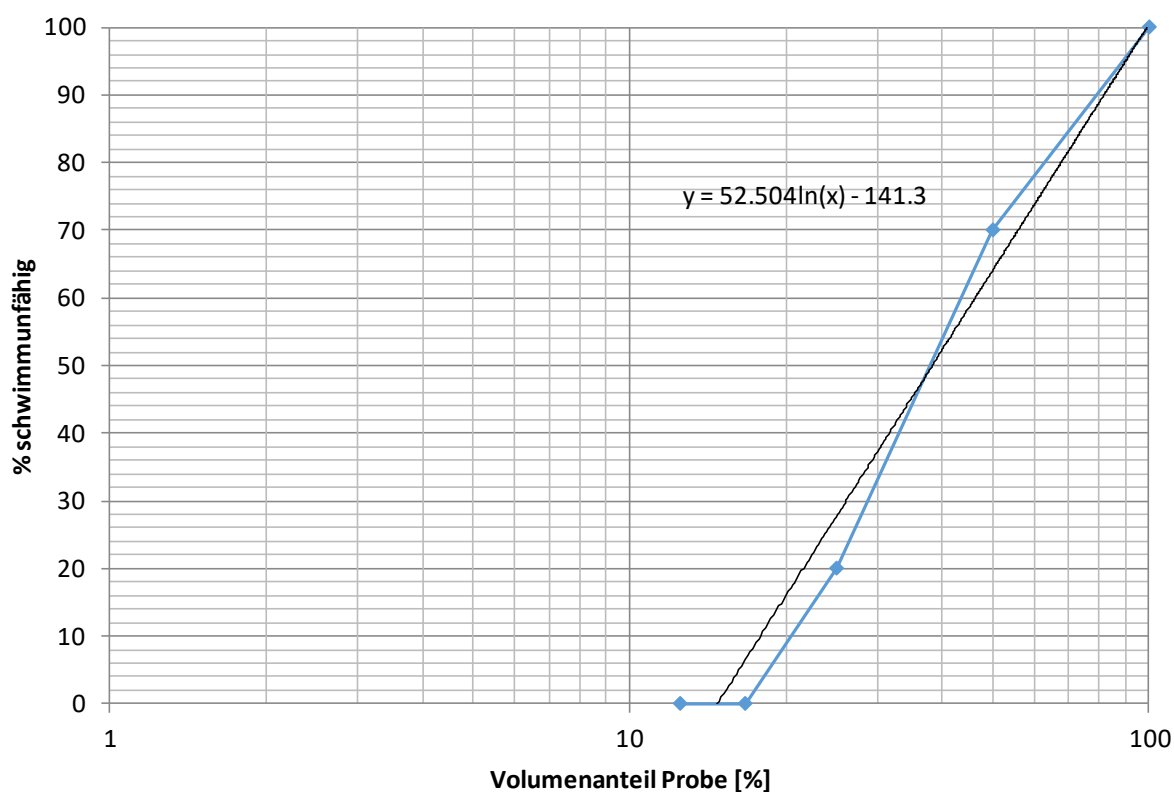


Abbildung 28: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Reinstwasser

Da Reinstwasser, bedingt durch die geringe Leitfähigkeit von unter $0,055 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-2}$, eine sehr geringe Konzentration an Nährstoffen aufweist, ist ein Überleben der Versuchstiere in der unverdünnten Probe nicht zu erwarten. Die erhaltenen Ergebnisse entsprachen diesen Erwartungen: in der Originalprobe waren nach 24 h sämtliche Organismen immobilisiert. In der zweiten Verdünnungsstufe mit einem auf das Volumen bezogenen Gehalt an 50 % Verdünnungswasser war eine Schwimmunfähigkeit bei 70 % der Tiere zu beobachten, erst ab einer Verdünnung im Verhältnis 1 : 4 nimmt die Konzentration an durch das Verdünnungswasser eingebrachten Salzen Gehalte an, welche ein Überleben der Daphnien ermöglicht. Mit dem Faktor G wird jene Verdünnungsstufe angegeben, ab welcher keine Hemmung der Testorganismen mehr beobachtet wird. Nimmt man den auf das Kontrollwasser bezogenen Gültigkeitsparameter von einer Immobilitätsrate unter 10 % als Maß für geringfügige Effekte an, so weist Reinstwasser einen G-Wert von 6 auf. Anders ausgedrückt, muss deionisiertes Wasser im Verhältnis 1 : 6 verdünnt werden, um den Versuchstieren ausreichend Salze im gelösten Zustand zur Verfügung zu stellen und damit den natürlichen Osmosevorgang der Zellen aufrecht zu erhalten. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Ram & Walker in einer 1993 veröffentlichten Studie gemacht: im Zuge der Exposition von Dreikantmuscheln der Spezies *Dreissena polymorpha* gegenüber Reinstwasser wurde ein Eintreten der Mortalität der Organismen nach einigen Tagen beobachtet. Ebenso wie beim im Zuge der Masterarbeit durchgeführten Test konnte die Toxizität des Reinstwassers durch die Zugabe von Salzen, nämlich NaCl und MgSO_4 gemindert werden. Unter Miteinbeziehung der Ergebnisse dieser Studie erscheint der erhaltene Wert für den EC_{50} von 38,23 % als realistisch. Eine weitere Möglichkeit der Darstellung der giftigen Wirkung von Stoffen ist die Berechnung der potentiellen Toxizität, wie von Fuhrmann (2006) geschildert. Dieser Wert basiert jedoch auf der Angabe des LC_{50} - oder wie in diesem Fall EC_{50} -wertes in der Einheit $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Körpergewicht. Da die eingesetzten Organismen über ein äußerst geringes Körpergewicht verfügen, ist eine solche Aussage wenig sinnvoll.

4.2 Leitungswasser

Für den nach der Norm durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 26 und Abbildung 29 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 26: Ergebnisse des Tests an Leitungswasser, Durchführung gemäß Norm

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
2*10 ⁹	4 417,09	9*10 ¹⁴	1,48*10 ⁷	2,69*10 ¹¹

Leitungswasser, Norm

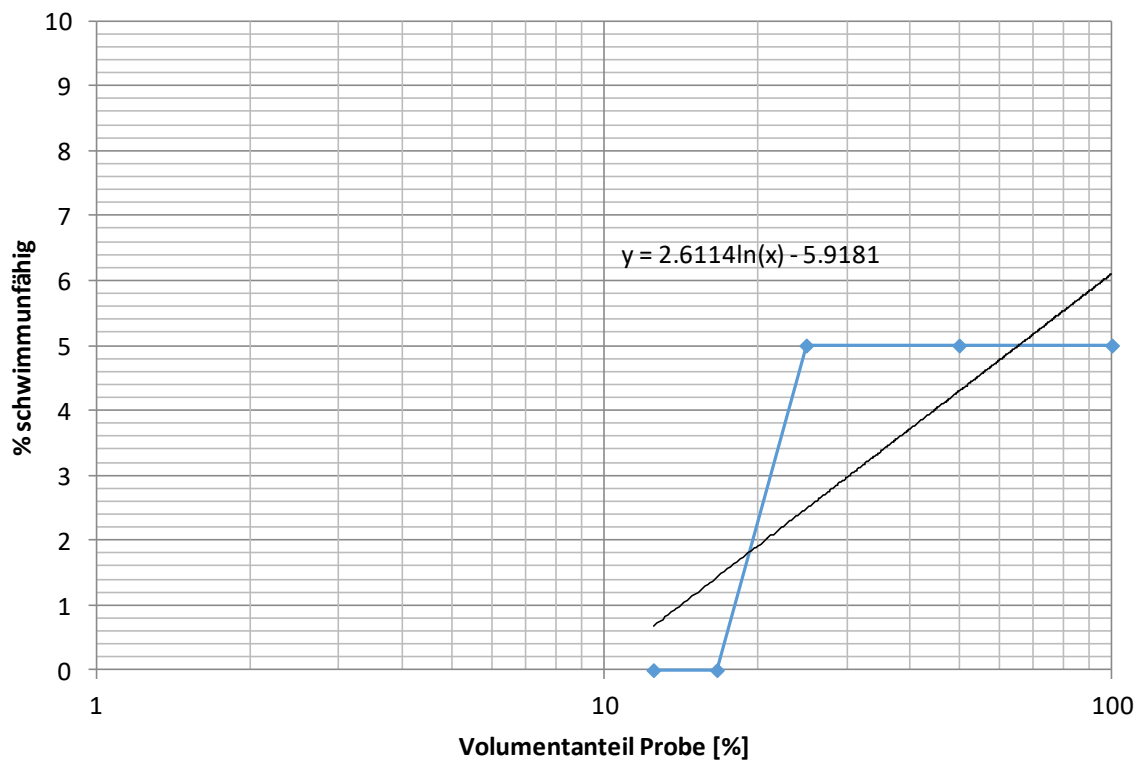


Abbildung 29: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Leitungswasser, Durchführung gemäß Norm

Für den mittels Toxkit durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 27 und Abbildung 30 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 27: Ergebnisse des Tests an Leitungswasser, Durchführung mittels Toxkit

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
2 281,11	87,39	59 541,89	554,48	9 384,43

Leitungswasser, Toxkit

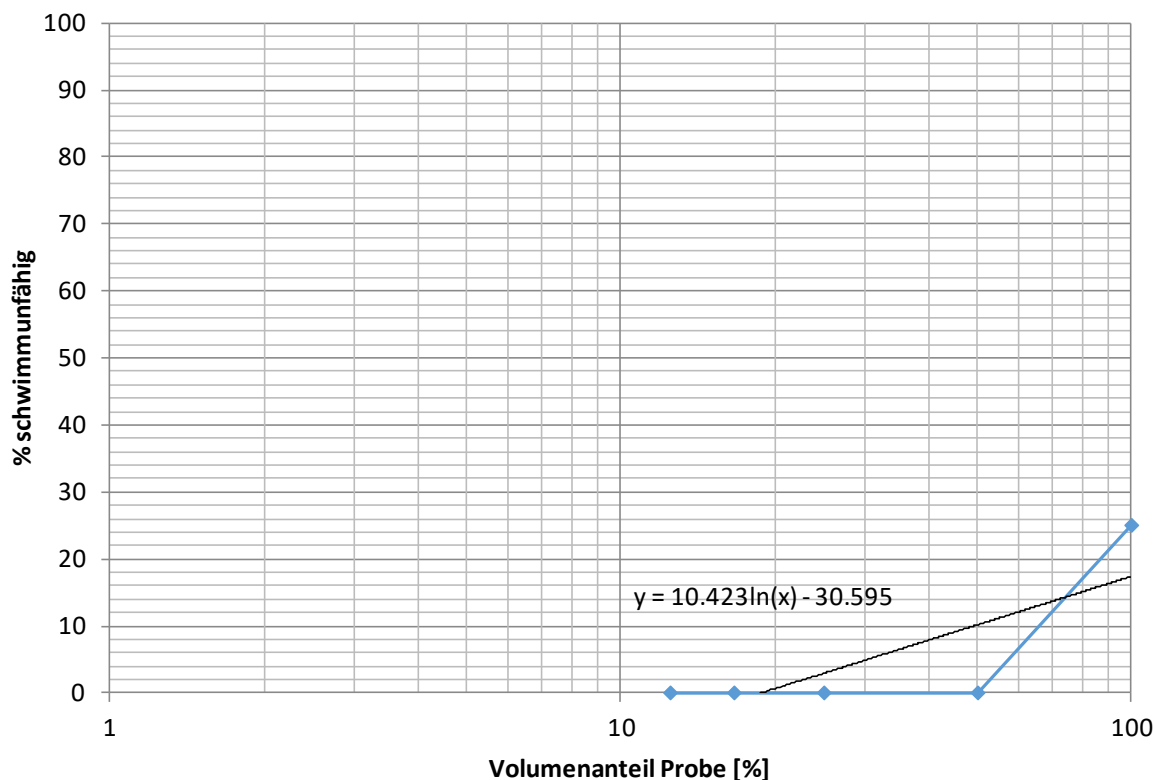


Abbildung 30: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Leitungswasser, Durchführung mittels Toxkit

Auf den ersten Blick erscheint beim Vergleich der Ergebnisse ein beträchtlicher Unterschied zwischen dem nach der Norm durchgeführten Verfahren und jenem nach den Bestimmungen des Toxkits: bei den Resultaten, die nach Norm erhalten wurden, ist eine Schwimmunfähigkeit der Organismen in den ersten drei Verdünnungsstufen zu beobachten, diese beträgt jedoch in jedem Fall lediglich fünf Prozent. Da dieser Wert mit der testspezifischen Schwankung vereinbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass Leitungswasser keine toxische Wirkung besitzt. Bei dem nach der zweiten Methode ausgeführten Versuch (Toxkit) ist eine Immobilisierung von 25 % der Organismen in der unverdünnten Probe zu beobachten. Unter Berücksichtigung der natürlichen Schwankung der Ergebnisse, welche eine Schwimmunfähigkeit von höchstens zehn Prozent erklären und des weiteren Verlaufes der Kurve, kann an dieser Stelle von einer Unzulänglichkeit während der Durchführung des Tests ausgegangen werden. Die erhaltenen EC_{50} -Werte sind rein rechnerischer Natur und können aufgrund ihrer Größe als unendlich angesehen werden. Anders ausgedrückt weist das untersuchte Leitungswasser keine Toxizität auf.

4.3 Oberflächenwasser

Für den nach der Norm durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 28 und Abbildung 31 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 28: Ergebnisse des Tests an Oberflächenwasser, Durchführung gemäß Norm

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

Oberflächenwasser, Norm

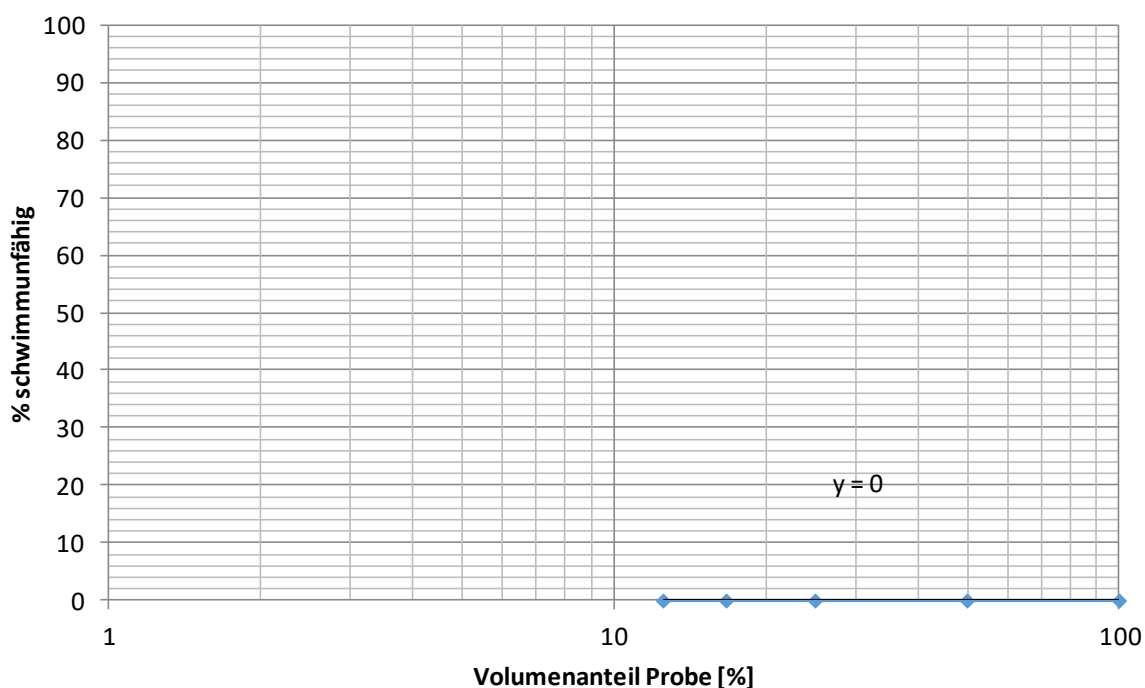


Abbildung 31: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Oberflächenwasser, Durchführung gemäß Norm

Für den mittels Toxkit durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 29 und Abbildung 32 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 29: Ergebnisse des Tests an Oberflächenwasser, Durchführung mittels Toxkit

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

Oberflächenwasser, Toxkit

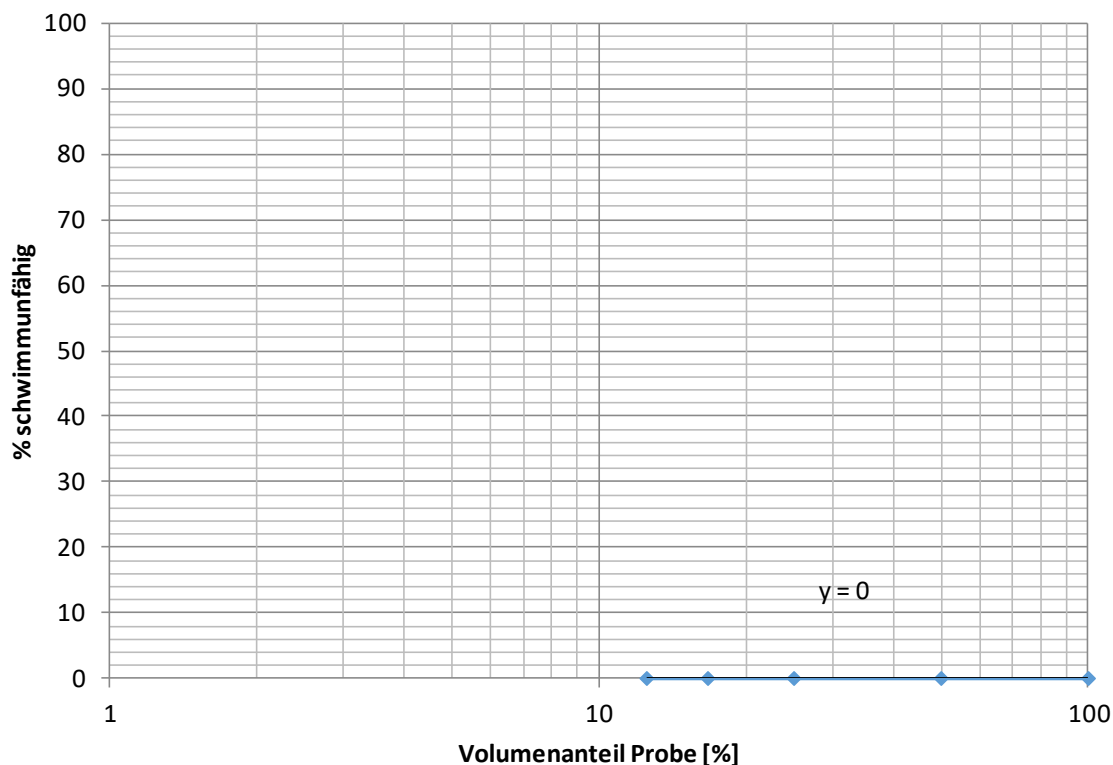


Abbildung 32: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Oberflächenwasser, Durchführung mittels Toxkit

Das untersuchte Oberflächenwasser weist in keinem der angewandten Testverfahren ein Toxizitätspotential auf. Da die Organismen in jeder der Verdünnungen schwimmfähig sind, bildet die Kurve im dazugehörigen Diagramm eine steigungslose Gerade, aufgrund dessen ist eine Berechnung des EC_{50} nicht möglich. Weiters kann keine Angabe über die mit der Ermittlung des EC_{50} assoziierten Werte wie die untere und obere Grenze des Vertrauensbereiches getätigt werden.

Die gute Verträglichkeit des Wassers gegenüber Mikroorganismen kann durch einen hohen Gehalt an gelösten Nährstoffen begründet werden.

4.4 Elektro- und Elektronikabfälle

Nach Herstellung des im obigen Kapitel beschriebenen Eluates sowie Zentrifugieren desselben wurden die Versuche durchgeführt. Für die Probe wurden die folgenden Ergebnisse erhalten.

Für den nach der Norm durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 30 und Abbildung gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 30: Ergebnisse des Tests an Eluat aus einer Elektronikabfall-Probe, Durchführung gemäß Norm

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
3,04*10 ⁶	8,74*10 ²	1,06*10 ¹⁰	1,29*10 ⁵	7,20*10 ⁷

Eluat einer Elektronikabfall-Probe, Norm

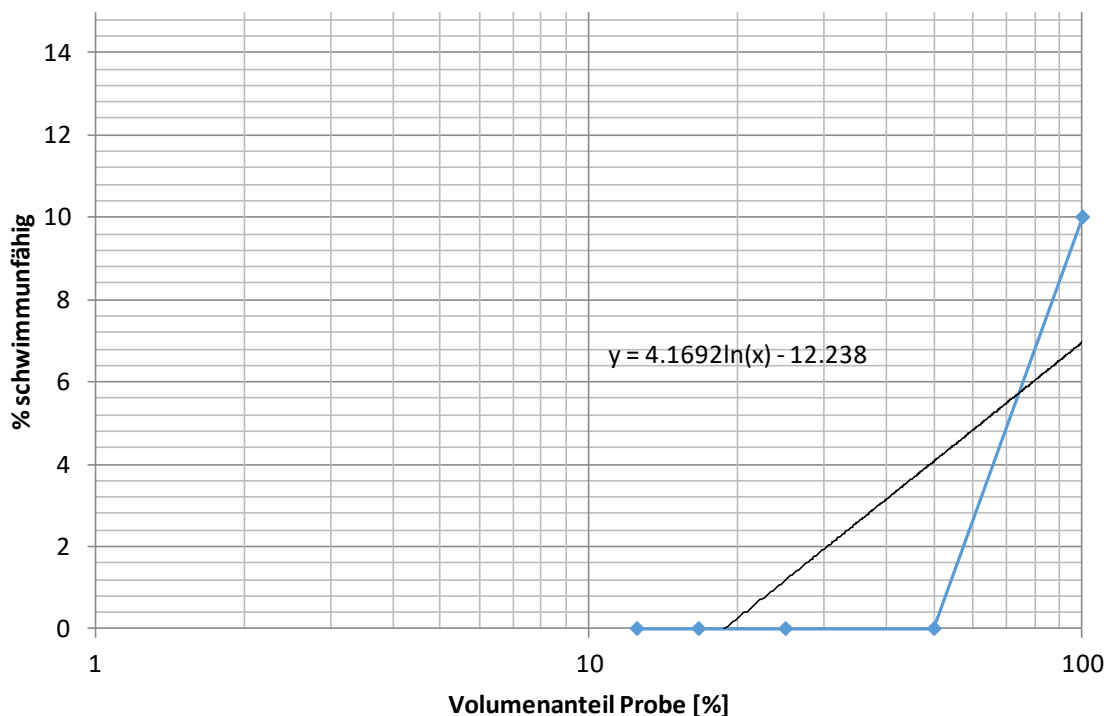


Abbildung 33: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat aus einer Elektronikabfall-Probe, Durchführung gemäß Norm

Für den mittels Toxkit durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 31 und Abbildung gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 31: Ergebnisse des Tests an Eluat aus einer Elektronikabfall-Probe, Durchführung mittels Toxkit

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
3,45*10 ⁸	3,47*10 ³	3,42*10 ¹³	4,39*10 ⁶	2,70*10 ¹⁰

Eluat einer Elektronikabfall-Probe, Toxkit

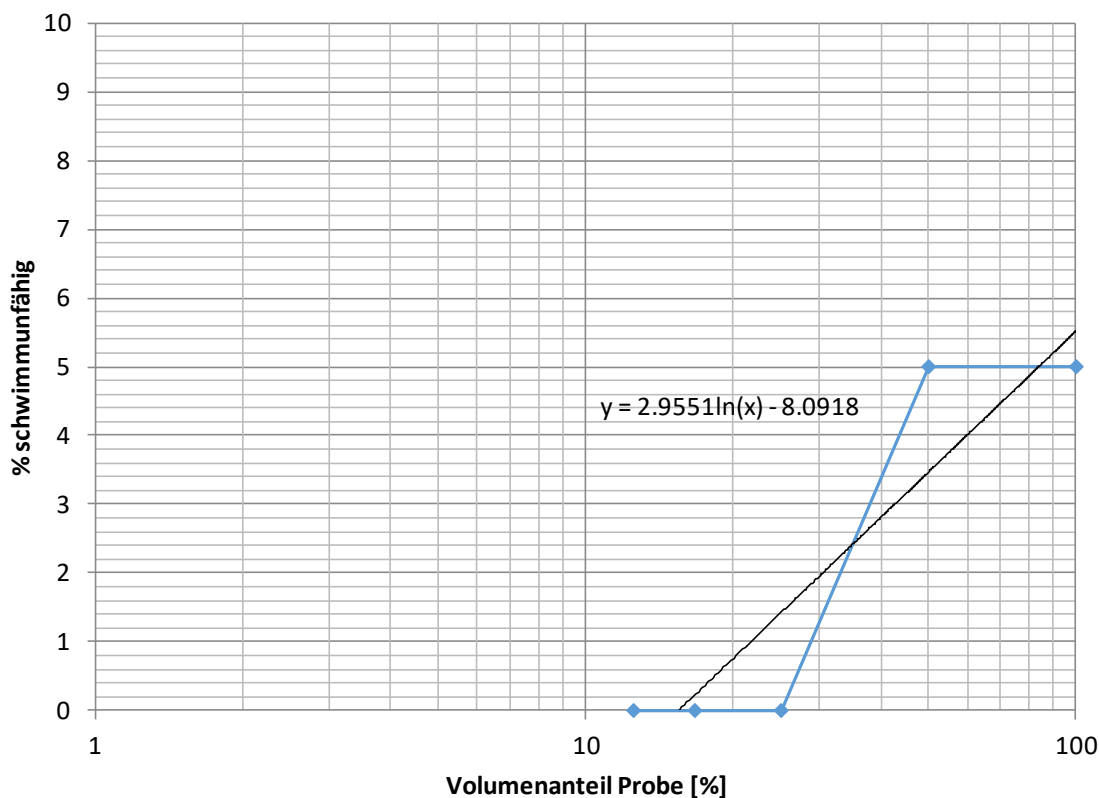


Abbildung 34: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat aus einer Elektronikabfall-Probe, Durchführung mittels Toxkit

Das Eluat der Probe wurde am Lehrstuhl für Abfallwirtschaft und Abfallverwertungstechnik in Anlehnung an die in ÖNORM EN ISO 17294-2 beschriebene Verfahrensweise mittels ICP-MS analysiert. Die Gehalte jener Elemente, bei welchen ein Messwert von mindestens 1,0 mg*(kg TS⁻¹) erhalten wurde, sind in Tabelle 32 gezeigt.

Tabelle 32: Ergebnis der Analyse des Elektronikabfall-Materials

Metall	[mg*(kg TS) ⁻¹]	Metall	[mg*(kg TS) ⁻¹]	Metall	[mg*(kg TS) ⁻¹]
Ca	450	Zn	13	Mn	1,3
K	290	Cu	7,4	Ba	1,0
Na	260	Li	3,8	P	1,0
Mg	170	Sr	3,2		
Si	15	Fe	1,8		

Calcium, Kalium, Natrium sowie Magnesium stellen jene Metalle dar, welche in den höchsten Konzentration in der Probe auftreten. Das größte toxische Potential ist hierbei, wie im Theorieteil beschrieben, von Kalium und Natrium zu erwarten. Beim Vergleich der in Tabelle

32 genannten Konzentrationen im Eluat mit jenen des extrazellulären Raumes ist zu beachten, dass die Werte pro Kilogramm Trockenmasse angegeben sind, während sich die Daten in Abbildung 6 auf einen Liter Zellflüssigkeit beziehen. Ein augenfälliges Merkmal der Konzentrationen an Kalium und Natrium besteht darin, dass beide Metalle annähernd denselben Gehalt aufweisen.

Für die physiologischen Bedingungen einer Zelle ist das Verhältnis der Ionen im inneren und äußeren Zellraum von Bedeutung. Zur Herstellung des Eluates wurden 0,1124 kg Probe eingesetzt, welche umgerechnet 32,59 mg K sowie 29,22 mg Na enthalten. Beide Werte sind als gering anzusehen – ein Umstand, der sich im Falle von Kalium positiv auswirkt, da das ordnungsgemäße Arbeiten einer Zelle eine niedrige Konzentration dieses Metalls in ihrem Äußeren relativ zu ihrem Inneren voraussetzt. Leicht erhöhte Differenzen im Gradienten können durch den Mechanismus der Natrium-Kalium-Pumpe ausgeglichen werden. Bei der Betrachtung von Natrium zeigt sich ein anderes Bild: der Gehalt von ca. 30 mg in der Probe würde, umgelegt auf einen Liter, unter dem in Abbildung 6 postulierten Volumenanteil von $142 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ liegen. Der hierdurch in Erscheinung tretende Mangel an Natrium wird jedoch durch das Salz NaHCO_3 im Verdünnungswasser ausgeglichen, sodass von dieser Seite keine Beeinträchtigung der Organismen zu erwarten ist.

Weiters wurden bei Calcium und Magnesium erhöhte Konzentrationen gemessen. Dies ist jedoch nicht mit einem negativen Effekt behaftet, da – analog zum Fall von Natrium – die Menge an den jeweiligen Metallen umgelegt auf die tatsächlich zur Herstellung des Eluates eingesetzte Probenmasse überaus gering ist. Insbesondere dahingehend, als dass die vier Metalle, welche in Gehalten von über $100 \text{ mg} \cdot (\text{kg TS})^{-1}$ in der Probe auftreten, das Verdünnungswasser bilden, ist von keiner toxischen Wirkung der Probe auszugehen. Die auf Organismen ungefährlichen Eigenschaften des Calcium werden von den Aufzeichnungen der European Chemicals Agency bestätigt – laut dem Registration Dossier für Calcium stellt das Metall keinerlei Gefahr weder für aquatische noch für terrestrische Organismen dar (ECHA, 2017).

4.5 Batterieaktivmaterial

Für das Batterieaktivmaterial aus Alkali-Mangan-Zellen wurde im Rahmen einer ICP-MS-Messung die in Tabelle 33 wiedergegebene Zusammensetzung in Bezug auf Metalle mit einer Präsenz von mehr als 0,05 Massenprozent erhalten. Die Bestimmung des Feststoffgehaltes wurde nach Totalaufschluss wurde gemäß ÖNORM EN 13656 durchgeführt.

Tabelle 33: Zusammensetzung der Schwarzmasse

Metall	[M.–% TS]	Metall	[M.–% TS]	Metall	[M.–% TS]
Mn	42,2	Fe	0,356	Ni	0,185
Zn	24,2	Ca	0,256	Ba	0,121
K	12,0	Na	0,193	Si	0,073

Eluat des Batterieaktivmaterials

Diese Probe wurde, analog zum Elektroschrott, eluiert um das Material in eine bearbeitbare Form zu bringen. Aufgrund der Beschaffenheit des Stoffes musste im Anschluss an das Zentrifugieren ein Filtrationsschritt durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind auf den folgenden Seiten dargestellt.

Für den nach der Norm durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 34 und Abbildung gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 34: Ergebnisse des Tests an Eluat von Batterieaktivmaterial, Durchführung gemäß Norm

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
1,00	1,00	1,00	0,78	1,28

Eluat von Batterieaktivmaterial, Norm

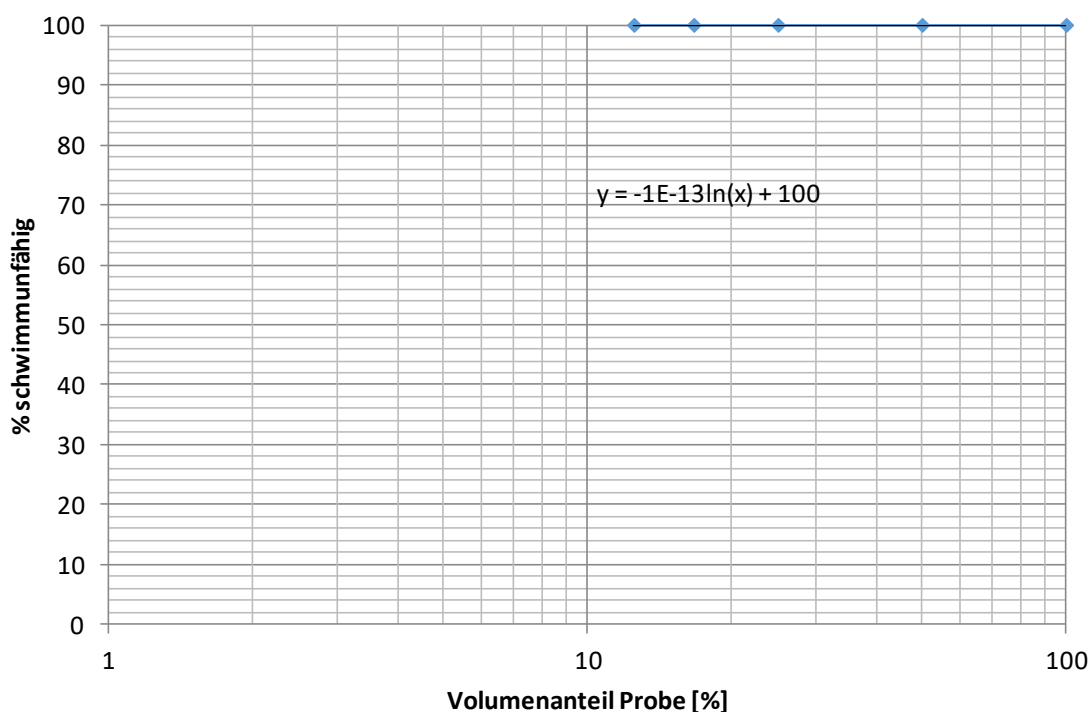


Abbildung 35: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat von Batterieaktivmaterial, Durchführung gemäß Norm

Für den mittels Toxkit durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 35 und Abbildung 36 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 35: Ergebnisse des Tests an Eluat von Batterieaktivmaterial, Durchführung mittels Toxkit

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
1,00	1,00	1,00	0,78	1,28

Eluat von Batterieaktivmaterial, Toxkit

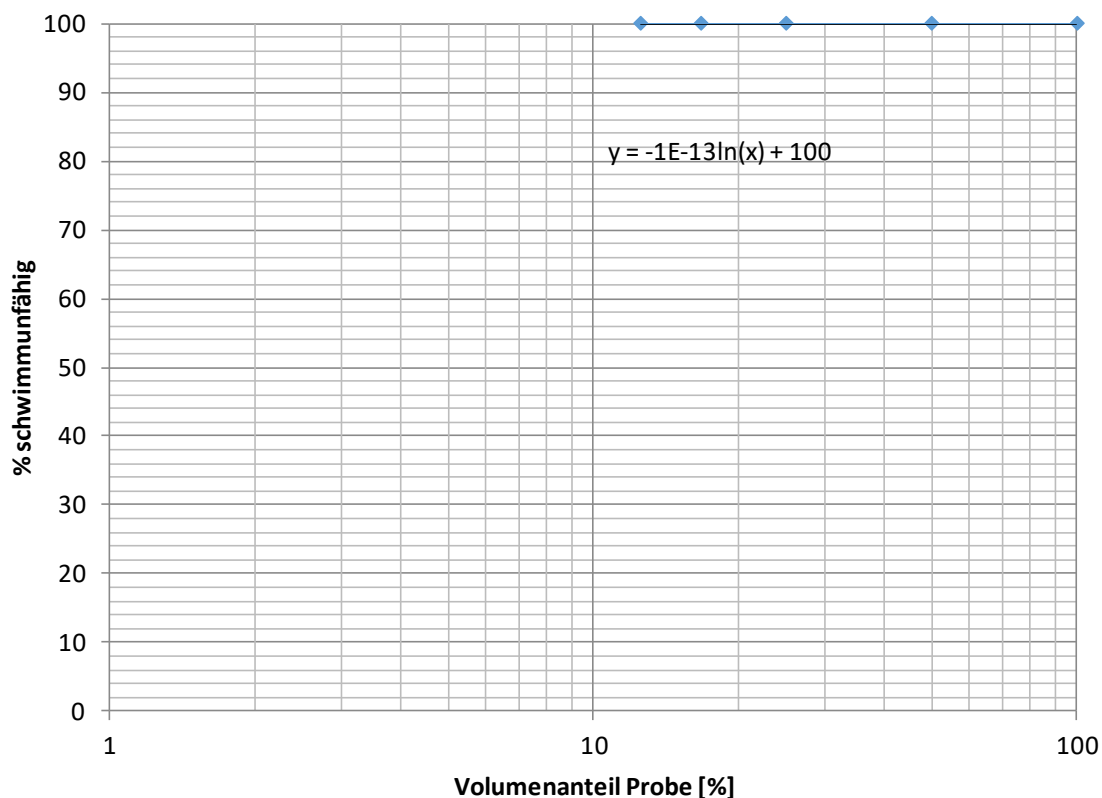


Abbildung 36: Schwimmfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat von Batterieaktivmaterial, Durchführung mittels Toxkit

In den Diagrammen ist ersichtlich, dass in keiner der Verdünnungen der Probe die Schwimmfähigkeit der Daphnien aufrecht erhalten werden konnte. Die Begründung für diese Beobachtung ist vor allem im hohen pH-Wert der Probe zu suchen, welcher bei 12,3 liegt. Laut den Angaben in der Norm liegt jener pH-Bereich, in welchem ein Überleben der Organismen vereinbar ist, zwischen 6,0 und 9,0 (ASI, 2013:9). Ausgehend von diesen Überlegungen wurde davon abgesehen, weitere Verdünnungen des Eluates der Probe, welche über das Verhältnis 1 : 8 hinausgehen, anzusetzen. Der Test ist jedoch zunächst ohne Manipulation des pH-Wertes durchzuführen, erst bei einer festgestellten toxischen Wirkung der Probe, welche allein durch den Zusatz von Verdünnungswasser nicht gemindert wird, darf eine entsprechende Vorbehandlung vorgenommen werden.

Die hohe Toxizität der Originalprobe war auch durch die Beobachtung zu erkennen, dass die Schwimmfähigkeit der Organismen kurz nach Zusatz in die Verdünnungen und somit weit

vor Ablauf der Testdauer erreicht wurde. Im Falle der ersten beiden Verdünnungen der Probe war es nicht möglich, über den Status der Spülung der Daphnien im Rinse Well zur Entfernung eventueller Rückstände des Zuchtwassers hinauszugehen – hier wurde ein Eintreten der Immobilisierung bereits unmittelbar nach Zugabe, beziehungsweise wenige Minuten danach beobachtet. Ein Verteilen der Versuchstiere auf die Testvolumina war nicht möglich. Bei der Verdünnung im Verhältnis 1 : 4 konnten die Organismen bereits auf die Replikate verteilt werden, die Schwimmfähigkeit wurde jedoch auch in diesem Medium nach einigen Minuten festgestellt.

Der auffallend hohe pH-Wert der Probe kann mit dem Aufbau einer typischen Alkali-Mangan-Batterie erklärt werden: der Elektrolyt setzt sich v.a. aus KOH zusammen und weist einen pH-Wert von 14,4 auf (Baumann & Muth, 1997:22).

Eluat des Batterieaktivmaterials nach Einstellung des pH-Wertes

Nach Einstellung des pH-Wertes der Probe mittels verdünnter HCl in einen Bereich zwischen 6,0 und 9,0, also jenen welcher auf das Überleben der Organismen keinen negativen Einfluss hat, wurde der Versuch mit der Schwarzmasse erneut durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse gezeigt.

Für den nach der Norm durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 36 und Abbildung 37 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 36: Ergebnisse des Tests an Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Durchführung gemäß Norm

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
22,27	10,44	47,50	13,25	37,41

Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Norm

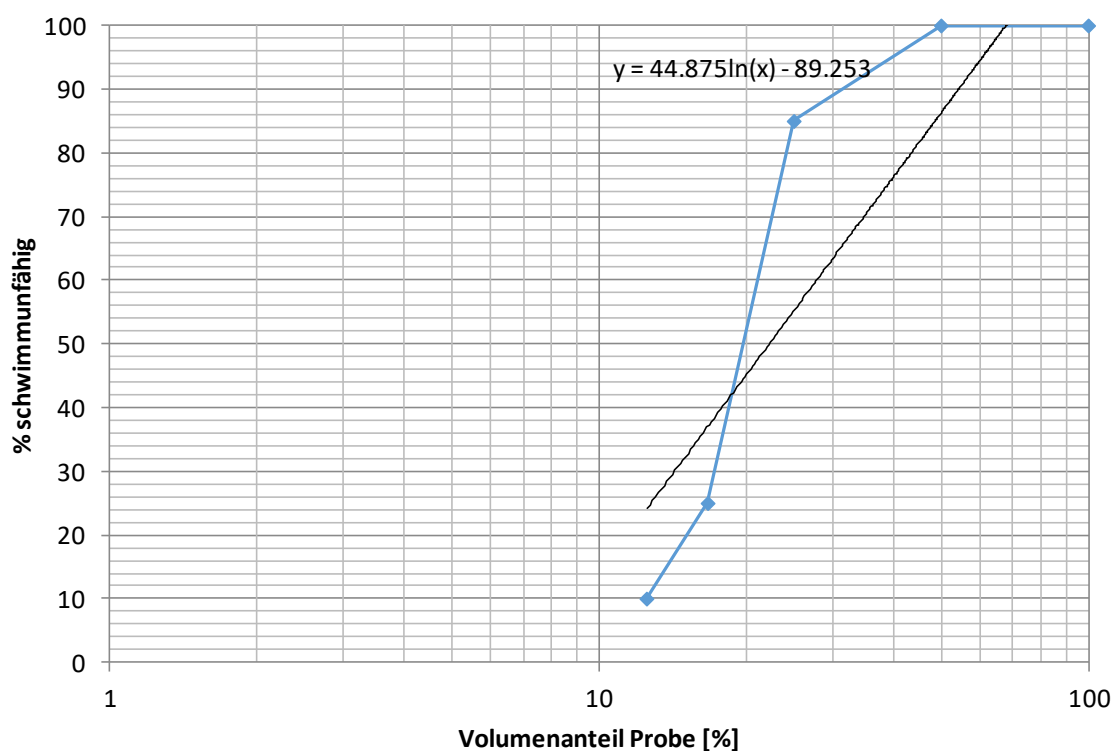


Abbildung 37: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Durchführung gemäß Norm

Für den nach dem Toxkit durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 37 und Abbildung 38 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 37: Ergebnisse des Tests an Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Durchführung gemäß Toxkit

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
25,84	12,92	51,68	15,74	42,43

Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Toxkit

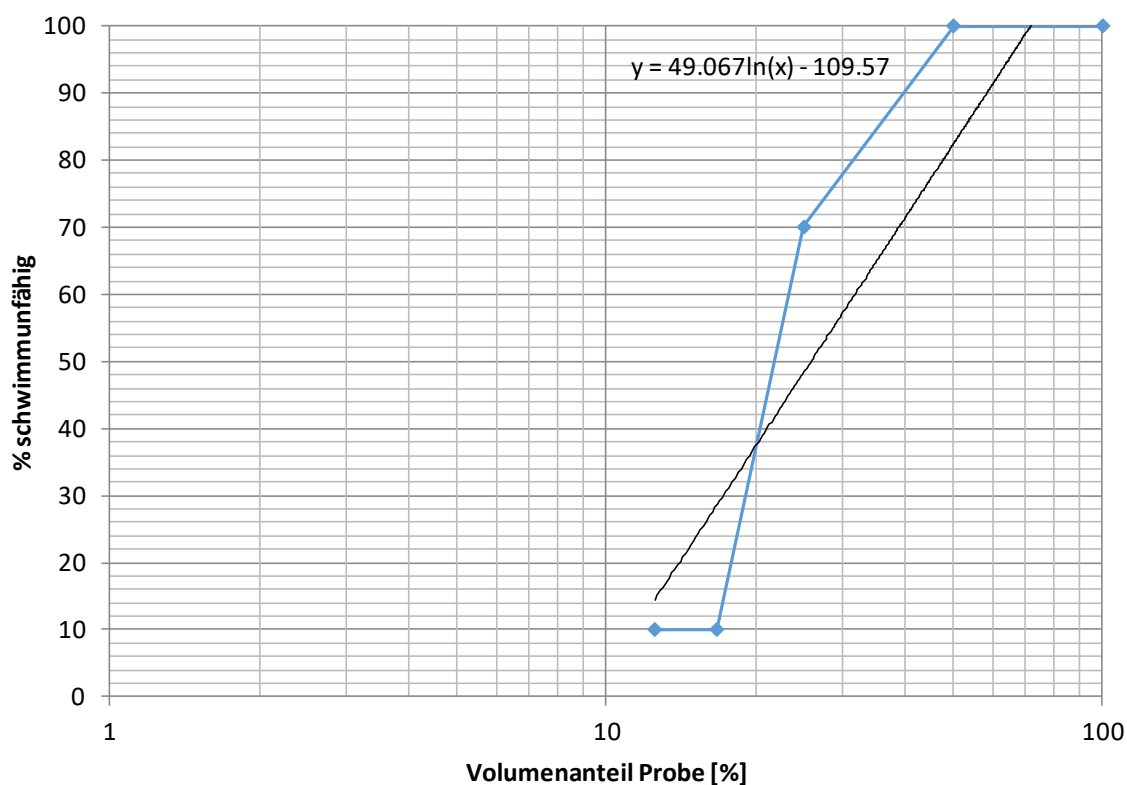


Abbildung 38: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Durchführung gemäß Toxkit

Nach Vorbehandlung des Eluates der Probe mit verdünnter Säure auf einen pH-Wert im neutralen Bereich wurden obige Ergebnisse erhalten, aus welchen hervorgeht, dass das Eluat mindestens im Verhältnis 1 : 6 verdünnt werden muss, um keine oder nur vernachlässigbar geringfügig toxische Effekte zu erzielen. Dieses Ergebnis stimmt weitestgehend überein mit einem Versuch an Eluat desselben Materials welcher von einem in Deutschland ansässigen Labor durchgeführt wurde. Hierbei wurde dieselbe Probe zunächst vorbehandelt, um einen pH-Wert von 7,2 zu erhalten, anschließend wurde der Versuch mit drei Verdünnungsstufen, wovon je zwei Replikate angesetzt wurden, durchgeführt. Nach einer Versuchsdauer von 24 h wurden die in Tabelle 38 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 38: Ergebnisse des Versuches an Batterieaktivmaterial mit einem ursprünglichen pH-Wert von 11,4 (Prüfbericht des deutschen Vergleichslabors)

Verdünnungsstufe G	pH-Wert t = 0	pH-Wert t = 24 h	O ₂ [mg*L ⁻¹] t = 0	O ₂ [mg*L ⁻¹] t = 24 h	Immobilität nach 24 h [%]
Blindwert	7,7	6,9	8,8	8,6	0
G 1	7,4	8,7	9,3	8,7	100
G 2	7,5	8,5	9,0	8,4	100
G 4	7,7	8,3	8,9	8,4	40

Mit dem G_D-Wert wird in vorliegendem Prüfbericht jene Verdünnungsstufe des Eluates bezeichnet, bei welcher höchstens 10 % der eingesetzten Versuchsorganismen Schwimmunfähigkeit erfahren. Die Prüfer des deutschen Referenzlabors kamen hierbei auf einen Wert von G_D > 4. Werden die Ergebnisse des Prüflabors mit jenen Resultaten, welche im Rahmen vorliegender Arbeit erhaltenen wurden einander gegenüber gestellt, so lässt sich Tabelle 39 anfertigen.

Tabelle 39: Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Bestimmung des G_D-Wertes von Batterieaktivmaterial

Durchgeführter Versuch	Referenzlabor			Normverfahren	Toxkit
pH-Wert des Eluates	11,4	12,7	10,1	12,3	12,3
pH-Wert nach Vorbehandlung des Eluates	7,2	7,1	7,1	7,7	7,7
Immobilität nach 24 h [%] G 1	100	100	100	100	100
Immobilität nach 24 h [%] G 2	100	100	100	100	100
Immobilität nach 24 h [%] G 4	40	100	30	85	70
G _D	> 4	> 4	> 4	> 6	> 4

Mit sämtlichen Versuchen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, lediglich bei dem nach dem Normverfahren durchgeführten Test ist eine leichte Abweichung der Ergebnisse zu beobachten. Statistisch gesehen müssten in der Verdünnung des Verhältnisses 1 : 6 mindestens 18 von den in den Replikaten insgesamt 20 vorhandenen Tieren schwimmfähig sein, um einen Wert von 10 % für die Anzahl der schwimmunfähigen zu erhalten; tatsächlich waren jedoch nur 15 der eingesetzten Daphnien in der Lage zu schwimmen. Die Differenz von drei Individuen kann, insbesondere in Betracht der in Tabelle 39 dargestellten Ergebnisse auf Fehler bei der Umsetzung der Testvorschrift zurückgeführt werden, wie beispielsweise einem nicht zu schonenden Einsetzen in die Testgefäße.

In Hinblick auf die Toxizität der Probe geht von dem beinhalteten Mangan, welches den größten Anteil aller in der Substanz enthaltenen Elemente darstellt, das bedeutendste Potential aus. Laut den in der European Chemicals Agency ECHA hinterlegten und online unter echa.europa.eu abrufbaren Daten geht von Mangan eine Gefährdung für aquatische Organismen aus (ECHA, 2017b). Davon sind sowohl Fische, Wirbellose, Algen als auch Mikroorganismen betroffen. Für Süßwasser wird ein PNEC von $0,034 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ angegeben, bei Salzwasser beträgt dieser Wert $0,003 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (ECHA, 2017b). Die Abkürzung PNEC steht für predicted no effect concentration, also jenen durch Berechnung bestimmten Konzentrationswert, bis zu welchem kein toxischer Effekt eintritt.

Zink stellt mit 24,2 % das am zweithäufigsten in der Probe vertretene Metall dar und weist umweltgefährdende sowie in hohem Grade toxische Eigenschaften gegenüber aquatischen Organismen auf (ECHA, 2017f). Das hohe Toxizitätspotential des untersuchten Batterieaktivmaterials kann daher auf die zwei Metalle Mangan und Zink zurückgeführt werden.

Basierend auf den im Theorieteil ausgeführten Erklärungen und den darin skizzierten Mechanismen lässt sich die toxische Wirkung von Kalium dahingehend erklären, dass durch die im Hälterungsmedium der Versuchsorganismen aufgetretene hohe Konzentration an Kalium den in Abbildung 6 gezeigten Gradienten um ein Vielfaches übersteigt. Hierdurch sind die physiologischen Voraussetzungen für ein intaktes Arbeiten der Zellen nicht länger gegeben, wodurch das Überleben der Organismen direkt beeinflusst wird. Das in der Zellmembran verankerte System zum aktiven Transport von Kalium in das Innere der Zelle ist angesichts der hohen Konzentrationen, denen sich die Zelle ausgesetzt sieht, überlastet. Weiters ist für die Funktion der Natrium-Kalium-Pumpe der Energieträger ATP vonnöten, welcher aus über die Nährstoffe aufgenommener Energie stammt (Guyton, 1981:21). Bei einem Mangel an Nährstoffen, wie dies während der Durchführung des Toxizitätstests der Fall ist, kann der betroffene Organismus nicht mehr ausreichend ATP synthetisieren. Diese Entwicklung bringt zwei wesentliche Effekte mit sich: einerseits findet eine Verminderung der Bewegungsfähigkeit statt, andererseits kann die ordnungsgemäße Arbeitsweise der Natrium-Kalium-Pumpe nicht sichergestellt werden.

Einfluss des Filters auf die Toxizität

Um einen eventuellen Einfluss des Filters auf die Toxizität der auf diese Weise behandelten Probe festzustellen, wurde ein Filter der Maschenweite $0,45 \mu\text{m}$ mit Verdünnungswasser gespült. Das filtrierte Wasser wurde anschließend wie ein Versuch einer zu untersuchenden Probe behandelt und mit Versuchsorganismen versehen. Sowohl beim normgemäß hergestellten Verdünnungswasser als auch bei jenem des Toxkits konnten keine toxischen Effekte beobachtet werden; die Überlebensrate der Organismen lag bei 100 %.

4.6 Bodenprobe

Für den nach der Norm durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 40 und Abbildung 39 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 40: Ergebnisse des Tests an dem Eluat einer Bodenprobe, Durchführung gemäß Norm

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

Eluat einer Bodenprobe, Norm

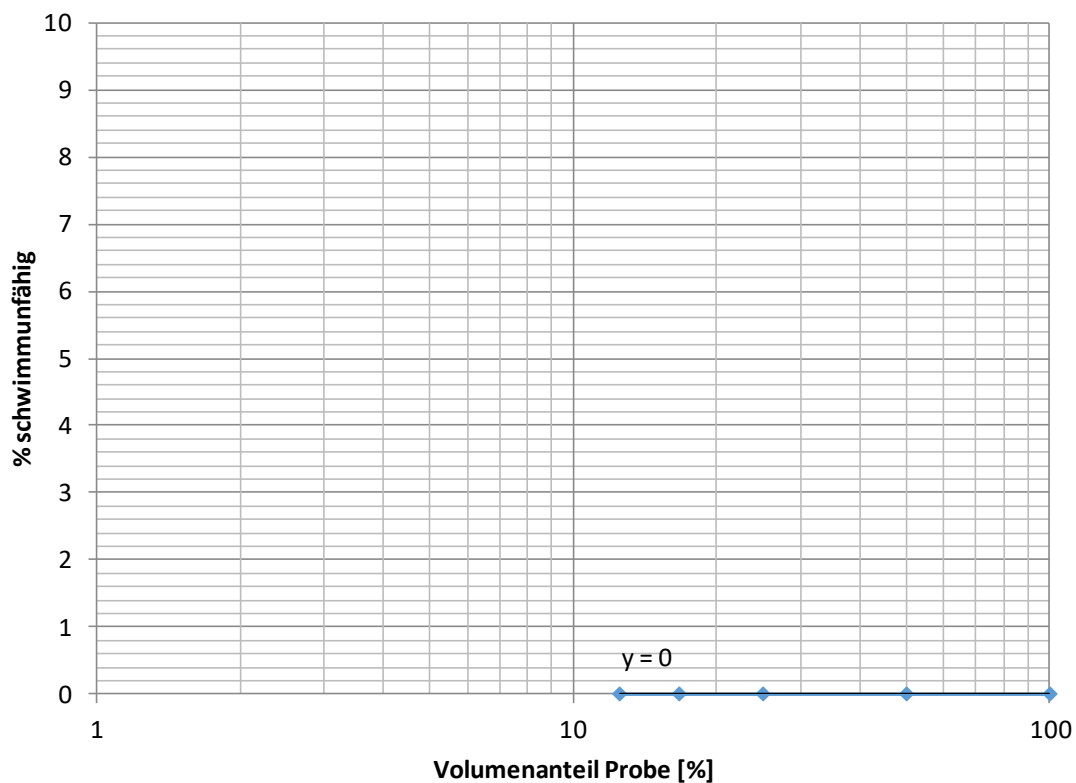


Abbildung 39: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an dem Eluat einer Bodenprobe, Durchführung gemäß Norm

Für den mittels Toxkit durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 41 und Abbildung 40 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 41: Ergebnisse des Tests an dem Eluat einer Bodenprobe, Durchführung mittels Toxkit

EC ₅₀ [%]	EC ₁₆ [%]	EC ₈₄ [%]	T ₀	T ₁
k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.

Eluat einer Bodenprobe, Toxkit

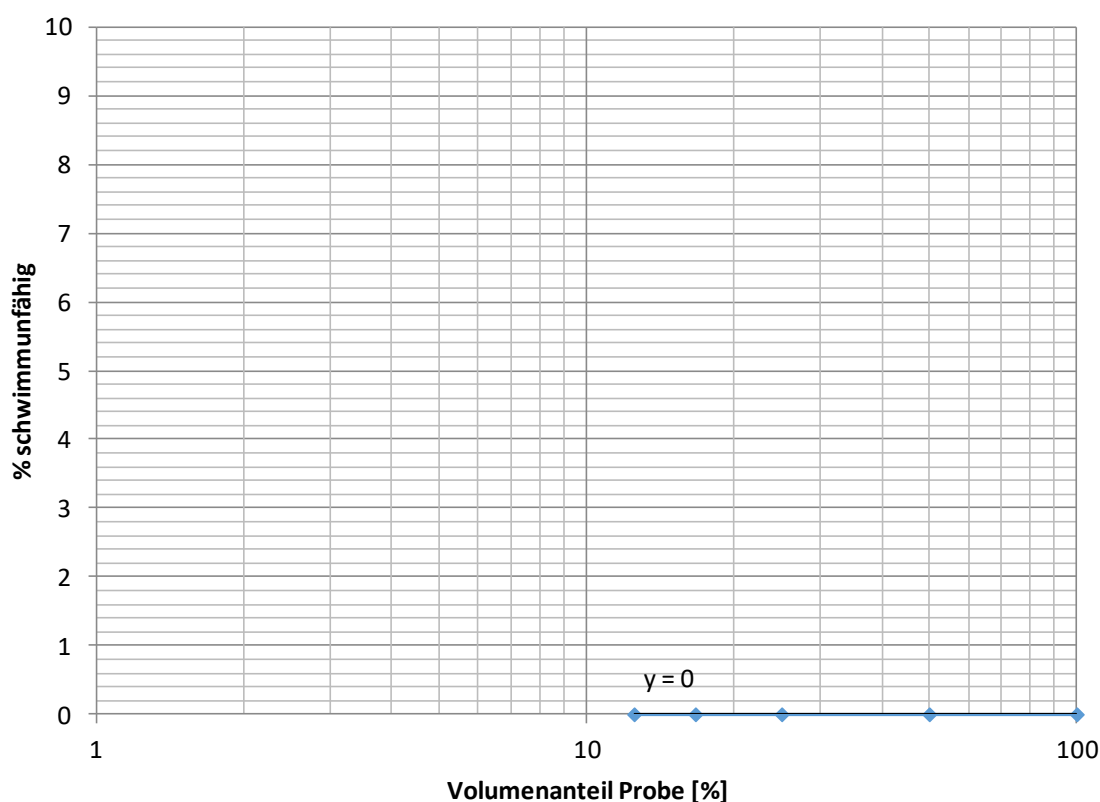


Abbildung 40: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an dem Eluat einer Bodenprobe, Durchführung mittels Toxkit

In Bezug auf die Bodenprobe konnten keinerlei toxische Effekte beobachtet werden. Dies ist einerseits auf die Abwesenheit umweltgefährlicher Substanzen, andererseits auf die Konzentration gelöster Nährstoffe zurückzuführen. Bei der Durchführung des Versuches konnte eine erhöhte Aktivität der Organismen in jenen Verdünnungen beobachtet werden, in welchen der Volumenanteil an Probeneluat im Vergleich zum Verdünnungswasser überwog. Dies deutet auf einen hohen Nährstoffgehalt der Probe hin. Ähnlich wie beim Fall des Oberflächenwassers war es auch hier nicht möglich, Aussagen bezüglich des EC₅₀-Wertes sowie der Grenzen des Vertrauensbereiches zu machen.

4.7 Kaliumdichromat-Lösung

Für den nach der Norm durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 42 und Abbildung 41 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 42: Ergebnisse des Tests an einer Kaliumdichromat-Referenzlösung, Durchführung gemäß Norm

EC ₅₀ [mg*L ⁻¹]	EC ₁₆ [mg*L ⁻¹]	EC ₈₄ [mg*L ⁻¹]	T ₀	T ₁
1,36	0,58	3,21	0,78	2,37

Kaliumdichromat-Lösung , Norm

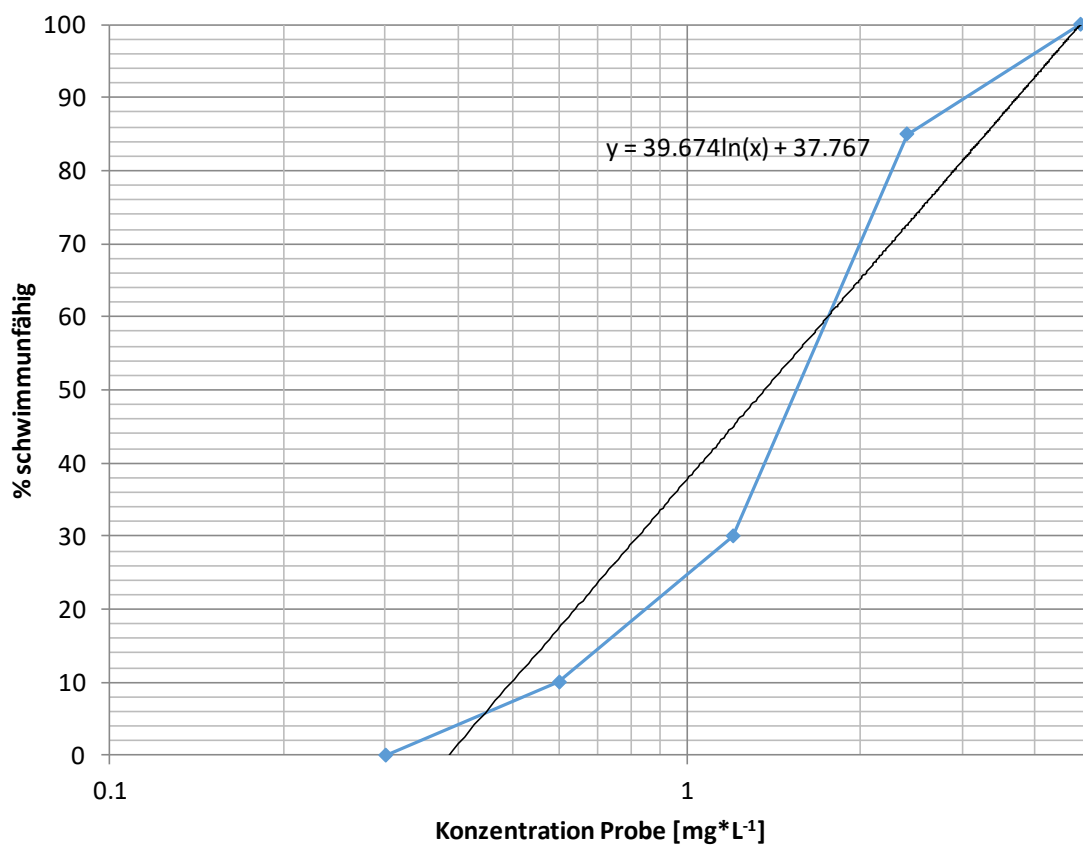


Abbildung 41: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an einer Kaliumdichromat-Referenzlösung, Durchführung gemäß Norm

Für den mittels Toxkit durchgeführten Versuch wurden folgende in Tabelle 43 und Abbildung 42 gezeigten Ergebnisse erhalten.

Tabelle 43: Ergebnisse des Tests an einer Kaliumdichromat-Referenzlösung, Durchführung mittels Toxkit

EC ₅₀ [mg*L ⁻¹]	EC ₁₆ [mg*L ⁻¹]	EC ₈₄ [mg*L ⁻¹]	T ₀	T ₁
1,26	0,55	2,88	0,73	2,17

Kaliumdichromat-Lösung, Toxkit

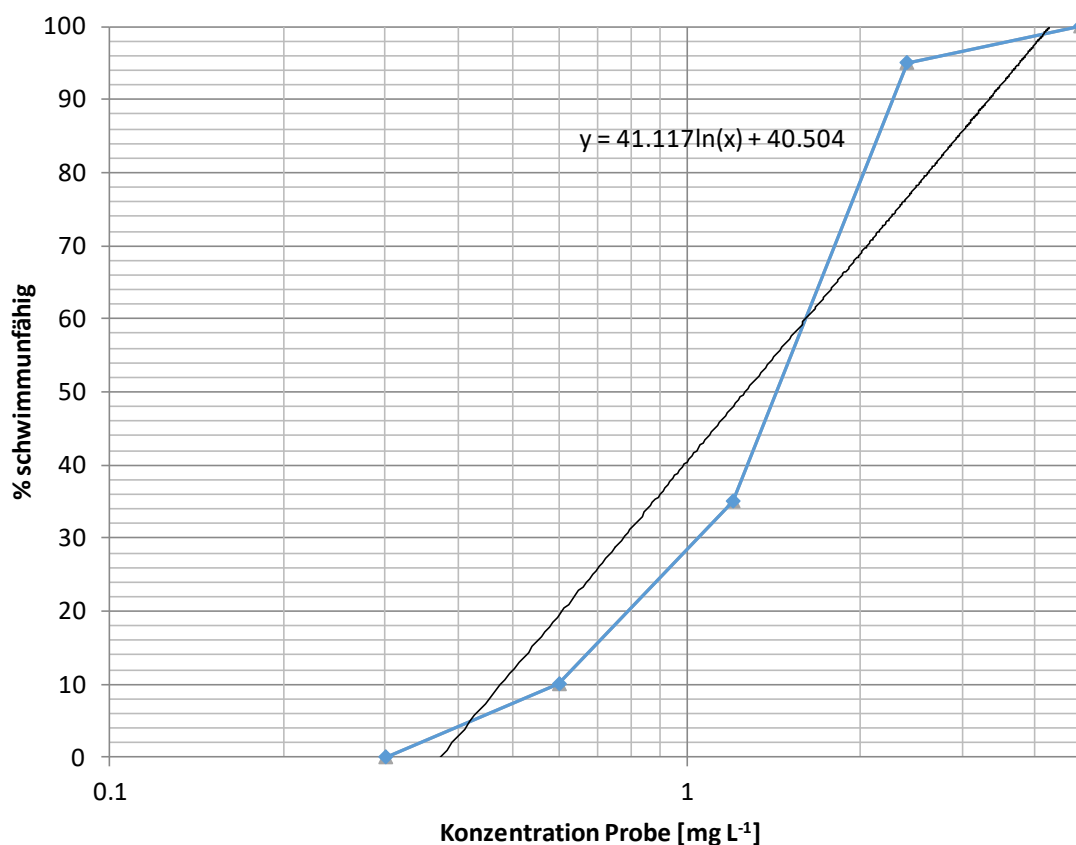


Abbildung 42: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Kaliumdichromat-Referenzlösung, Durchführung mittels Toxkit

Das Toxizitätspotential von Kaliumdichromat rührt zum einen vom zuvor beschriebenen Einfluss auf den Konzentrationsgradienten des Kaliums zwischen dem inneren und äußeren Zellraum, andererseits vom Chromat her. Das Schwermetall liegt in seiner sechswertigen Form vor, jener Oxidationssstufe, welche toxikologisch von Interesse ist (Forth & Henschler, 1984:668). Da sechswertige Chromverbindungen wie CrO₃, K₂CrO₄ und K₂Cr₂O₇ starke Oxidationsmittel sind, geht von ihnen während der Reduktion zum dreiwertigen Chrom eine saure Wirkung aus. Beim Menschen äußert sich die orale Aufnahme von Dichromatlösungen durch starke Verätzungen im Mundbereich, im späteren

Intoxikationsverlauf kommt es zu Schäden des Verdauungstraktes. Der Tod tritt nach urämischen Effekten sowie einem finalen Leberschaden ein. (Forth & Henschler, 1984:668). In der Datenbank der ECHA wird Kaliumdichromat als carcinogene, mutagene, reproduktionstoxische sowie umweltgefährliche Substanz geführt (ECHA, 2017d).

Kaliumdichromat stellt die Referenzsubstanz des Verfahrens dar. Um die Gültigkeitskriterien der Norm zu erfüllen, müssen zwei Bedingungen beachtet werden: neben einer maximalen Anzahl an schwimmunfähigen Daphnien im Kontrollansatz von 10 % muss der EC_{50} -Wert nach 24 h der Referenzsubstanz in einer bestimmten Schwankungsbreite eingehalten werden. Für Kaliumdichromat liegt der Bereich der Gültigkeit zwischen 0,6 und 2,1 $mg \cdot L^{-1}$. (ASI, 2013:13). In der Norm wird weiters empfohlen, den Test mit der Referenzsubstanz innerhalb eines Monats vor oder nach dem ersten Test an einer tatsächlich zu untersuchenden Probe durchzuführen.

Für die im Rahmen der vorliegenden Versuchsreihe ausgeführten Referenztests wurde ein EC_{50} -Wert von 1,36 $mg \cdot L^{-1}$ nach dem Normverfahren beziehungsweise 1,26 $mg \cdot L^{-1}$ für das Verfahren nach dem Toxkit erhalten. Beide Werte liegen innerhalb des vorgegebenen Konzentrationsbereiches, somit können die Ergebnisse der einzelnen Versuche als gültig angesehen werden. In dem den Ehippien beigelegten Spezifikationsblatt ist ebenfalls eine Angabe sowohl zum 24 h- EC_{50} als auch zum 48 h- EC_{50} gegeben. Die Daphnien der eingesetzten Charge weisen eine als 24 h- EC_{50} ausgedrückte Empfindlichkeit gegenüber Kaliumdichromat von 1,30 $mg \cdot L^{-1}$ auf. Da dieser Wert den Mittelwert zwischen den in der praktischen Versuchsdurchführung erhaltenen Konzentrationen von 1,26 und 1,36 $mg \cdot L^{-1}$ darstellt, kann auch von diesem Standpunkt aus die Gültigkeit der Ergebnisse bestätigt werden.

5 Zusammenfassung

In Hinblick auf die Charakterisierung des Toxizitätspotentials von Abfällen und anderer Umweltproben existiert eine umfassende Anzahl an standardisierten Testverfahren. Im Zuge der Implementierung und Validierung eines ökotoxikologischen Tests, welcher am Lehrstuhl für Abfallverwertungstechnik und Abfallwirtschaft der Montanuniversität Leoben zum Zwecke der Lehre eingesetzt werden soll, wurden die verfügbaren normbasierten Versuche im Rahmen von Vorrecherchen auf ihre praktische Durchführbarkeit und Relevanz hin untersucht.

Im Vorfeld der Auswahl eines geeigneten Verfahrens stand die Bedingung, eine Methode auszuwählen, deren Vorgangsweise einerseits durch eine Norm abgedeckt wird und andererseits in gesetzlichen Regelwerken verankert ist. Weiters sollte der neue Versuch die bereits bestehenden Übungen in der Lehrveranstaltung „Laborübungen zu Angewandte Umweltanalytik“ ergänzen.

Ausgehend von diesen Voraussetzungen wurde auf die in Anlage C der Abwasseremissionsverordnung genannten Analysenmethoden zur Bestimmung der Toxizität zurückgegriffen. Hierin werden Normen zur Durchführung von Versuchen an Organismen diverser Trophiestufen sowie zur Feststellung der Beeinträchtigung biologischer Abbauvorgänge angeführt.

Letztendlich fiel die Entscheidung zugunsten des akuten Toxizitätstests zur Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von Krebstieren der Spezies *Daphnia magna* Straus nach ÖNORM EN ISO 6341. Dieser Versuch basiert auf der Bestimmung des EC_{50} , wobei der zu beobachtende Effekt hierbei das Eintreten der Schwimmunfähigkeit der Organismen ist. Für den Test wurde entschieden, da er einerseits in gesetzlichen Regelwerken verankert ist und andererseits im Vergleich zu Alternativen einfach sowie kostengünstig umzusetzen ist – nur eine geringe Anzahl an zusätzlich zu erwerbendem Material wird für seine Durchführung benötigt.

Bei der Beantwortung der Frage nach der Herkunft der Organismen sowie der erforderlichen Materialien für die Durchführung der Versuche wurde im Rahmen dieser Masterarbeit nach geeigneten Anbietern gesucht. Hierbei wurde zugunsten der Angebote des belgischen Unternehmens MicroBioTests, Inc. entschieden. Von diesem Anbieter wurden Eier zur Zucht der Versuchstiere, ein Testkit sowie der Brutschrank bezogen.

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde der Versuch einerseits nach den in der Norm geschilderten Vorgaben, andererseits nach Anleitung des fertig zusammengestellten Toxkits realisiert.

Da der ausgewählte Toxizitätstest zum weiteren Einsatz am Lehrstuhl im Rahmen der Lehre vorgesehen ist, war es von Interesse, die Kosten für einen Versuch zu ermitteln. Hierfür wurde der Listenpreis des mit Material für sechs Tests ausgestatteten Toxkits dem Einzelkauf von Equipment sowie Versuchsorganismen für die normgemäß zu realisierende

Umweltgefährlichkeitsbestimmung gegenüber gestellt. Das Ergebnis weist eine Differenz von etwa 5 € zugunsten des Einzelkaufes an Materialien auf.

Die untersuchten Proben entstammten unterschiedlichen umweltrelevanten Bereichen und waren sowohl flüssiger als auch fester Natur. Während die flüssigen Proben ohne weitere Vorbereitung für den Toxizitätstest herangezogen werden konnten, musste von den in fester Form vorliegenden Proben zunächst ein Eluat hergestellt werden. Abschließend wurde ein Versuch mit der als Referenzmaterial dienenden Substanz Kaliumdichromat durchgeführt, um die Gültigkeit der Ergebnisse zu untermauern.

Der erste Versuch wurde mit Reinstwasser durchgeführt, jedoch ausschließlich gemäß dem Normverfahren. Ein Hauptaspekt dieses ersten Versuches war es, mit der Vorgangsweise der Methodik vertraut zu werden. Für Reinstwasser wurde ein EC_{50} von 38,23 % erhalten – angesichts des Mangels an Nährstoffen in der Probe war dieses Ergebnis zu erwarten.

Zwei weitere flüssige Proben, welche auf ihre Toxizität hin untersucht wurden, waren Leitungswasser sowie Oberflächenwasser aus einem Seitenarm der Mur. Beide Proben wurden in Leoben genommen. Für beide Proben konnte keine, bzw. im Falle des Leitungswassers, nur geringfügige Toxizität festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden angesichts der hohen Qualität von natürlichem Wasser in Österreich erwartet.

Mit mechanisch vorbehandeltem Elektroschrott war zusätzlich zu den wässrigen Proben Material aus dem Abfallsektor vertreten. Die Versuche wurden mit einem gemäß ÖNORM EN 12457-4 hergestellten Eluat der Probe durchgeführt. Für den normgemäß durchgeführten Versuch wurde ein EC_{50} von $3,04 \cdot 10^6$ % erhalten, während mittels Toxkit ein Wert von $3,45 \cdot 10^8$ % ermittelt wurde. Unter Zuhilfenahme der Ergebnisse einer analytischen Charakterisierung des Eluates, welche vervollständigend zum Toxizitätstest vorgenommen wurde, kann das Material als nicht umweltgefährlich eingestuft werden.

Eine zweite Probe aus dem Bereich der Altstoffe stellte metallentfrachtetes Aktivmaterial von Alkali-Mangan-Batterien dar. Ebenso wie beim Elektroschrott wurde vor Beginn der Versuche ein Eluat nach Standardvorgaben angesetzt. Nach Ablauf der Versuchsdauer wurde Schwimmunfähigkeit bei Organismen in sämtlichen Verdünnungsstufen festgestellt. Nach Einstellung des pH-Werts der Probe in den Bereich zwischen 6,0 und 9,0 wurde der Versuch ein weiteres Mal durchgeführt. Hierbei wurde ein EC_{50} von 25,84 % nach dem Normverfahren, bzw. 22,27 % nach der Methode des Toxkits erhalten. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten überein, welche von einem Referenzlabor für Material derselben Zusammensetzung erhalten wurden.

Eine Bodenprobe aus der niederösterreichischen Stadtgemeinde Eggenburg stellte die dritte Feststoffprobe dar. Im untersuchten Eluat der Probe konnte, ähnlich wie beim Oberflächenwasser, keinerlei Toxizität festgestellt werden.

Den Abschluss der Versuchsreihe bildete die Substanz Kaliumdichromat, welche die Funktion als Referenzsubstanz des Verfahrens inne hat. Hierbei wurde ein EC_{50} von

1,26 mg*L⁻¹ nach dem Verfahren des Toxkit, bzw. 1,36 mg*L⁻¹ gemäß dem Normverfahren ermittelt. Um die Gültigkeitskriterien der Norm zu erfüllen wird verlangt, dass für den Versuch mit Kaliumdichromat eine Toxizität innerhalb des Bereiches zwischen 0,6 und 2,1 mg*L⁻¹ erhalten wird, während das den Ehippien beigelegte Beschreibungsblatt eine Empfindlichkeit der Versuchsorganismen von 1,32 mg*L⁻¹ verzeichnet. Die erhaltenen Ergebnisse deckten sich mit den Vorgaben, somit können die bei den vorhergehend durchgeführten Versuche ermittelten Resultate als gültig angesehen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Toxizitätstest zur Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von *Daphnia magna* Straus nach ÖNORM EN ISO 6341 eine im Vergleich zu ähnlichen Versuchen einfach umzusetzende Methode zur Bestimmung des umweltgefährdenden Potentials einer Probe ist. Einzig bei der Bearbeitung lichtundurchlässiger Proben wie es beispielsweise bei dem Eluat von Batterieaktivmaterial der Fall war, ist das Einsetzen der Organismen in die Testgefäße schwierig durchzuführen. Bei diesem Schritt des Versuches muss exakt gearbeitet werden, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen. Die Sichtbarkeit der Organismen fällt bei dieser Probe trotz der rötlichen Färbung ihrer Schale schwer.

Weiters ist der Versuch nicht mit allzu hohen Kosten verbunden, die höchste finanzielle Belastung geht hierbei vom Inkubator aus, welcher mit etwa 2.000 € zu Buche schlägt. Dies in Kombination mit einer Gesamtversuchsdauer von ungefähr zwei Tagen macht den angewandten Toxizitätstest ideal für eine Laborübung für Studenten im Rahmen einer Lehrveranstaltung.

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- ASI (Austrian Standards Institute), 2009. ÖNORM EN ISO 15088: 2009 05 01 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*) (ISO 15088:2007).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2009a. ÖNORM EN ISO 21427-2: 2009 08 01 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Gentoxizität mit dem In-vitro-Mikrokerntest – Teil 2: Verwendung einer nicht-synchronisierten V79-Zellkulturlinie (ISO 21427-2:2006).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2011. ÖNORM EN ISO 15952: 2011 08 01 – Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Jungtiere von Landschnecken – Bestimmung der Wirkungen auf das Wachstum durch Bodenverunreinigung (ISO 15952:2006).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2011a. ÖNORM EN 16086-1: 2011 12 15 – Bodenverbesserungsmittel und Kultursubstrate – Bestimmung der Pflanzenverträglichkeit – Teil 1: Wachstumstest mit Chinakohl im Topf.
- ASI (Austrian Standards Institute), 2011b. ÖNORM EN 16086-2: 2011 12 15 – Bodenverbesserungsmittel und Kultursubstrate – Bestimmung der Pflanzenverträglichkeit – Teil 2: Petrischalentest mit Kresse.
- ASI (Austrian Standards Institute), 2011c. ÖNORM EN ISO 20963: 2011 08 15 – Bodenbeschaffenheit – Auswirkungen von Schadstoffen auf Insektenlarven (*Oxythyrea funesta*) – Bestimmung der akuten Toxizität (ISO 20963:2005).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2011d. ÖNORM EN ISO 22030: 2011 08 15 – Bodenbeschaffenheit – Biologische Verfahren – Chronische Toxizität in höheren Pflanzen (ISO 22030:2005).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2012. ÖNORM EN ISO 8692: 2012 04 15 – Wasserbeschaffenheit – Süßwasser-algen-Wachstumshemmtest mit einzelligen Grünalgen (ISO 8692:2012).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2013. ÖNORM EN ISO 6341: 2013 05 15 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Akuter Toxizitäts-Test (ISO 6341:2012).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2013a. ÖNORM EN ISO 10710: 2013 07 01 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Wachstumshemmung auf die marine und ästuarine Makroalge *Ceramium tenuicorne* (ISO 10710:2010).

- ASI (Austrian Standards Institute), 2013b. ÖNORM EN ISO 11269-1: 2013 02 01 – Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora – Teil 1: Verfahren zur Messung der Wurzelwachstumshemmung (ISO 11269-1:2012).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2013c. ÖNORM EN ISO 11269-2: 2013 02 01 – Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora – Teil 2: Wirkung von verunreinigten Böden auf Saataufgang und frühes Wachstum höherer Pflanzen (ISO 11269-2:2012).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2014. ÖNORM EN ISO 11267: 2014 05 15 – Bodenbeschaffenheit – Hemmung der Reproduktion von Collembolen (*Folsomia candida*) durch Verunreinigungen (ISO 11267:2014).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2014a. ÖNORM EN ISO 14238: 2014 01 15 – Bodenbeschaffenheit – Biologische Verfahren – Bestimmung der Stickstoffmineralisierung und -nitrifizierung in Böden und der Einflüsse von Chemikalien auf diese Prozesse (ISO 14238:2012).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2014b. ÖNORM EN ISO 16387: 2014 12 15 – Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Verunreinigungen auf Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) – Bestimmung der Wirkungen auf die Reproduktion (ISO 16387:2014).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2014c. ÖNORM EN ISO 18772: 2014 05 01 – Bodenbeschaffenheit – Anleitung für Elutionsverfahren für die nachfolgende chemische und ökotoxikologische Prüfung von Böden und Bodenmaterialien (ISO 18772:2008).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2015. ÖNORM EN ISO 11268-1: 2015 11 15 – Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer – Teil 1: Bestimmung der akuten Toxizität auf *Eisenia fetida* / *Eisenia andrei* (ISO 11268-1:2012).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2015a. ÖNORM EN ISO 11268-2: 2015 11 15 – Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer – Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung von *Eisenia fetida* / *Eisenia andrei* (ISO 11268-2:2012).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2015b. ÖNORM EN ISO 11504: 2015 09 01 – Bodenbeschaffenheit – Beurteilung der Wirkung von mit Mineralölkohlenwasserstoffen verunreinigten Böden (ISO/DIS 11504:2015).

- ASI (Austrian Standards Institute), 2016. ÖNORM EN ISO 10253: 2016 01 15 – Wasserbeschaffenheit – Wachstumshemmtest mit marinen Algen *Skeletonema* sp. und *Phaeodactylum tricornutum* (ISO/DIS 10253:2015).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2016a. ÖNORM EN ISO 18187: 2016 08 01 – Bodenbeschaffenheit – Feststoffkontakttest unter Verwendung der Dehydrogenaseaktivität von *Arthrobacter globiformis* (ISO 18187:2016).
- ASI (Austrian Standards Institute), 2016b. ÖNORM EN ISO 20227: 2016 06 01 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung von Abwässern, natürlichen Wässern und Chemikalien auf die Wasserlinseart *Spirodela polyrhiza* – Verfahren mittels Stammkultur unabhängigem mikrobiologischem Test (ISO/DIS 20227:2016).
- Bakke, I., 2016. Skriptum zur Vorlesung Environmental Biotechnology. Norwegian University of Science and Technology, Trondheim.
- Baumann, W., Muth, A., 1997. Batterien: Daten und Fakten zum Umweltschutz. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich, 1996. Verordnung des Bundesministers für Land- und Forstwirtschaft über die allgemeine Begrenzung von Abwasseremissionen in Fließgewässer und öffentliche Kanalisationen: Allgemeine Abwasseremissionsverordnung 1996 – AAEV 1996.
- Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich, 2004. Bundesgesetz über den Schutz der Tiere: Tierschutzgesetz 2004 – TSchG 2004.
- CEN (Europäisches Komitee für Normung), 2010. ONR CEN/TR 16110: 2011 02 01 Charakterisierung von Abfällen – Anleitung zur Anwendung von Ökotoxizitätsprüfungen auf Abfälle (CEN/TR 16110:2010).
- Cotman, M., Drolc, A., Tišler, T., 2009. Interlaboratory studies on wastewater toxicity using *Daphnia magna*. *Accred Qual Assur* 14 (6), 319–327. 10.1007/s00769-009-0519-6.
- DIN (Deutsches Institut für Normung, e.V.), 1991. DIN 38412-33 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L); Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (*Scenedesmus*-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (L 33).

- DIN (Deutsches Institut für Normung, e.V.), 1999. DIN 38412-37 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) - Teil 37: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf das Wachstum von Bakterien (Photobacterium phosphoreum; Zellvermehrungs-Hemmtest) (L 37).
- ECHA (European Chemicals Agency), 2017. Registration Dossier Calcium – Ecotoxicological Summary. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15400/6/1>. Zuletzt abgerufen am 17.05.2017.
- ECHA (European Chemicals Agency), 2017a. Registration dossier Manganese – Ecotoxicological Summary. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/15553/6/1>. Zuletzt abgerufen am 14.05.2017.
- ECHA (European Chemicals Agency), 2017b. Substance Information Magnesium. https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.028.276?disssubinfo_WAR_disssubinfoportlet_backURL=https%3A%2F%2Fecha.europa.eu%2Fsearch-for-chemicals%3Fp_p_id%3Ddisssimplesearch_WAR_dissearchportlet%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1%26_disssimplesearch_WAR_dissearchportlet_sessionCriteriaId%3DdisSimpleSearchSessionParam101401494970606954. Zuletzt abgerufen am 16.05.2017.
- ECHA (European Chemicals Agency), 2017c. Substance Information Potassium. <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.028.290>. Zuletzt abgerufen am 14.05.2017.
- ECHA (European Chemicals Agency), 2017d. Substance Information Potassium dichromate. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.029.005>. Zuletzt abgerufen am 14.05.2017.
- ECHA (European Chemicals Agency), 2017e. Substance Information Sodium. <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.028.302>. Zuletzt abgerufen am 17.05.2017.
- ECHA (European Chemicals Agency), 2017f. Substance Information Zinc. <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.028.341>. Zuletzt abgerufen am 14.05.2017.
- Forbes, V.E., Forbes, T.L., 1994. Ecotoxicology in theory and practice, 1st ed. Chapman & Hall, London, 247 pp.

- Forth, W., Henschler, D. (Eds.), 1984. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten d. Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte u. Apotheker, 4th ed. Bibliograph. Inst, Mannheim, 751 pp.
- Fuhrmann, G.F., 2006. Toxikologie für Naturwissenschaftler: Einführung in die Theoretische und Spezielle Toxikologie. B. G. Teubner Verlag / GWV Fachverlage GmbH Wiesbaden, Wiesbaden.
- Guyton, A.C., 1981. Textbook of medical physiology, 6th ed. Saunders, Philadelphia, Pa., 1074 pp.
- Holler, S., Schäfers, C., Sonnenberg, J., 1996. Umweltanalytik und Ökotoxikologie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 478186 pp.
- Lactan Vertriebsgesellschaft mbH, 2017. Per e-Mail am 15.02.2017 unterbreitetes Angebot für einen Peltier-Kühlbrutschrank der Firma Memmert.
- Lehrstuhl für Abfallverwertungstechnik und Abfallwirtschaft, 2017. Prüfbericht zum ICP-MS Screening von WEEE-Material. Montanuniversität Leoben, Leoben.
- Memmert GmbH, 2017. Katalog zum aktuellen Programm an Brutschränken.
- MicroBioTests, Inc., 2017. Informationsblatt zum angebotenen Inkubator. Online verfügbar unter <http://www.microbiotests.be/equipment/all-round%20toxkit%20incubator.pdf>. Zuletzt abgerufen am 12.05.2017.
- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 1987. ÖNORM M 6263-1: 1987 11 01 – Testverfahren mit Wasserorganismen; Bestimmung der akuten Toxizität von Wasserinhaltsstoffen gegenüber *Salmo gairdneri* Richardson (Regenbogenforelle); Statischer Test.
- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 1987a. ÖNORM M 6263-2: 1987 11 01 – Testverfahren mit Wasserorganismen; Bestimmung der akuten Toxizität von Wasserinhaltsstoffen gegenüber *Salmo gairdneri* Richardson (Regenbogenforelle); Semistatischer Test.
- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 1987b. ÖNORM M 6263-3: 1987 11 01 – Testverfahren mit Wasserorganismen; Bestimmung der akuten Toxizität von Wasserinhaltsstoffen gegenüber *Salmo gairdneri* Richardson (Regenbogenforelle); Durchflußtest.
- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 1996. ÖNORM EN ISO 10712: 1996 02 01 – Wasserbeschaffenheit – *Pseudomonas putida* Wachstumshemmtest (*Pseudomonas*-Zellvermehrungshemmtest) (ISO 10712:1995).

- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 1998. ÖNORM EN ISO 7346-1: 1998 03 01 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Teil 1: Statisches Verfahren (ISO 7346-1:1996).
- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 1998a. ÖNORM EN ISO 7346-2: 1998 03 01 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Teil 2: Semistatisches Verfahren (ISO 7346-2:1996).
- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 1998b. ÖNORM EN ISO 7346-3: 1998 03 01 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Teil 3: Durchflußverfahren (ISO 7346-3:1996).
- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 2006. ÖNORM EN ISO 9509: 2006 11 01 – Wasserbeschaffenheit – Toxizitätstest zur Bestimmung der Nitrifikationshemmung in Belebtschlamm (ISO 9509:2006).
- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 2006a. ÖNORM EN 14735: 2006 08 01 Charakterisierung von Abfällen – Herstellung von Abfallproben für ökotoxikologische Untersuchungen (konsolidierte Fassung).
- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 2006b. ÖNORM EN ISO 16712: 2006 12 01 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der akuten Toxizität mariner Sedimente oder von Sedimenten aus Flussmündungsgebieten gegenüber Amphipoden (ISO 16712:2005).
- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 2006c. ÖNORM EN ISO 20079: 2006 12 01 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (Lemna minor) – Wasserlinsen-Wachstumshemmtest (ISO 20079:2005).
- ON (Österreichisches Normungsinstitut), 2007. ÖNORM EN ISO 8192: 2007 06 01 – Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Belebtschlamm nach Kohlenstoff- und Ammonium-Oxidation (ISO 8192:2007).
- Persoone, G., Baudo, R., Cotman, M., Blaise, C., Thompson, K.C., Moreira-Santos, M., Vollat, B., Törökne, A., Han, T., 2009. Review on the acute Daphnia magna toxicity test – Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. Knowl. Managt. Aquatic Ecosyst. (393), 1. 10.1051/kmae/2009012.

- Ram, J.L., Walker, J.U., 1993. Effects of deionized water on viability of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 105 (3), 409–414. 10.1016/0742-8413(93)90079-Z.
- Rodriguez, P., Martinez-Madrid, M., Cid, A., 2006. Ecotoxicological assessment of effluents in the Basque country (Northern Spain) by acute and chronic toxicity tests using *Daphnia magna* straus. *Ecotoxicology (London, England)* 15 (7), 559–572. 10.1007/s10646-006-0091-3.
- ZAMG (Zentralanstalt für Meteorologie und Geodynamik), 2017. Online-Abfrage der Wetterparameter für Eggenburg, Bezirk Horn, <https://www.zamg.ac.at/cms/de/wetter/wetterwerte-analysen/tawes-verlaufsgraphiken/horn/temperatur/?mode=geo&druckang=red>. Abfrage der Daten am 18.04.2017.
- ZAMG (Zentralanstalt für Meteorologie und Geodynamik), 2017a. Online-Abfrage der Wetterparameter für Leoben, <https://www.zamg.ac.at/cms/de/wetter/wetterwerte-analysen/tawes-verlaufsgraphiken/leoben/temperatur/?mode=geo&druckang=red>. Abfrage der Daten am 29.03.2017.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
µS	Mikrosiemens
AAEV	allgemeine Abwasseremissionsverordnung
Abs.	Absatz
ADP	Adenosindiphosphat
ASI	Austrian Standards Institute
ATH	Allylthioharnstoff
ATP	Adenosintriphosphat
Ba	Barium
BCF	Bioconcentration Factor
BGBI.	Bundesgesetzblatt
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaCO ₃	Calciumcarbonat
CEN	Comité Européen de Normalisation
cm	Centimeter
Cr	Chrom
CrO ₃	Chromtrioxid
Cu	Kupfer

d	Durchmesser
DIN	Deutsches Institut für Normung
ECHA	European Chemicals Agency
EC _x	Effect Concentration, x %
EN	Europäische Norm
Fe	Eisen
FNU	Formazine Nephelometric Units
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HCN	Cyanwasserstoff
hPa	Hektopascal
ICP	inductively coupled plasma
Inc.	Incorporated
ISO	International Organization for Standardization
K	Kalium
k.A.	keine Angabe
K ₂ Cr ₂ O ₇	Kaliumdichromat
K ₂ CrO ₄	Kaliumchromat
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KOH	Kaliumhydroxid
L	Liter
l	Länge
LBB	Lethal Body Burdens
LC _x	Lethal Concentration, x %
Li	Lithium
LOEC	Lowest observed effect concentration
lt.	laut
lx	Lux
max.	maximal
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
Mn	Mangan
mS	Millisiemens
MS	Massenspektrometer
N	Stickstoff
Na	Natrium

NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
Ni	Nickel
NIC	National Institute of Chemistry
nm	Nanometer
NOEC	No observed effect concentration
Nr.	Nummer
ON	Österreichisches Normungsinstitut
ÖNORM	Österreichische Norm
P	Phosphor
PNEC	Predicted no effect concentration
ppm	parts per million
pT	Potentielle Toxizität
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
SAG	Sammlung von Algenkulturen
Si	Silicium
Sr	Strontium
Stk.	Stück
susp.	suspendiert
T	Temperatur
TD	Toxische Dosis
TS	Trockensubstanz
USA	United States of America
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
WEEE	Waste of Electrical and Electronic Equipment
z.B.	Zum Beispiel
ZAMG	Zentralanstalt für Meteorologie und Geodynamik
Zn	Zink

6.3 Tabellen

Tabelle 1: Bewertung der Toxizität (nach Holler et al., 1996:396)	14
Tabelle 2: Toxikologische Interpretation der pT ₅₀ -Klassen (Fuhrmann, 2006:13)	14
Tabelle 3: Übersicht über ehemals und derzeit eingesetzte Fischarten (Holler et al., 1996:386)	27
Tabelle 4: Übersicht über Normen zur Toxizitätsbestimmung von Wasserproben (vgl. AAEV, 1996: Anlage C)	28
Tabelle 5: Übersicht über Normen zur Toxizitätsbestimmung von Bodenproben	43
Tabelle 6: Übersicht über den Lieferumfang des Toxkits	66

Tabelle 7: Vergleich zur Verfügung stehender Brutschränke (Lactan GmbH, 2017; Memmert GmbH, 2017; Microbiotests, Inc., 2017).....	69
Tabelle 8: Kosten der für den Versuch notwendigen Pipetten sowie Messkolben	70
Tabelle 9: Übersicht über die für den Versuch zu erwerbenden Materialien	71
Tabelle 10: Gegenüberstellung der Kosten für einen Test.....	72
Tabelle 11: Gegenüberstellung der Kosten für einen Test bei Vorhandensein der gängigen Laborutensilien sowie des Inkubators	72
Tabelle 12: Stammlösungen des Verdünnungswassers gemäß den Vorgaben in der Norm. 75	
Tabelle 13: Stammlösungen des Verdünnungswassers wie im Toxkit mitgeliefert	75
Tabelle 14: Für die Versuche hergestellte Verdünnungen	78
Tabelle 15: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für Reinstwasser	82
Tabelle 16: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für Leobner Leitungswasser nach Entnahme der Probe	82
Tabelle 17: Umgebungsbedingungen der Probenahme von Oberflächenwasser (ZAMG, 2017)	82
Tabelle 18: Parameter von Oberflächenwasser nach Entnahme der Probe	83
Tabelle 19: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für das aus Elektronikabfällen hergestellte Eluat	85
Tabelle 20: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für Batterieaktivmaterial nach Herstellung des Eluats	86
Tabelle 21: Umgebungsbedingungen zum Zeitpunkt der Entnahme der Bodenprobe (ZAMG, 2017)	87
Tabelle 22: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für die Bodenprobe nach Herstellung des Eluats	87
Tabelle 23: Ergebnisse ausgewählter Überwachungsparameter für die Kaliumdichromat-Lösung	88
Tabelle 24: Für die Versuche mit Kaliumdichromat gewählte Verdünnungsreihe	88
Tabelle 25: Ergebnisse des Tests an Reinstwasser	89
Tabelle 26: Ergebnisse des Tests an Leitungswasser, Durchführung gemäß Norm	91
Tabelle 27: Ergebnisse des Tests an Leitungswasser, Durchführung mittels Toxkit	91
Tabelle 28: Ergebnisse des Tests an Oberflächenwasser, Durchführung gemäß Norm	93
Tabelle 29: Ergebnisse des Tests an Oberflächenwasser, Durchführung mittels Toxkit	93
Tabelle 30: Ergebnisse des Tests an Eluat aus einer Elektronikabfall-Probe, Durchführung gemäß Norm	95

Tabelle 31: Ergebnisse des Tests an Eluat aus einer Elektronikabfall-Probe, Durchführung mittels Toxkit	95
Tabelle 32: Ergebnis der Analyse des Elektronikabfall-Materials	96
Tabelle 33: Zusammensetzung der Schwarzmasse	97
Tabelle 34: Ergebnisse des Tests an Eluat von Batterieaktivmaterial, Durchführung gemäß Norm.....	98
Tabelle 35: Ergebnisse des Tests an Eluat von Batterieaktivmaterial, Durchführung mittels Toxkit.....	99
Tabelle 36: Ergebnisse des Tests an Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Durchführung gemäß Norm	101
Tabelle 37: Ergebnisse des Tests an Eluat von Batterieaktivmaterials nach Einstellung des pH-Wertes, Durchführung gemäß Toxkit.....	102
Tabelle 38: Ergebnisse des Versuches an Batterieaktivmaterial mit einem ursprünglichen pH-Wert von 11,4 (Prüfbericht des deutschen Vergleichslabors).....	103
Tabelle 39: Gegenüberstellung der Ergebnisse zur Bestimmung des G_D -Wertes von Batterieaktivmaterial	103
Tabelle 40: Ergebnisse des Tests an dem Eluat einer Bodenprobe, Durchführung gemäß Norm.....	105
Tabelle 41: Ergebnisse des Tests an dem Eluat einer Bodenprobe, Durchführung mittels Toxkit.....	106
Tabelle 42: Ergebnisse des Tests an einer Kaliumdichromat-Referenzlösung, Durchführung gemäß Norm	107
Tabelle 43: Ergebnisse des Tests an einer Kaliumdichromat-Referenzlösung, Durchführung mittels Toxkit	108

6.4 Abbildungen

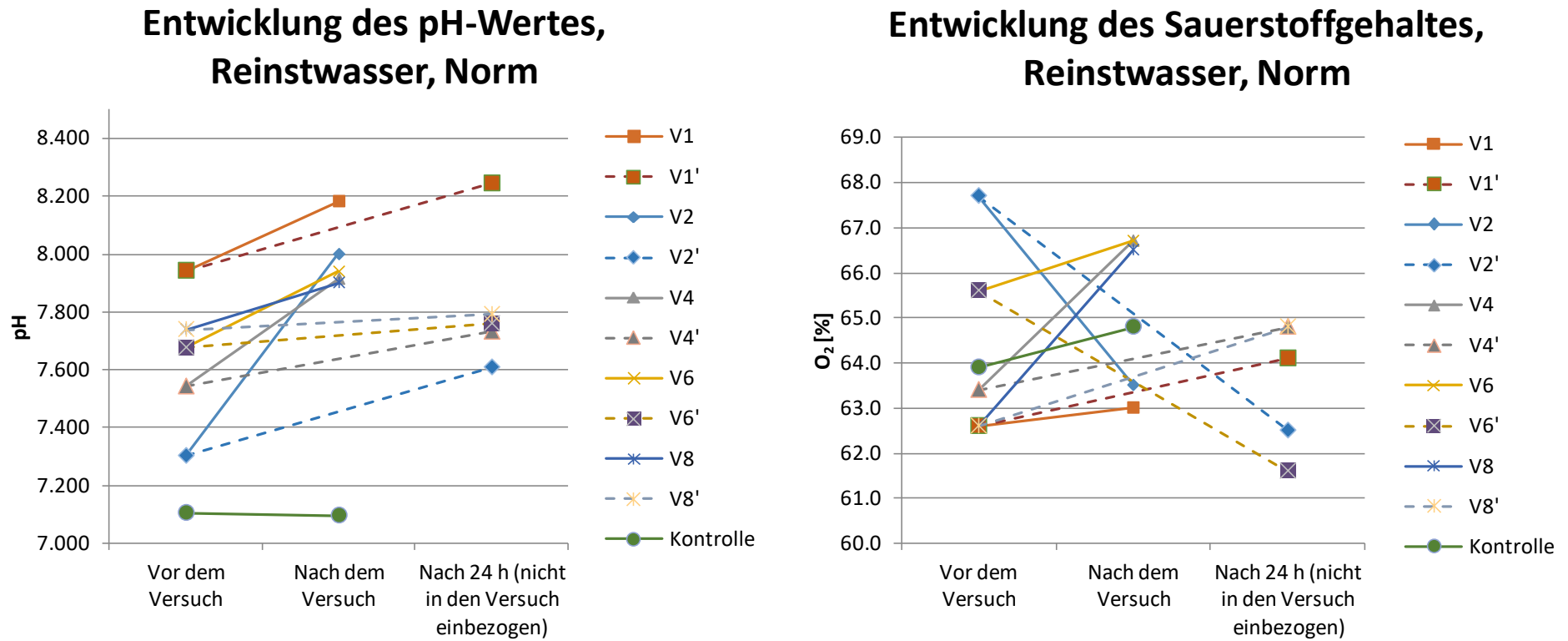
Abbildung 1: Gegenüberstellung der Beziehung zwischen Ökotoxikologie und verwandten Disziplinen (Forbes & Forbes, 1994:20).....	6
Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung (Fuhrmann, 2006:11)	9
Abbildung 3: QSARs zur Toxizität gegenüber der Lipophilie. Dicker Balken: lipophile Narkotika. Dünne Linien: Korrelationen über Datenpunkte vermuteter spezieller Wirktypklassen (Holler et al., 1996:395).....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise eines Schadstoffes auf den Wirkort innerhalb eines Organismus (Fuhrmann, 2006:18).....	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Vorgänge während der Biotransformation (Fuhrmann, 2006:65)	20

Abbildung 6: Chemische Zusammensetzung der extra- und intrazellulären Flüssigkeiten (Guyton, 1981:41)	22
Abbildung 7: Schematische Darstellung des aktiven Transportes von Natrium und Kalium durch die Zellmembran (Guyton, 1981:52).....	23
Abbildung 8: Übersicht über derzeit aktuelle Toxizitätstests	25
Abbildung 9: Lebenszyklus von D. magna (ASI, 2013:22)	58
Abbildung 10: Mittlerer 24 h-EC ₅₀ in mg*L ⁻¹ für K ₂ Cr ₂ O ₇ . Neben dem Durchschnittswert ist auch die Standardabweichung der Ergebnisse angegeben (Persoone et al., 2009).	61
Abbildung 11: Variationskoeffizienten der für Probe T1 erhaltenen Ergebnisse im Vergleich von Daphnien aus Laborzuchten mit Organismen aus vorkultivierten Ehippien (Cotman et al., 2009)	63
Abbildung 12: Variationskoeffizienten der für Probe T2 erhaltenen Ergebnisse im Vergleich von Daphnien aus Laborzuchten mit Organismen aus vorkultivierten Ehippien (Cotman et al., 2009)	64
Abbildung 13: Übersicht über die notwendigen Schritte zur Versuchsdurchführung.....	74
Abbildung 14: Benötigte Materialien zur Zucht: 15 mL Verdünnungswasser, Mikrosieb, Petrischale und ein Tube Ehippien	76
Abbildung 15: Überführen des Inhaltes der Phiolen in das Mikrosieb	77
Abbildung 16: Transfer der Ehippien vom Sieb in die Petrischale mithilfe von Verdünnungswasser	77
Abbildung 17: Inkubation der Eier im Brutschrank bei konstanter Beleuchtung von 6.000 lx; Positionierung der Petrischale 1 cm unter der Lichtquelle	77
Abbildung 18: Schlupf der ersten Neonaten nach 72 h	78
Abbildung 19: Übersicht der mit dem Verfahren nach ÖNORM EN ISO 6341 bzw. mittels Toxkit untersuchten Proben	81
Abbildung 20: Ort der Probenahme des Oberflächenwassers	83
Abbildung 21: Die zu untersuchende Probe Oberflächenwasser	83
Abbildung 22: Auf eine Korngröße < 6 mm zerkleinerte Elektronikabfälle.....	84
Abbildung 23: Elektro- und Elektronikabfälle	84
Abbildung 24: Links: das unbehandelte Eluat der Elektronikabfall-Probe. Rechts: das Eluat nach dem Zentrifugieren	85
Abbildung 25: Batterieaktivmaterial, Korngröße < 2 mm.....	85
Abbildung 26: links: Eluat des Batterieaktivmaterials, rechts: zentrifugiertes sowie filtriertes Eluat des Batterieaktivmaterials	86

Abbildung 27: Links: Ort der Entnahme der Bodenprobe. Rechts: die untersuchte Bodenprobe.....	87
Abbildung 28: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Reinstwasser ..	89
Abbildung 29: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Leitungswasser, Durchführung gemäß Norm	91
Abbildung 30: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Leitungswasser, Durchführung mittels Toxkit	92
Abbildung 31: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Oberflächenwasser, Durchführung gemäß Norm	93
Abbildung 32: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Oberflächenwasser, Durchführung mittels Toxkit	94
Abbildung 33: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat aus einer Elektronikabfall-Probe, Durchführung gemäß Norm	95
Abbildung 34: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat aus einer Elektronikabfall-Probe, Durchführung mittels Toxkit	96
Abbildung 35: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat von Batterieaktivmaterial, Durchführung gemäß Norm.....	98
Abbildung 36: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat von Batterieaktivmaterial, Durchführung mittels Toxkit.....	99
Abbildung 37: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Durchführung gemäß Norm ...	101
Abbildung 38: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Durchführung gemäß Toxkit...	102
Abbildung 39: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an dem Eluat einer Bodenprobe, Durchführung gemäß Norm	105
Abbildung 40: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an dem Eluat einer Bodenprobe, Durchführung mittels Toxkit	106
Abbildung 41: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an einer Kaliumdichromat-Referenzlösung, Durchführung gemäß Norm.....	107
Abbildung 42: Schwimmunfähigkeit in Abhängigkeit des Volumenanteils an Kaliumdichromat-Referenzlösung, Durchführung mittels Toxkit.....	108

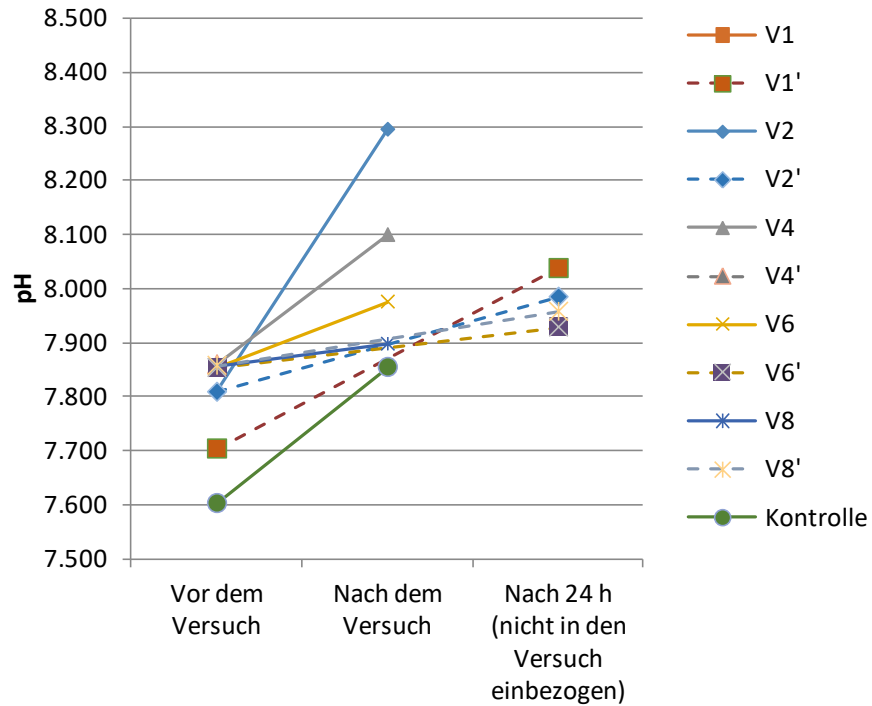
Anhang A

Im Anhang A ist die Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes über den Versuchszeitraum festgehalten.

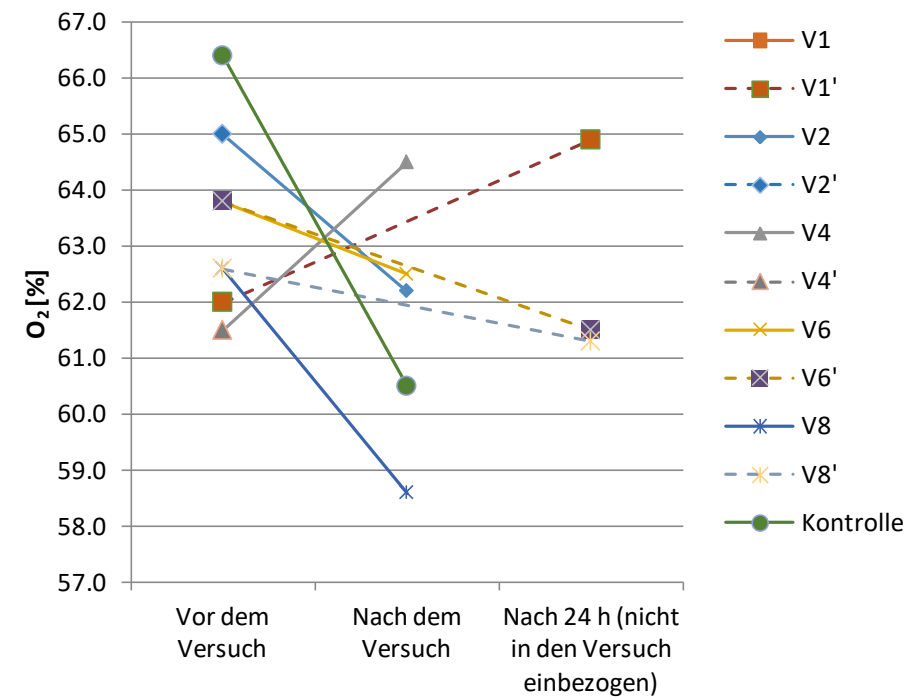


Anhang A Abbildung 1: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für Reinstwasser nach dem Normverfahren

Entwicklung des pH-Wertes, Leitungswasser, Norm

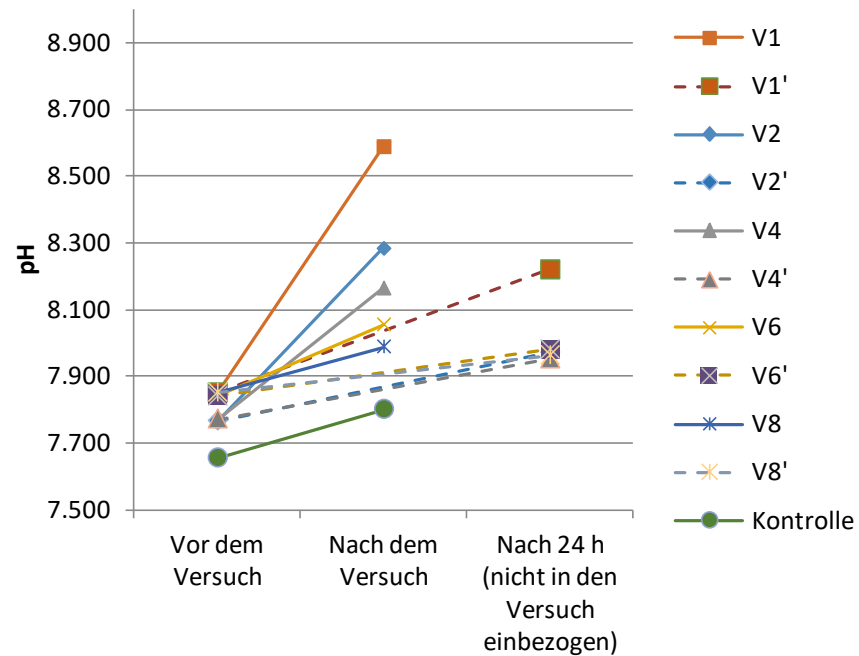


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Leitungswasser, Norm

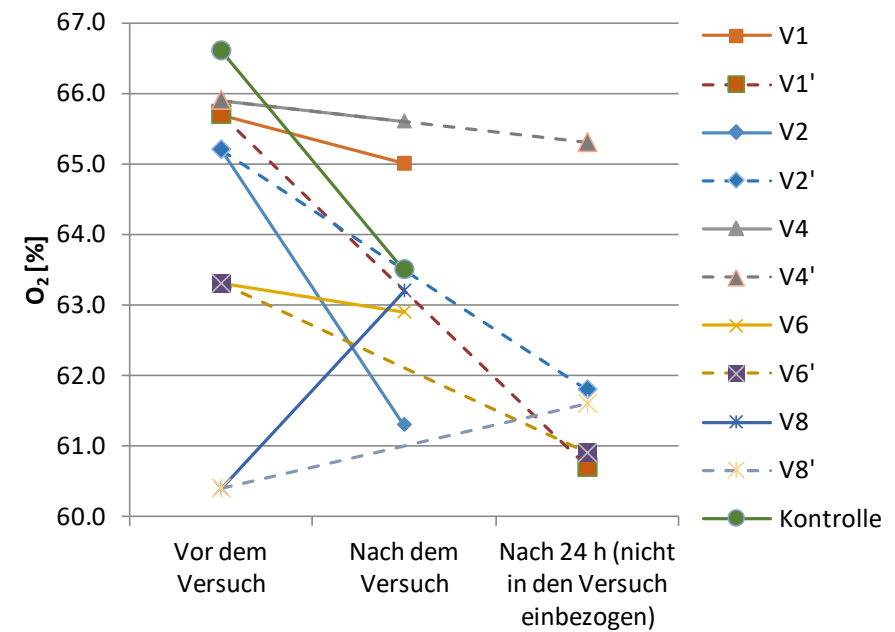


Anhang A Abbildung 2: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für Leitungswasser nach dem Normverfahren

Entwicklung des pH-Wertes, Leitungswasser, Toxkit

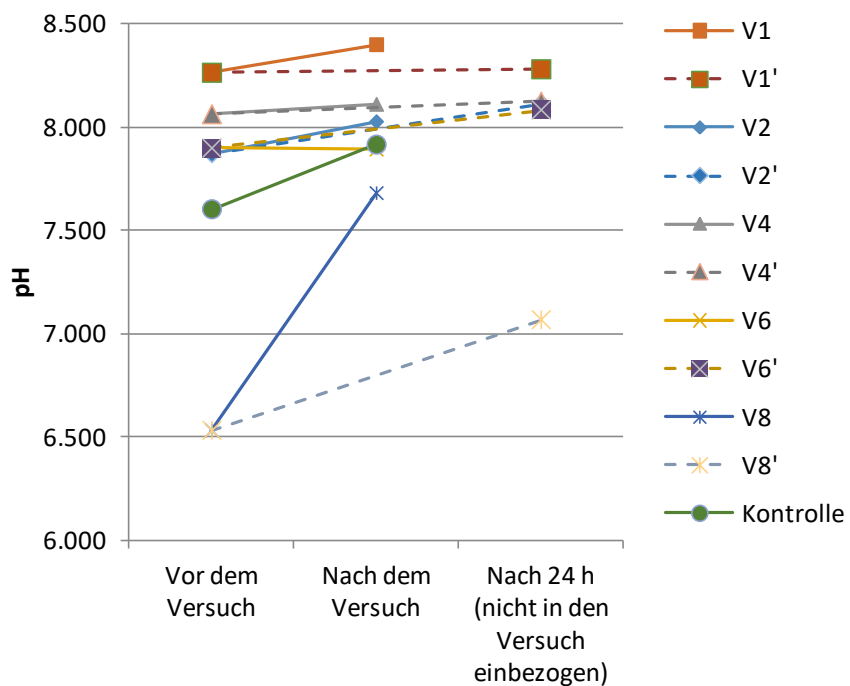


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Leitungswasser, Toxkit

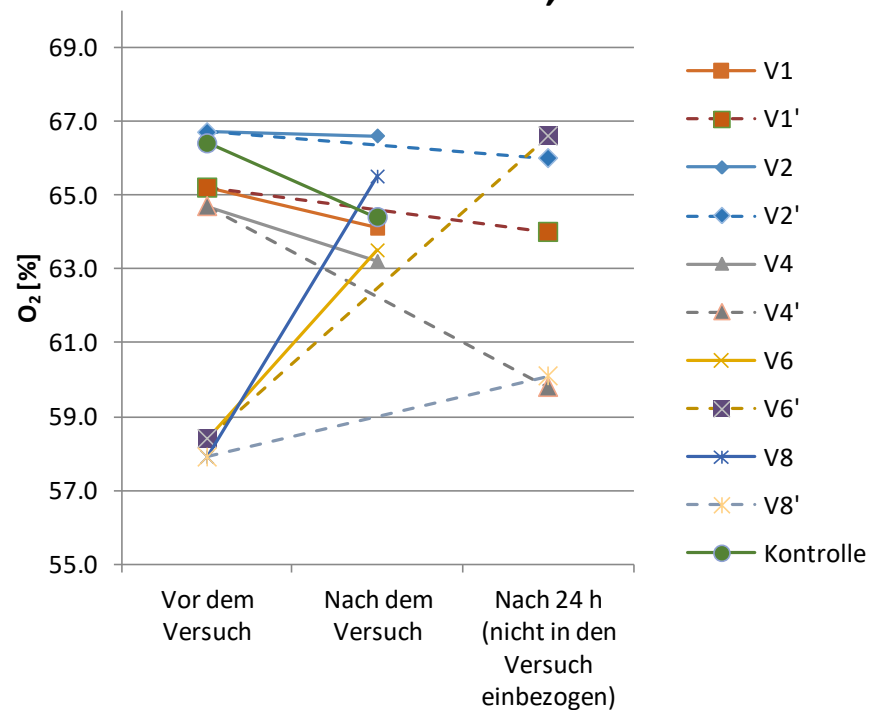


Anhang A Abbildung 3: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für Leitungswasser mittels Toxkit

Entwicklung des pH-Wertes, Oberflächenwasser, Norm

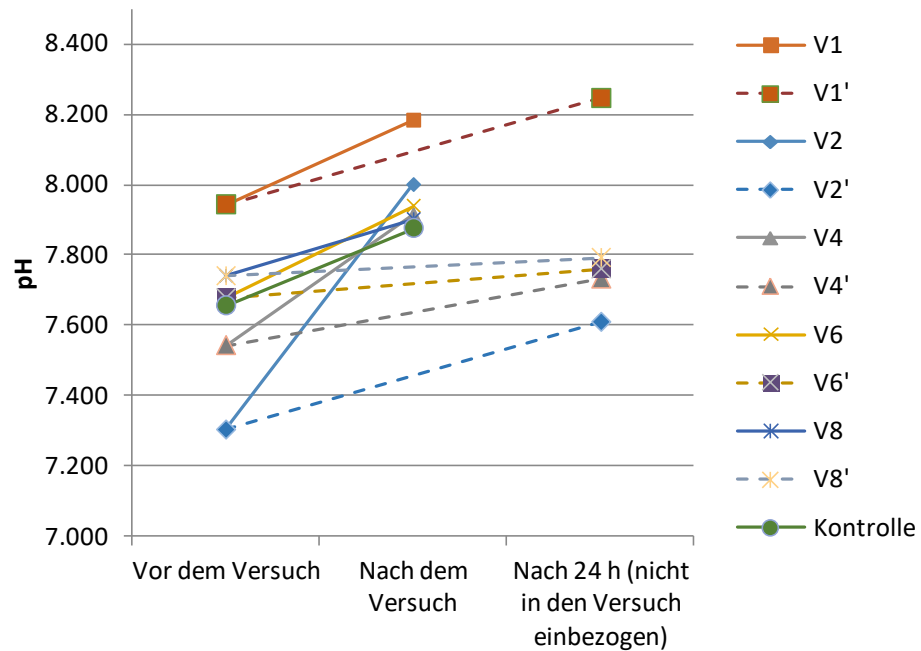


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Oberflächenwasser, Norm

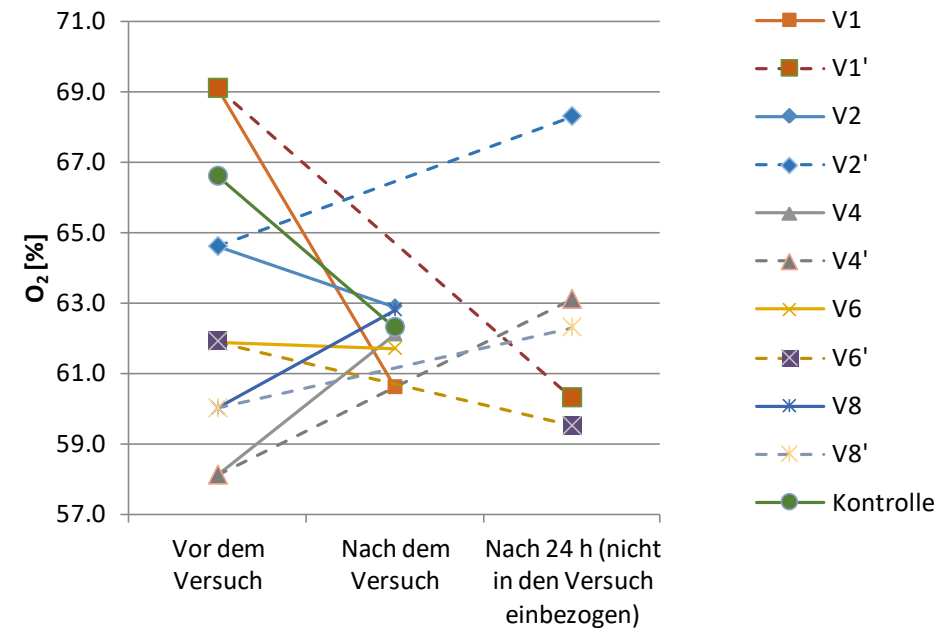


Anhang A Abbildung 4: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für Oberflächenwasser nach dem Normverfahren

Entwicklung des pH-Wertes, Oberflächenwasser, Toxkit

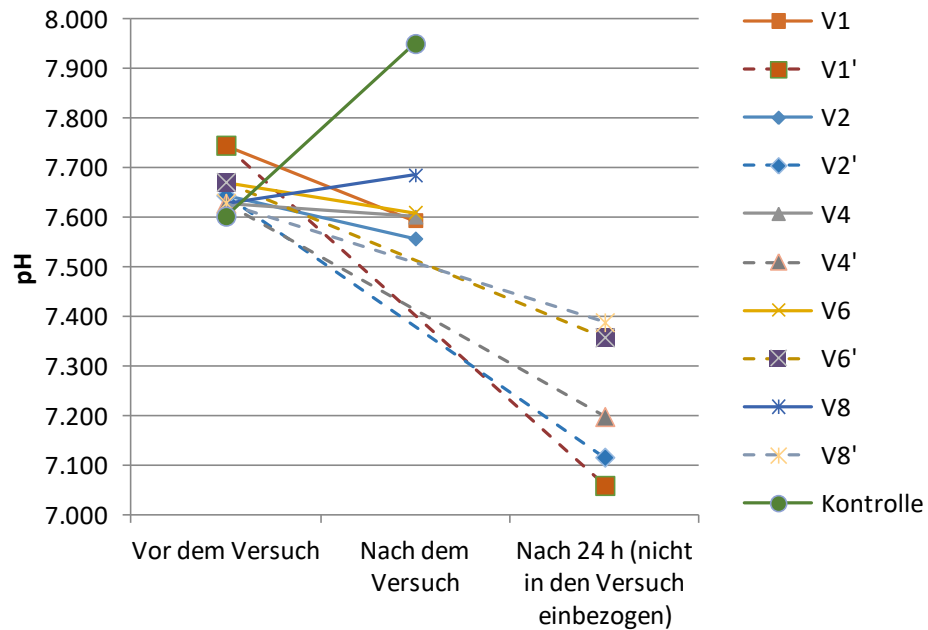


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Oberflächenwasser, Toxkit

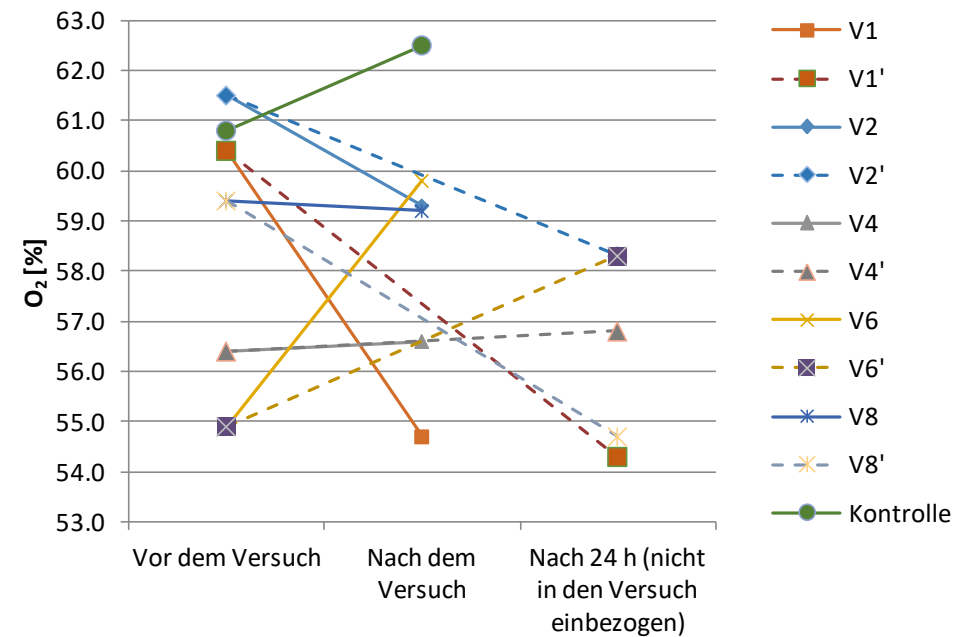


Anhang A Abbildung 5: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für Oberflächenwasser mittels Toxkit

Entwicklung des pH-Wertes, Eluat aus Elektronikabfall-Probe, Norm

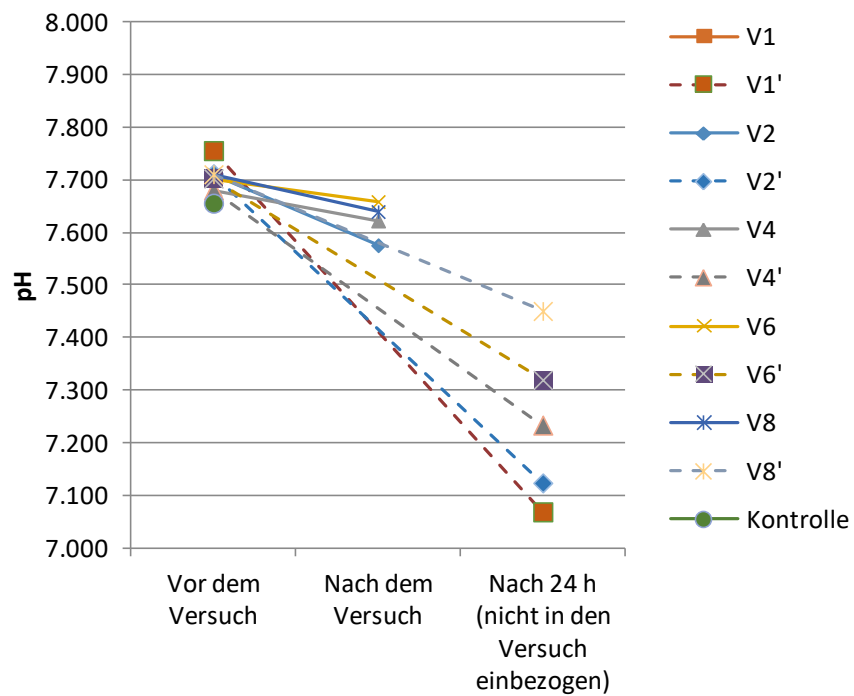


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Eluat aus Elektronikabfall-Probe, Norm

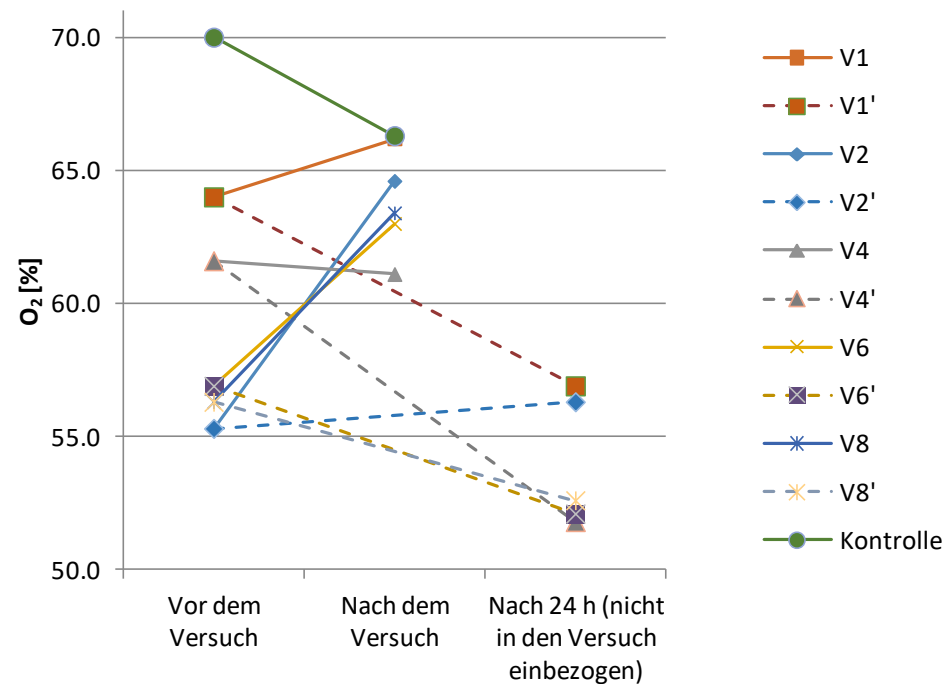


Anhang A Abbildung 6: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für Eluat aus einer Elektronikabfall-Probe nach dem Normverfahren

Entwicklung des pH-Wertes, Eluat aus Elektronikabfall-Probe, Toxkit

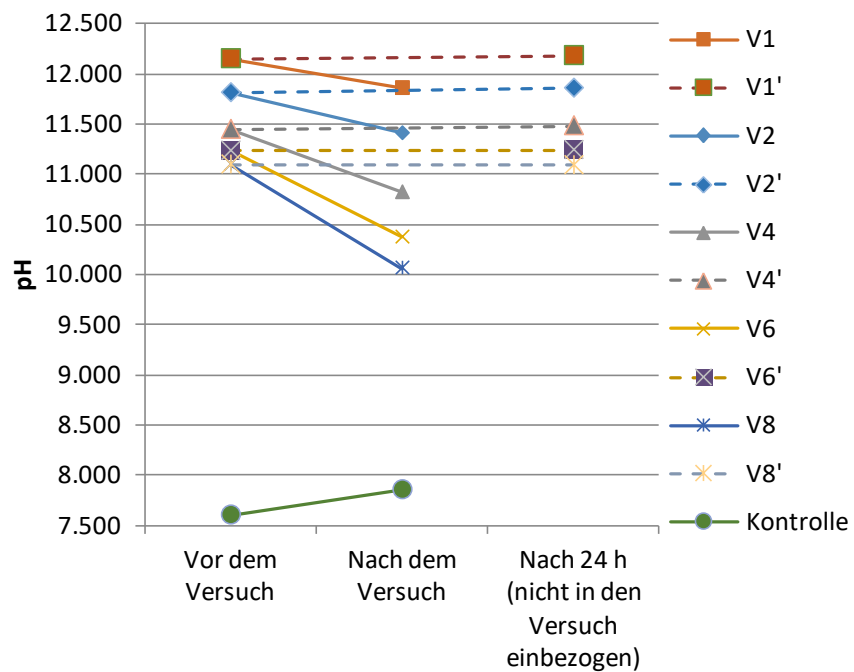


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Eluat aus Elektronikabfall-Probe, Toxkit

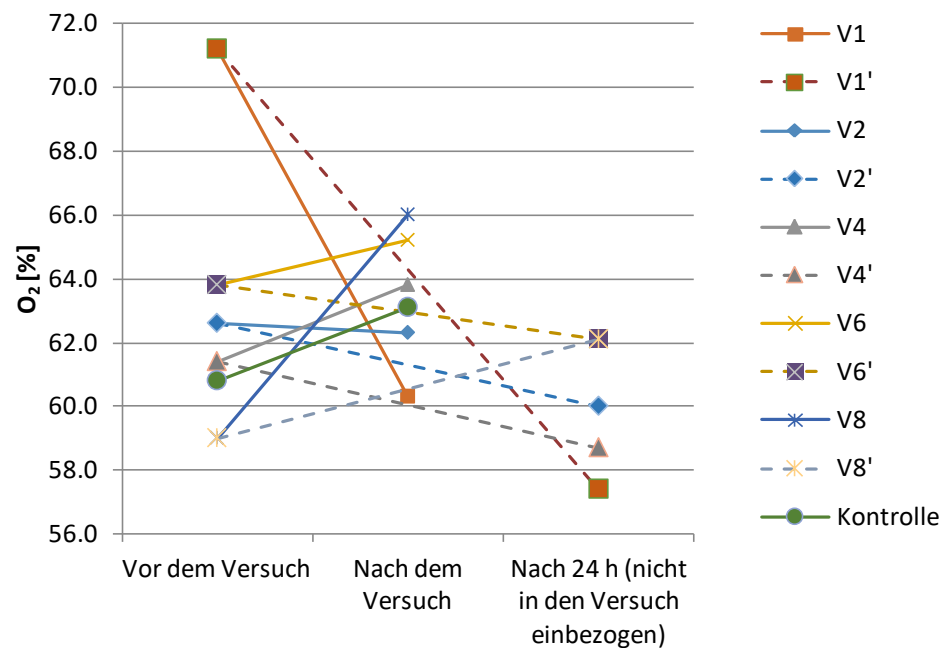


Anhang A Abbildung 7: Entwicklung des ph-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für Eluat aus einer Elektronikabfall-Probe mittels Toxkit

Entwicklung des pH-Wertes, Eluat von Batterieaktivmaterial, Norm

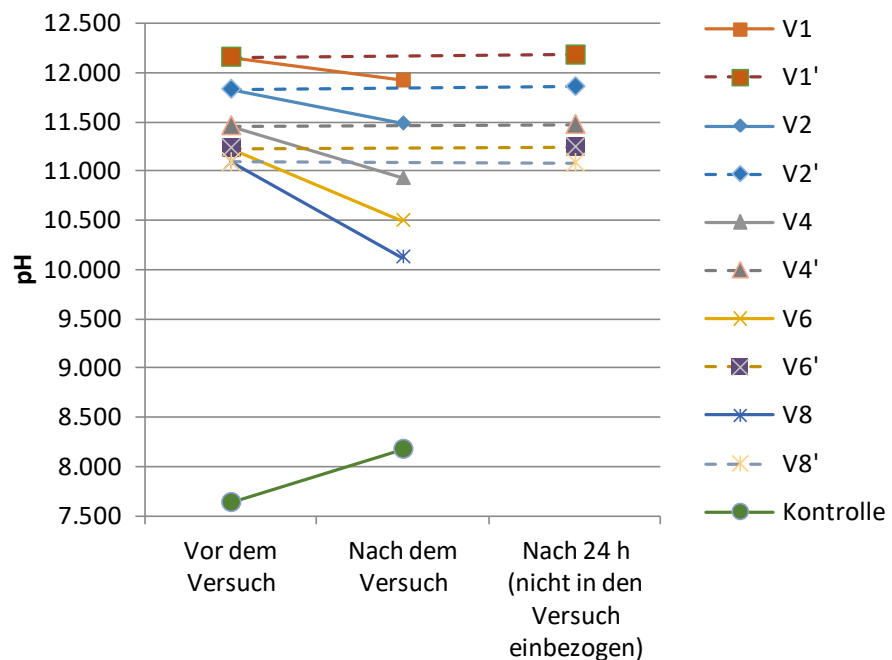


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Eluat von Batterieaktivmaterial, Norm

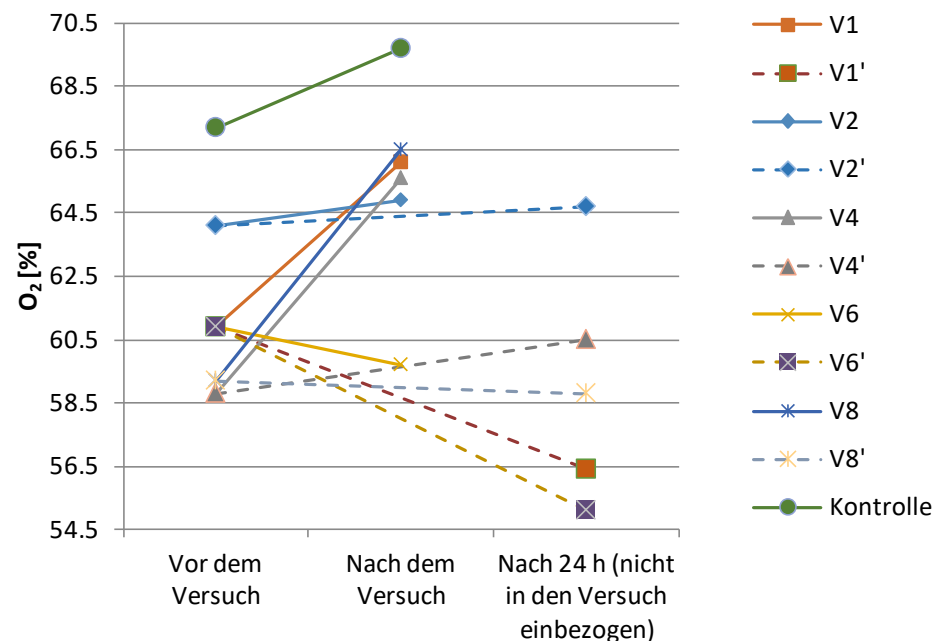


Anhang A Abbildung 8: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für Eluat von Batterieaktivmaterial nach dem Normverfahren

Entwicklung des pH-Wertes, Eluat von Batterieaktivmaterial, Toxkit

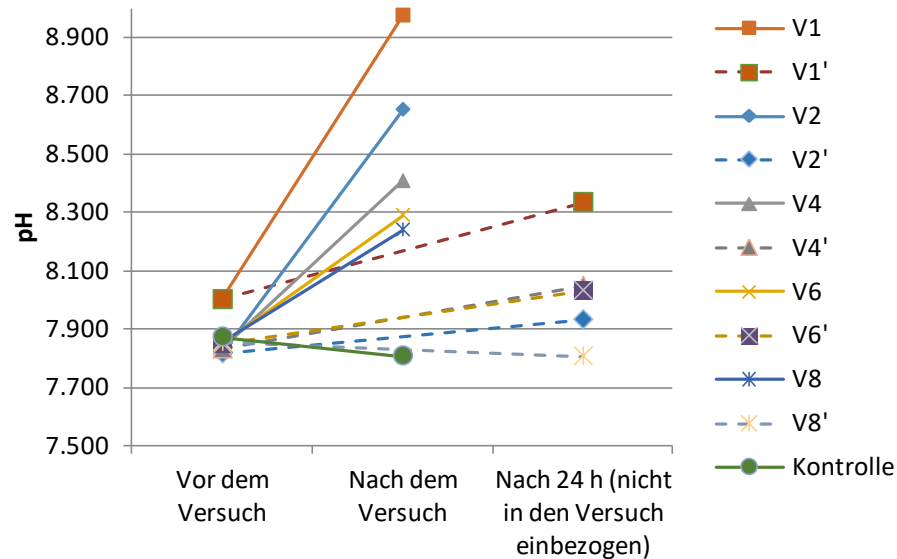


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Eluat von Batterieaktivmaterial, Toxkit

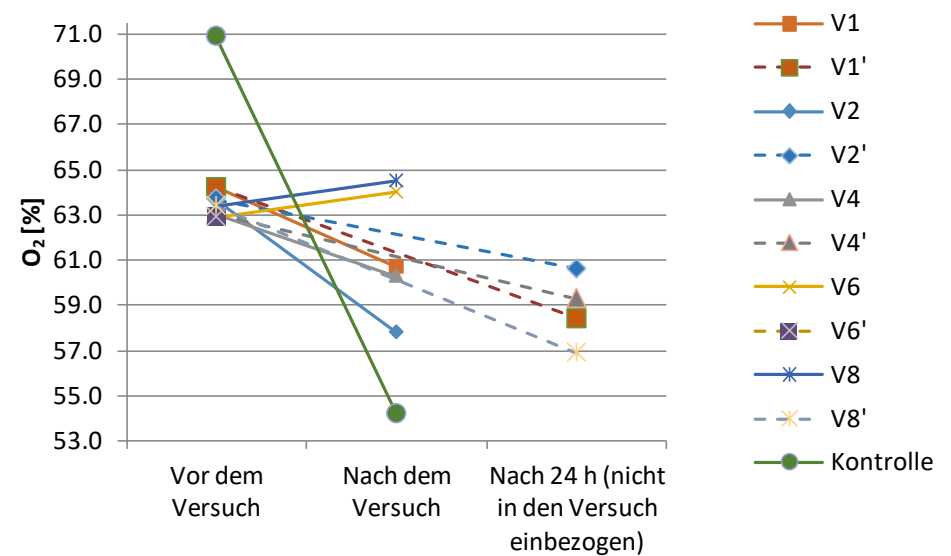


Anhang A Abbildung 9: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für Eluat von Batterieaktivmaterial mittels Toxkit

Entwicklung des pH-Wertes, Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Norm

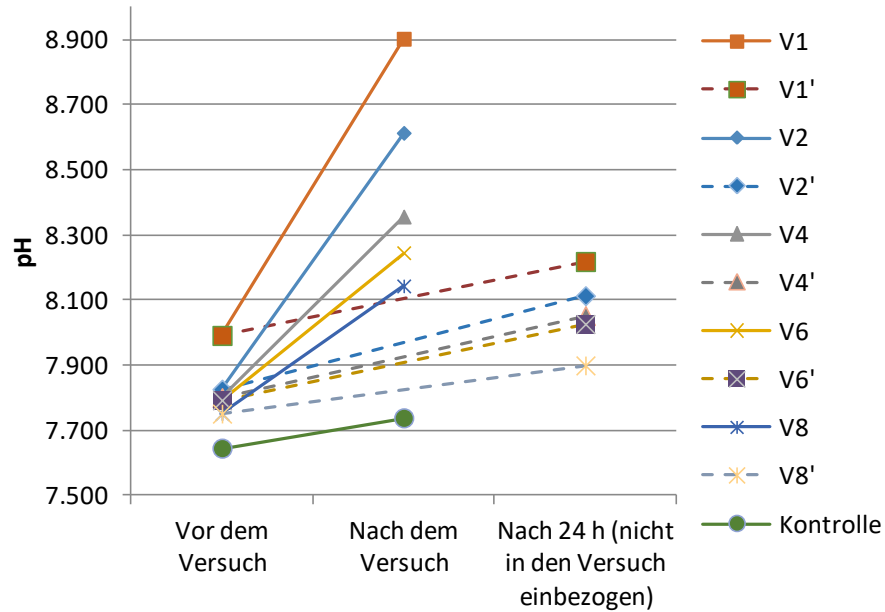


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Norm

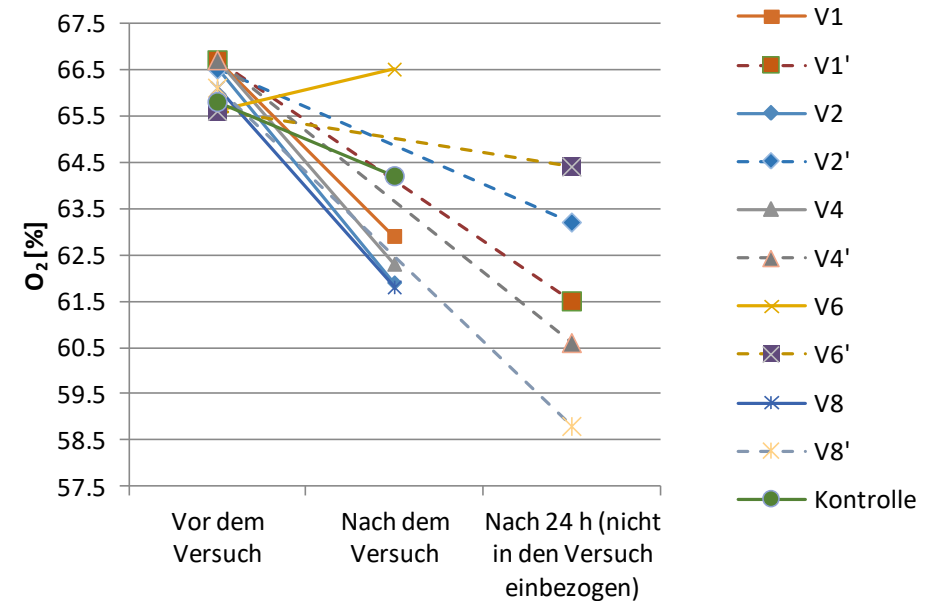


Anhang A Abbildung 10: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für Eluat von Batterieaktivmaterial nach vorangegangener Einstellung des pH-Wertes nach dem Normverfahren

Entwicklung des pH-Wertes, Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Toxkit

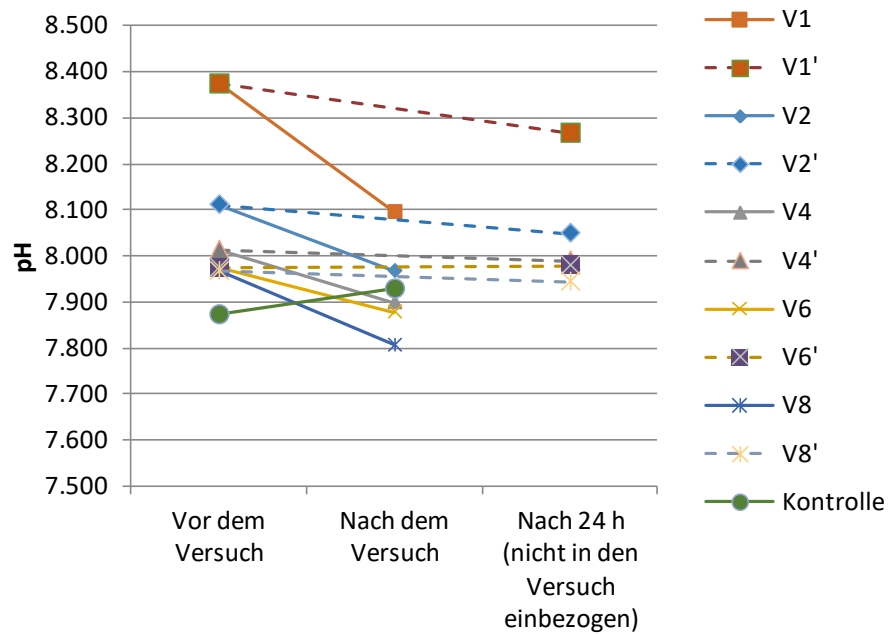


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes, Toxkit

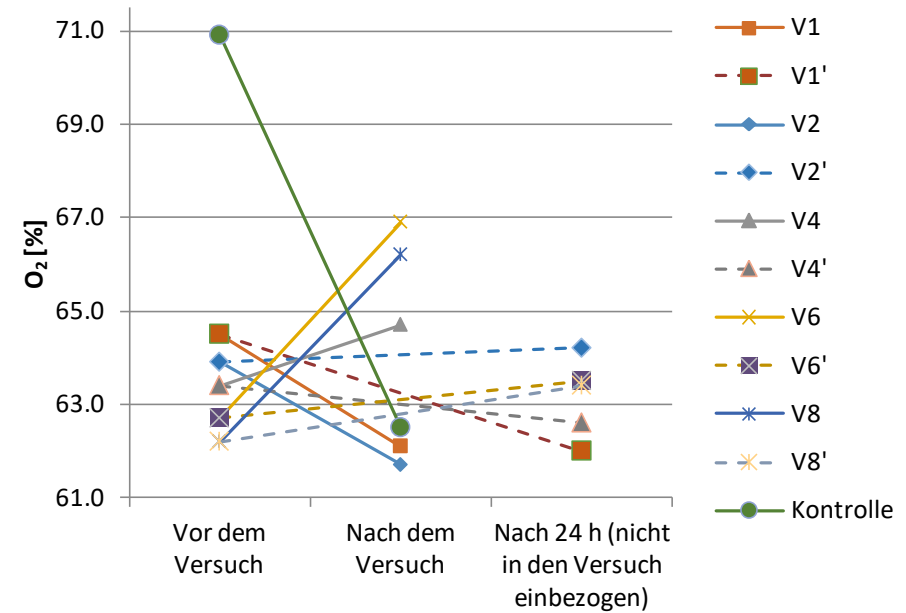


Anhang A Abbildung 11: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für Eluat von Batterieaktivmaterial nach Einstellung des pH-Wertes mittels Toxkit

Entwicklung des pH-Wertes, Eluat einer Bodenprobe, Norm

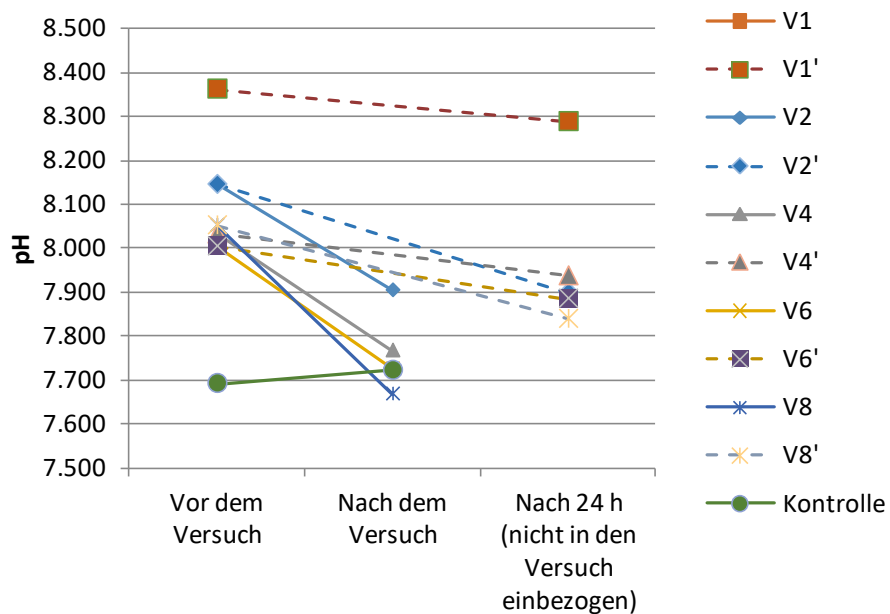


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Eluat einer Bodenprobe, Norm

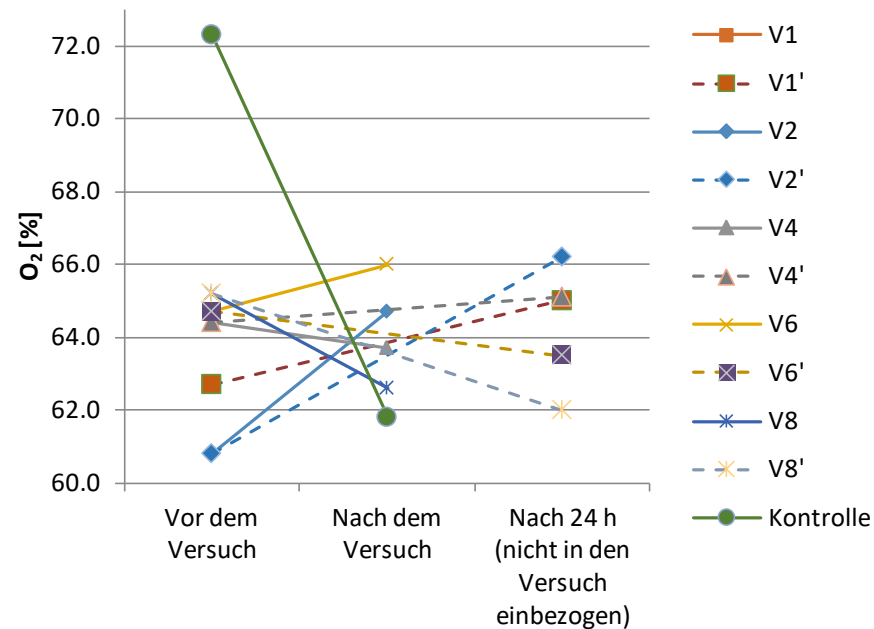


Anhang A Abbildung 12: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für das Eluat einer Bodenprobe nach dem Normverfahren

Entwicklung des pH-Wertes, Eluat einer Bodenprobe, Toxkit

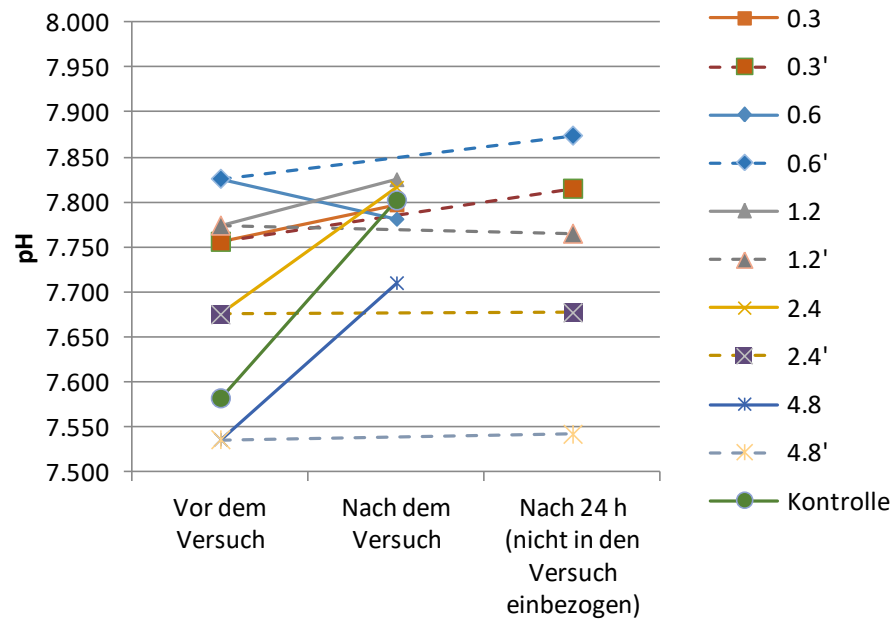


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Eluat einer Bodenprobe, Toxkit

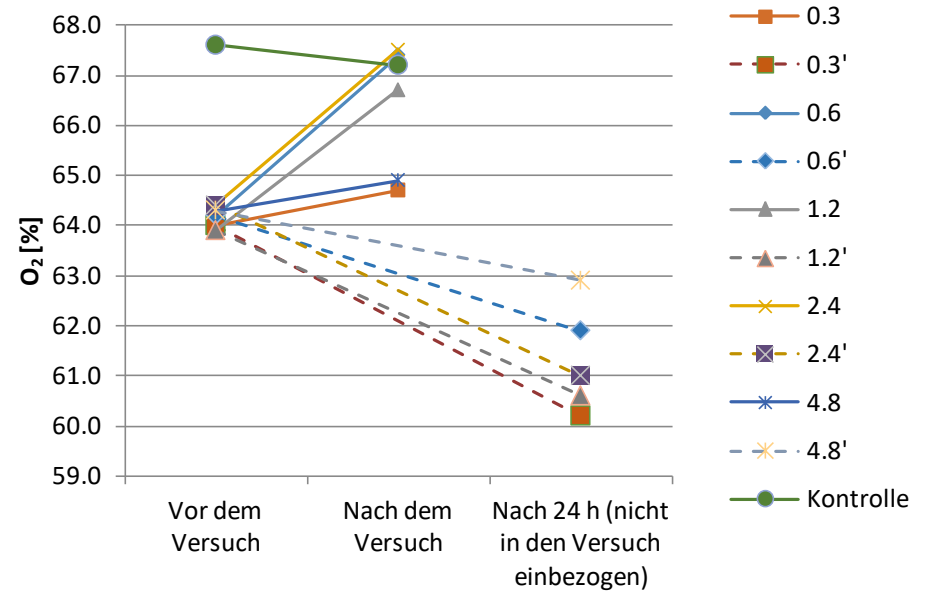


Anhang A Abbildung 13: Entwicklung des ph-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für das Eluat einer Bodenprobe mittels Toxkit

Entwicklung des pH-Wertes, Kaliumdichromat-Lösung, Norm

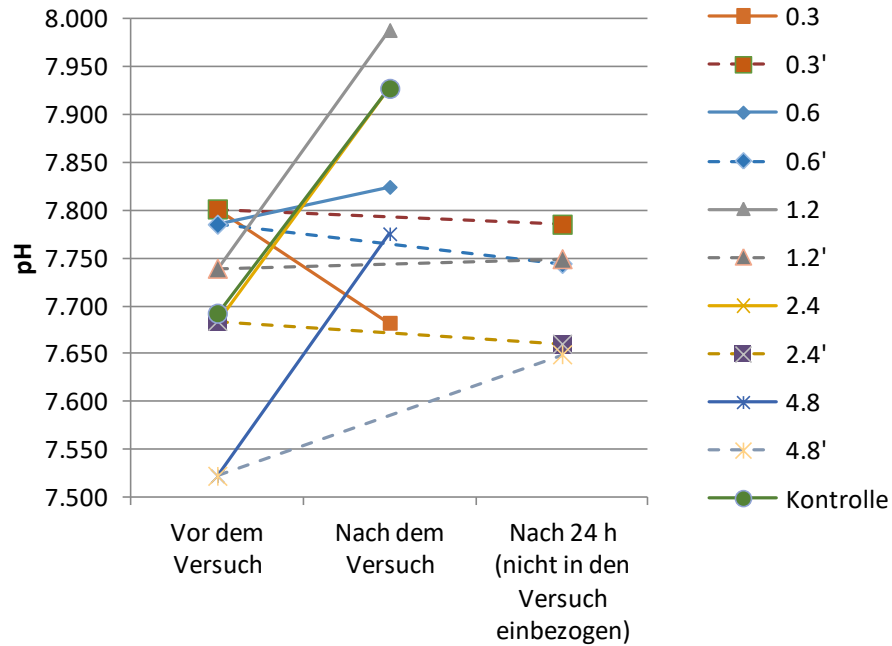


Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Kaliumdichromat-Lösung, Norm

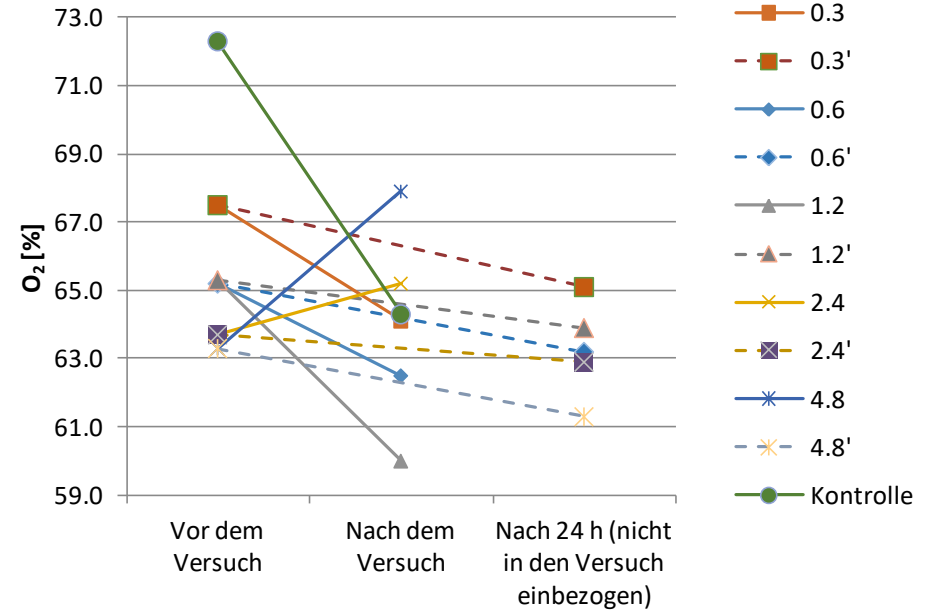


Anhang A Abbildung 14: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für eine Kaliumdichromat-Referenzlösung nach dem Normverfahren

Entwicklung des pH-Wertes, Kaliumdichromat-Lösung, Toxkit



Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, Kaliumdichromat-Lösung, Toxkit









Anhang A Abbildung 15: Entwicklung des pH-Wertes sowie des Sauerstoffgehaltes für eine Kaliumdichromat-Referenzlösung mittels Toxkit

Anhang B





In Anhang B sind die im Zusammenhang mit den untersuchten Schwermetallen und toxischen Substanzen im Verzeichnis der ECHA angeführten Gefahrenklassen angegeben.

Elektro- und Elektronikabfälle

Substanz	Symbol	Bedeutung	Anmerkungen
Ca		entzündbar	Bei Kontakt mit Wasser setzt die Substanz entzündbare Gase frei.
K		entzündbar	Die Substanz setzt bei Kontakt mit Wasser entzündbare Gase frei, welche zur Selbstentzündung neigen.
		ätzend	
Na		entzündbar	Die Substanz setzt bei Kontakt mit Wasser entzündbare Gase frei, welche zur Selbstentzündung neigen.
		ätzend	
Mg		entzündbar	Die Substanz setzt bei Kontakt mit Wasser entzündbare Gase frei, welche zur Selbstentzündung neigen. Der Feststoff ist entzündbar und fängt an Luft spontan Feuer.






Anhang B Tabelle 1: Übersicht über die Gefahrenhinweise der Substanzen im Elektronikabfall-Material (nach ECHA, 2017; ECHA, 2017c; ECHA, 2017e; ECHA, 2017b)

Batterieaktivmaterial

Substanz	Symbol	Bedeutung	Anmerkungen
Mn	-	-	Dieser Substanz wurden keine Gefahrenklassen zugewiesen.
Zn		entzündbar	Die Substanz ist in hohem Maße toxisch gegenüber aquatischen Organismen, sowohl mit akuter Wirkung als auch mit langfristigen Effekten. Bei Kontakt mit Wasser werden entzündbare Gase freigesetzt, welche zur Selbstentzündung neigen, an Luft kann spontane Brandbildung entstehen.
		umweltgefährlich	
K		entzündbar	Die Substanz setzt bei Kontakt mit Wasser entzündbare Gase frei, welche zur Selbstentzündung neigen.
		ätzend	

Anhang B Tabelle 2: Übersicht über die Gefahrenhinweise der Substanzen im Batterieaktivmaterial (nach ECHA, 2017a; ECHA, 2017f; ECHA, 2017c)

Referenzsubstanz

Substanz	Symbol	Bedeutung	Anmerkungen
K ₂ Cr ₂ O ₇		oxidierend	Die Substanz kann Atembeschwerden hervorrufen, ist toxisch bei Verschlucken, weiters verursacht sie schwere Verbrennungen der Haut und der Augen. Die Substanz steht im Verdacht, Gendefekte sowie Krebs auszulösen sowie die Fruchtbarkeit zu schädigen. Bei langfristiger oder wiederholter Aussetzung werden Organe geschädigt. Die Verbindung ist in hohem Maße toxisch gegenüber aquatischen Organismen, sowohl mit akuter Wirkung als auch mit langfristigen Effekten.
		ätzend	
		gesundheits- gefährlich	
		akut toxisch	
		umweltgefährlich	

Anhang B Tabelle 3: Übersicht über die Gefahrenhinweise der Referenzsubstanz (nach ECHA, 2017d)