

Januar 2016	AQS - Merkblatt <i>zu den Rahmenempfehlungen der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) für die Qualitätssicherung bei Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen</i>	P-9/10
----------------	--	---------------

Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)

1 Arbeitsgrundlagen

- DIN 38 402-A 11; Probenahme von Abwasser (Februar 2009)
- DIN EN ISO 5667-16 (L1); Allgemeine Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer Testverfahren (Februar 1999)
- DIN EN ISO 15088 (T 6); Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*) (Juni 2009)
- DIN EN ISO 7346-1; Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Teil 1: Statisches Verfahren
- LAWA-AQS-Merkblatt A 8; Prüfmittelüberwachung (April 2008)
- LAWA-AQS-Merkblätter für die Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Herausgegeben von der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA); Erich Schmidt Verlag GmbH & Co., Berlin 1991

Weitere Literatur siehe Abschnitt 14.

2 Zweck

Das vorliegende Merkblatt enthält Ergänzungen und Hinweise für die praktische Durchführung des Tests zur Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (*Danio rerio*, im Deutschen ist auch die Bezeichnung Zebrafisch gebräuchlich). Es legt außerdem verbindliche Maßnahmen zur analytischen Qualitätssicherung (AQS) und analytischen Qualitätskontrolle fest.

3 Probenahme

Für die Probenahme und -aufbewahrung sollten Gefäße aus Materialien wie Glas, PTFE, Polypropylen oder Polyethylen verwendet werden.

Das Gesamtprobenvolumen sollte ausreichend für die Bildung von Teilproben sein, um etwaige Wiederholungsuntersuchungen zu erlauben.

4 Probenkonservierung

Die Abwasserprobe sollte möglichst bald nach der Entnahme getestet werden.

P-9/10	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	Januar 2016
---------------	---	----------------

Eine Konservierung der Proben erfolgt durch:

- Kühlen der Proben für maximal 48 h im Dunkeln. Die Kühlung sollte möglichst bald nach der Probenahme einsetzen. Dies kann z.B. in Kühlboxen mit Eis oder in einem Fahrzeug-Kühlschrank vor Ort und während des Transports und anschließender Kühlung bei $(5 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlschrank im Labor erfolgen,
- Tiefgefrieren bei $\leq -18 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zu 2 Monate, wenn eine längere Probenaufbewahrung bis zum Testansatz nicht zu vermeiden ist. Dabei sollten für die Probenahme und -aufbewahrung bevorzugt Gefäße aus Polypropylen, Polyethylen oder Polytetrafluorethylen (PTFE) eingesetzt werden. Aufgrund der Volumenvergrößerung beim Einfrieren dürfen die Probengefäße dann nicht vollständig gefüllt werden (s. DIN EN ISO 5667-16). Ein Einfrieren sollte so schnell wie möglich nach der Probenahme erfolgen. Die Zeitspanne zum Einfrieren und Auftauen sollte so gering wie möglich sein, indem das Probenvolumen, d.h. die Größe des Gefäßes angepasst wird. Im Allgemeinen ist es angemessen, zum Einfrieren maximal 1 l-Gefäße zu verwenden.

Für den Fischeitest empfiehlt es sich, mindestens 3 Teilproben nach Homogenisierung der Originalprobe tiefzugefrieren, um bei unzureichender Eiablage, die sich in der Regel erst herausstellt, wenn das Auftauen und die Probenvorbehandlung schon abgeschlossen sind, an anderen Arbeitstagen den Test ansetzen zu können. Eine Probenvorbehandlung (z.B. Neutralisation, Belüftung) vor dem Einfrieren unterbleibt. Zusätzlich eingefrorene Teilproben sollten bis zur endgültigen Auswertung aufbewahrt werden. Für Biotestzwecke ist ein Wiedereinfrieren von bereits aufgetauten Proben nicht zulässig.

Proben aus Kühlwassersystemen mit Bioziden, die schnell abgebaut werden, sind schnellstmöglich zu untersuchen oder sofort nach der Probenahme einzufrieren.

Konservierungsmaßnahmen sind zu dokumentieren.

5 Geräte

Für alle im Test eingesetzten Prüf- und Messmittel ist das LAWA-AQS-Merkblatt A 8 zu beachten. Die Testauswertung erfordert den Einsatz des Inversmikroskops und/oder des Binokulars, mit Mindestvergrößerung 30-fach gemäß Abschnitt 7.1 der Norm. Für die Unterscheidung der Eier in befruchtet / unbefruchtet und das Umsetzen der Eier können auch Stereolupen mit geringerer Vergrößerung eingesetzt werden [1].

6 Reagenzien

6.1 Verdünnungswasser

Für den Test ist Standard-Verdünnungswasser nach ISO 7346-1 und ISO 7346-2 zu verwenden. Es wird empfohlen, das für den Test benötigte Standard-Verdünnungswasser aus vier 100-fach konzentrierten Stammlösungen unter Verwendung von Wasser nach Abschnitt 6.1 der Norm DIN EN ISO 15088 herzustellen:

Januar 2016	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	P-9/10
----------------	---	---------------

Stammlösung		Konzentration [g/l]	
Lösung I	CaCl ₂ ·2H ₂ O	29,4	in Wasser lösen, im Kühlschrank aufbewahren
Lösung II	MgSO ₄ ·7H ₂ O	12,33	in Wasser lösen, im Kühlschrank aufbewahren
Lösung III	NaHCO ₃	6,30	in Wasser lösen, im Kühlschrank aufbewahren
Lösung IV	KCl	0,55	in Wasser lösen, im Kühlschrank aufbewahren

Tabelle 1: Beispiel für die Herstellung der Stammlösungen

Eine Belüftung oder Einstellung des pH-Werts der Stammlösungen ist nicht erforderlich. Die Lösungen sind im Kühlschrank bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ mindestens 6 Monate haltbar. Aus den Stammlösungen wird das Verdünnungswasser frisch hergestellt:

10 ml der Lösungen I – IV zu etwa 500 ml Wasser nach Abschnitt 6.1 der Norm DIN EN ISO 15088 geben und mit Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Wenn das Verdünnungswasser aus den vier Stammlösungen hergestellt wird, ist eine Überprüfung der Härte nicht mehr erforderlich.

Das Verdünnungswasser bis zur Sättigung belüften.

Den pH-Wert messen. In der Regel stellt sich ein pH-Wert von $\text{pH} = 7,8 \pm 0,2$ ein. Falls erforderlich, durch Zugabe von Natriumhydroxid- Lösung oder Salzsäure auf $\text{pH} = 7,8 \pm 0,2$ einstellen. Das Verdünnungswasser darf vor dem Test nicht weiter belüftet werden, um pH-Wert-Verschiebungen zu vermeiden.

Das so hergestellte Verdünnungswasser kann maximal 72 Stunden im Kühlschrank bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden.

Das Verdünnungswasser wird für den Ansatz der Negativkontrolle, die Ansätze für die Plattenkontrolle sowie für die Herstellung der Verdünnungsstufen und der Positivkontrolle verwendet.

Das Verdünnungswasser vor Testansatz auf $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$ temperieren.

6.2 Referenzsubstanz-Lösung für die Positivkontrolle

Die 3,4-Dichloranilin-(DCA)-Stammlösung (Konzentration 100 mg/l) wird in Wasser (6.1 der Norm) angesetzt und neutralisiert. Sie kann lichtgeschützt im Kühlschrank bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ bis zu 6 Monate aufbewahrt werden.

Aus der DCA-Stammlösung wird eine Testlösung mit der Konzentration von 3,7 mg/l (Positivkontrolle) hergestellt: 3,7 ml Stammlösung mit belüftetem Verdünnungswasser (s. vorhergehender Abschnitt, Tabelle 1) auf 100 ml auffüllen. Der pH-Wert der Lösung stellt sich auf den pH-Wert des Verdünnungswassers ein. Eine Neutralisation unterbleibt. Das für den Test benötigte Volumen auf $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$ temperieren.

P-9/10	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	Januar 2016
---------------	---	----------------

7 Probenvorbehandlung

Das Auftauen tiefgefrorener Proben kann am Testtag bis zum vollständigen Auftauen z.B. in einem maximal 30 °C warmen Schüttel-Wasserbad (lokale Überhitzungen vermeiden) oder über Nacht im Kühlschrank bei (5 ± 3) °C erfolgen. Vollständiges Auftauen ist notwendig, da beim Einfrieren Konzentrierungseffekte im Innern der Probe, das zuletzt durchfriert, auftreten können. Eine Mikrowellenbehandlung ist nicht zulässig. Die weitere Probenvorbehandlung erfolgt direkt vor dem Testansatz.

Die Abwasserverordnung [2] sieht in der Anlage zu § 4 „Analysen- und Messverfahren“ für Biotests die Analyse in der Originalprobe vor.

Die Probe nur durch Schütteln per Hand oder per Magnetrührer homogenisieren.

Den pH-Wert der Originalprobe (= unverdünnte homogenisierte Probe) ermitteln und dokumentieren. Falls eine Anpassung des pH-Wertes erforderlich ist, ein für den Test benötigtes Aliquot der homogenisierten Probe entnehmen und den pH-Wert mit HCl oder NaOH auf $7,0 \pm 0,2$ einstellen. Die Konzentration der Säure bzw. Lauge ist so zu wählen, dass das zugegebene Volumen 5 % des Gesamtvolumens nicht überschreitet. Bei der pH-Wert-Einstellung ist eine Übertitration zu vermeiden. Bei einer Übertitration den pH-Wert durch Zugabe der homogenisierten Originalprobe einstellen. Ausfällungen während der pH-Wert-Anpassung sind zu dokumentieren; in diesen Fällen den Überstand für den Test verwenden.

Den O₂-Gehalt der Originalprobe messen und dokumentieren.

Die Sauerstoffkonzentration in den Testansätzen darf zum Testbeginn 4 mg/l O₂ nicht unterschreiten. Nur bei einem O₂-Gehalt der unverdünnten Probe unter 4 mg/l ist eine Belüftung nach Probenvorbehandlung erforderlich. Dabei besteht die Gefahr, dass leichtflüchtige Stoffe aus der Probe gestrippt werden oder pH-Wert-Verschiebungen auftreten. Für die Belüftung darf nur saubere, ölfreie Luft verwendet werden oder der Sauerstoffeintrag erfolgt durch Rühren bis zum Erreichen eines O₂-Gehaltes > 4 mg/l.

Da das zur Herstellung von Verdünnungsstufen für $G \geq 2$ verwendete Verdünnungswasser bis zur Sättigung belüftet wird, ist in der Regel keine Belüftung der Verdünnungsansätze zur Erreichung eines O₂-Gehaltes von > 4 mg/l erforderlich.

Die Norm DIN EN ISO 15088 sieht keine Abtrennung von Feststoffen aus der Probe vor dem Testansatz vor. Wenn die Probe so viele Trübstoffe enthält, dass eine Eidifferenzierung nicht mehr sicher möglich ist, ist das in der Norm in Abschnitt 4 beschriebene geänderte Ablaufschema zu Expositionsbeginn anzuwenden.

Eine Aufbewahrung der vorbehandelten Probe im Kühlschrank für Testzwecke an Folgetagen ist nicht zulässig.

Die vorbehandelte Probe auf (26 ± 1) °C temperieren.

8 Herstellung der Verdünnungsstufen

Die in Tabelle 1 der Norm aufgeführten Verdünnungsstufen bilden zwei geometrische Verdünnungsreihen ab, in denen von einer Verdünnung zur nächsten jeweils die Abwasserkonzentration halbiert wird:

Die erste der geometrischen Verdünnungsreihen enthält neben der unverdünnten vorbehandelten Probe ($G = 1$) die Verdünnungsstufen $G = 2$, $G = 4$, $G = 8$, $G = 16$, $G = 32$, $G = 64$, $G = 128$ usw. Die zweite geometrische Verdünnungsreihe enthält ausgehend von einer ersten Verdünnung der Probe im Verhältnis 1 Teil unverdünnte vorbehandelte Probe + 2 Teile Verdünnungswasser ($G = 3$) die Verdünnungsstufen $G = 6$, $G = 12$, $G = 24$, $G = 48$, $G = 96$, $G = 192$ usw. Diese Verdünnungsreihen werden

Januar 2016	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	P-9/10
----------------	---	---------------

ineinander verschachtelt, um daraus eine Verdünnungsreihe mit $G = 1, G = 2, G = 3, G = 4, G = 6, G = 8$ usw. für die G_{Ei} -Wertbestimmung zu bilden.

Verdünnung	Verdünnungsstufe G	Probe	Verdünnungs- wasser
		ml	ml
Negativ-Kontrolle		---	100
Testgefäß			
1 in 1	1	100	---
1 in 2	2	50	50
1 in 3	3	33,33	66,67
1 in 4	4	25,0	75,0
1 in 6	6	16,67	83,33
1 in 8	8	12,5	87,5
1 in 12	12	8,33	91,67
1 in 16	16	6,25	93,75
1 in 24	24	4,17	95,83
1 in 32	32	3,13	96,87

Tabelle 2: Ansatz der Verdünnungsstufen (G) – Beispiel für den Ansatz von jeweils 100 ml

Für den Testansatz werden aus Tabelle 2 die aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen ausgewählt, die zur Bestimmung des G_{Ei} -Wertes erforderlich sind. Bei toxischeren Proben ist die Verdünnungsreihe entsprechend soweit fortzusetzen, bis eine Bestimmung des G_{Ei} -Wertes möglich ist.

Als Verdünnungswasser wird das in Abschnitt 6.5 der Norm beschriebene Wasser verwendet (s. auch Abschnitt 6.1 dieses LAWA-AQS-Merkblatts).

9 Testorganismen

Bei der Haltung der Fische sind die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes [3] zu beachten (u.a. § 11: Anzeigepflicht der Haltung bei der zuständigen Behörde). Empfehlungen zum Umgang mit Fischen gibt auch die Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V [4].

Bezugsquelle und -datum der Zebrafarlinge sind zu dokumentieren.

Fische sollten von den im Validierungsdokument [5] benannten Lieferanten (Bezugsquellen: Umweltbundesamt, FG III 2.5, Versuchsfeld Marienfelde, Schichauweg 58, 12307 Berlin oder Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei, Abt. Fischzucht u. Fischpathologie, Müggelseedamm 301,12587 Berlin) bezogen werden oder aus eigener Nachzucht stammen, wenn im eigenen Labor z.B. für die Chemikaliertestung eine Zebrafarlingzucht bereits etabliert ist.

Die Adaption an laborspezifische Haltungsbedingungen dauert üblicherweise 1-2 Wochen. Fische sind frühestens 14 Tage nach Lieferung für die Eigewinnung einzusetzen.

Es ist zu dokumentieren, dass die Zuchttiere die letzten 6 Monate vor der Eiablage zu Versuchszwecken nicht mehr mit Medikamenten (akut und/oder prophylaktisch) behandelt wurden. Die Halte-
rungsdichte von 1 l Wasser je adultem Fisch ist als Mindestanforderung anzusehen.

P-9/10	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	Januar 2016
---------------	---	----------------

Die Sauerstoffsättigung im Hälterungsbecken sollte mindestens 80 % betragen. Erfahrungsgemäß wird dies durch kontinuierliche Belüftung des Beckens erreicht. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass keine allzu starke Strömung in den Becken entsteht.

Die biologische Reinigung des Aquarienwassers erfolgt üblicherweise mittels Aquarienfiltern. Bei der Reinigung der Aquarienfilter ist darauf zu achten, dass die für den biologischen Abbau benötigte Bakterienbesiedlung möglichst wenig beeinträchtigt wird. Zusätzlich sind regelmäßig (in der Regel wöchentlich) Teilwasserwechsel des Hälterungswassers mit temperiertem Wasser durchzuführen. Wasser- und Filterwechsel sollten nicht gleichzeitig erfolgen. Im Hälterungswasser sollten die Konzentrationen der Stickstoffverbindungen in einem für die Hälterung von Zebraäbrlingen geeigneten Bereich liegen [4], (s. Tabelle 3), kurzfristige Überschreitungen sind z.B. in der Einfahrphase von Filtern zulässig. Zur Kontrolle der Stickstoff-Parameter des Hälterungswassers können auch bei Aquarianern übliche Schnelltests eingesetzt werden. Die Häufigkeit der Bestimmung der Stickstoff-Parameter richtet sich nach der Stabilität der Hälterungsbedingungen. Deutet ein Anstieg der Ammonium- und Nitritkonzentration auf eine verschlechterte Hälterungswasserqualität hin oder treten gehäuft kranke oder tote Fische auf, muss die Häufigkeit des Teilwasserwechsels erhöht und/oder der Zustand der Filter geprüft werden. Bei nicht eingefahrenen Filtern sollte der Nitritgehalt vorübergehend alle 1-2 Tage bestimmt werden.

Der pH-Wert sollte 1 x wöchentlich bestimmt werden; er sollte zwischen 6,5 und 8,5 liegen. Zur kontinuierlichen Temperaturkontrolle können z.B. Minimum-Maximum-Thermometer eingesetzt werden (Dokumentation im Hälterungsprotokoll).

Parameter	Bereich
Sauerstoffsättigung	≥ 80 %
Nitrit	≤ 0,1 mg/l
Nitrat	≤ 100 mg/l
Ammonium (im neutralen pH-Bereich)	≤ 0,2 mg/l

Tabelle 3: Richtwerte für Parameter im Hälterungswasser für Fische [4]

Die Hälterung ist arbeitstäglich visuell auf Auffälligkeiten, Anzahl kranker oder toter Fische zu kontrollieren. Erkrankte Fische (z.B. mit abgespreizten Schuppen, Skelett-Deformationen, Hautparasiten) oder tote Fische sind aus dem Becken entfernen.

Über die Hälterung der Zebraäbrlinge ist Protokoll zu führen (Muster für Hälterungsprotokolle s. S. 12-13). Die Hälterungsprotokolle sollten Angaben zur Häufigkeit des Wasser- und Filterwechsels sowie der Ergebnisse der in Tab. 3 aufgeführten Parameter und der Temperaturkontrolle enthalten.

Zebraäbrlinge können mit Eiern aus der Hälterung nachgezogen werden. Hierzu werden Eier in kleinere Becken (ohne Elterntiere) überführt und nach Schlupf mit geeignetem Futter gefüttert (Beispiele s. Anlage).

Januar 2016	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	P-9/10
----------------	---	---------------

10 Eigewinnung

Der Fischeitest darf nur mit Eiern durchgeführt werden, die von Fischen aus eigener Hälterung stammen.

Für das Umsetzen der Eier können Siebe/Stielsiebe oder Pipetten mit abgeschnittenen Kunststoffspitzen verwendet werden. Ggf. scharfe Ränder von Kunststoff- oder Pasteurpipettenspitzen z.B. durch Abflämmen glätten, um eine Schädigung von Fischeiern zu verhindern.

Bei der Verwendung von Sieben sollten die Eier vorsichtig mit temperiertem Verdünnungswasser abgespült werden.

Zur Entfernung eventuell anhaftende Kot- oder Futterresten werden die Eier in ein transparentes Gefäß (z.B. eine Kristallisierschale) mit temperiertem Verdünnungswasser überführt, ehe sie in die Vorexposition gesetzt werden.

Die Differenzierung der Eier ist innerhalb der ersten Stunde nach der Eiablage vorzunehmen.

11 Testdurchführung

Für die Untersuchung nach DIN EN ISO 15088 ist eine Vorbehandlung der Mikrotiterplatten mit Probengut oder Chemikalien nicht zulässig.

Ein mögliches Plattenbelegungsschema ist in Anhang A der Norm DIN EN ISO 15088 dargestellt. Mikrotiterplatten mit Negativkontrolle, Positivkontrolle, Probennummer, Verdünnungsstufe und Datum beschriften.

Es werden je 2 ml der zu untersuchenden Wässer (Negativkontrolle, Positivkontrolle, Abwasser in den zu testenden Verdünnungsstufen) in die vorgesehenen Wells der Zellkulturplatten pipettiert.

11.1 Vorexposition

Beschriftete Glasgefäße (vorzugsweise 100-ml-Glas-Petrischalen) mit Verdünnungswasser für die Kontrollen sowie für die anzusetzenden Verdünnungsstufen und die DCA-Testlösung befüllen. Um die in der Norm geforderte Exposition möglichst früher Entwicklungsstadien sicherzustellen, sollten Eier (ab 4-Zellstadium) schnellstmöglich in die vorbereiteten Petrischalen mit Kontroll- und Verdünnungsansätzen zur Vorexposition eingebracht werden.

Bei der Überführung der Eier sollte möglichst wenig Wasser mitgeführt werden. Für die Überführung der Eier können Pipetten oder Edelstahlsiebe mit Stiel (z.B. aus dem Daphnientest) verwendet werden. Die Fischeier werden z.B. mit Hilfe einer Pipette aus der Kristallisierschale mit Verdünnungswasser entnommen und auf ein Sieb gegeben. Das überschüssige Wasser tropft ab und führt somit nicht zur Verdünnung des Testguts in der Vorexposition.

Während der Vorexposition ist auf eine Aufrechterhaltung der Temperatur von $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$ zu achten (z.B. Verwendung von Wärmeunterlagen).

11.2 Exposition

Für die Überführung aus der Vorexposition in die Wells der Zellkulturplatte, d.h. der eigentlichen Exposition dürfen nur befruchtete Eier ab dem 4-Zellstadium (etwa 30 min nach Befruchtung) bis maximal zum 128-Zellstadium verwendet werden. Eine dunkle Unterlage unter dem Glasgefäß mit den Eiern erleichtert die Differenzierung.

P-9/10	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (<i>Danio rerio</i>) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	Januar 2016
---------------	--	----------------

Die Befruchtungsratesollte über 50 % liegen. Sie wird bei der Eidifferenzierung geschätzt und im Protokollblatt dokumentiert.

Die befruchteten Eier aus den Petrischalen der jeweiligen Vorexposition werden in die entsprechenden Platten überführt. Die Mikrotiterplatten sind mit selbstklebenden Folien zu verschließen und bei $(26 \pm 1) ^\circ\text{C}$ für 48 h zu inkubieren. Es ist darauf zu achten, dass die Folien nicht mit den Flüssigkeiten in Kontakt kommen.

Gemäß Norm wird als Testbeginn der Zeitpunkt der Überführung der Zellkulturplatten in die Inkubationseinheit nach dem Verschließen der Platten mit Folie gewertet. Durch die Vorexposition ergibt sich, dass die Fischeier insgesamt zwischen 48 h und maximal 50 h dem Testgut ausgesetzt sind.

Nur wenn eine Eidifferenzierung (unter Verwendung der für den Test einzusetzenden optischen Hilfsmittel) aufgrund der Färbung oder Trübung in den zu untersuchenden Verdünnungsstufen der Probe nicht möglich ist, ist das geänderte Ablaufschema bei Expositionsbeginn d.h. ohne Vorexposition in der zu testenden Abwasserverdünnung gemäß DIN EN ISO 15088 einzuhalten:

- Eiablage;
- Differenzierung in befruchtete und unbefruchtete Eier (8.2.2);
(Anmerkung: die Norm geht noch von einer Differenzierung der Eier in der Laichschale mit Hälterungswasser aus; vorzugsweise sollten die Eier nach der Entnahme der Laichschale aus dem Hälterungsbecken direkt mit temperiertem Verdünnungswasser abgespült und die Differenzierung im Verdünnungswasser vorgenommen werden);
- Überführung der befruchteten Eier in Verdünnungswasser (7.10, Kristallisierschalen); (gemäß o.g. Anmerkung dann entbehrlich);
- Überführung in Mikrotiterplatten ohne Vorexposition.
Bei der Überführung der Eier in Mikrotiterplatten mit Testgut sollte der Verdünnungsfehler durch anhaftendes Verdünnungswasser so klein wie möglich gehalten werden.

11.3 Auswertung

Nach Ablauf der Inkubationszeit sind die Eier/Embryonen in der Reihenfolge des Testansatzes sofort zu untersuchen.

Dabei wird jedes Ei/jeder Embryo nach folgenden Kriterien beurteilt und der Befund mit den entsprechenden Kürzeln protokolliert (Musterprotokoll s. S. 10-12):

- Embryo normal entwickelt (N)
- Ei koaguliert (K)
(Koagulierte Eier sind milchig trüb und erscheinen im mikroskopischen Bild dunkel.)
- fehlende Ablösung des Schwanzes vom Dotter (S)
(Überprüfung gemäß Bild 2 der Norm; wenn die Schwanzablösung nicht bis zu dem angegebenen Stadium vorangeschritten ist, wird die Entwicklung als „keine Ablösung“ bewertet.)
- fehlender Herzschlag (H)
(Ist innerhalb einer Beobachtungszeit von 30 Sekunden kein Herzschlag erkennbar, gilt der Embryo als tot.)

Ein Ei/Embryo gilt nach 48 h als tot, wenn eines der Kriterien, K, S oder H erfüllt ist.

Für die Negativkontrolle, die Positivkontrolle, die Mikrotiterplatten-Kontrolle sowie für jede Verdünnungsstufe die Summe der mit K, S oder H beurteilten Eier/Embryonen ermitteln.

Januar 2016	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	P-9/10
----------------	---	---------------

Als G_{Ei} -Wert wird die höchste getestete Verdünnungsstufe angegeben, in der unter Einhaltung der Gültigkeitskriterien höchstens eins von zehn Eiern gemäß der Kriterien, K, S oder H als tot gewertet wird.

Hinweis

Bei Proben unbekannter Toxizität kann eine Zwischenauswertung nach 24 h bereits erkennen lassen, ob eine Testwiederholung mit weiteren Verdünnungsstufen zur Ermittlung des G_{Ei} -Werts erforderlich ist.

12 Gültigkeitskriterien

Der Test ist gültig, d. h ein G_{Ei} -Wert kann nur bestimmt werden wenn

- in der **Negativkontrolle** (Verdünnungswasser) höchstens 10 % der Eier/Embryos tot sind.
Die Erfahrung hat gezeigt, dass bei Testdurchführung durch erfahrene Personen nur sehr selten tote Eier/Embryos in der Negativkontrolle auftreten. Bei regelmäßigem oder gehäuftem Auftreten von toten Eiern/Embryos sollten die Ansatzbedingungen, vor allem die Handhabung der Eier, z.B. Verletzungen der Eihülle beim Umsetzen der Eier überprüft werden.
- in der **Positivkontrolle** (Referenzsubstanzansatz) mit 3,4-Dichloranilin mindestens 20 % der Eier/Embryos tot sind.

Üblicherweise werden im Referenzsubstanzansatz zwischen 20% und 90% der Eier geschädigt. Wenn regelmäßig 100% Effekt erzielt wird, sollte die DCA-Lösung, das Testsystem und die Randbedingungen im Labor überprüft werden. Zudem kann eine Überprüfung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung für DCA, z.B. anhand folgender DCA-Konzentrationen vorgenommen werden: 5,0 mg/l, 4,5 mg/l, 4,0 mg/l, 3,5 mg/l, 3,0 mg/l, 2,5 mg/l, 2,0 mg/l (Ansatz aus der DCA-Stammlösung). Die EC50 sollte bei etwa 3,3 mg/l liegen.

- in der **Mikrotiterplatten**-Kontrolle nicht mehr als 1 Ei pro Platte geschädigt ist.

Sterblichkeiten in der internen Kontrolle sind als Hinweis auf ungeeignete Platten zu bewerten. Bisher wurden Sterblichkeiten in den internen Kontrollen nur in ganz seltenen Fällen festgestellt. Für den Fall, dass ein Ei in der internen Kontrolle tot ist, sollte eine Plausibilitätsprüfung vorgenommen und dokumentiert werden. Im Zweifelsfall sollte auch eine solche Platte von der Auswertung ausgeschlossen werden.

Bei Sterblichkeiten > 1 Ei /Platte bei den Mikrotiterplatten-Kontrollen wird diese Platte vollständig von der Bewertung ausgeschlossen. Je nachdem, welche Platte aus der Untersuchungsserie betroffen ist, ist vom Testverantwortlichen zu entscheiden, ob dies Auswirkungen auf die Auswertbarkeit des vollständigen Testansatzes hat.

13 Dokumentation

Für die Fischhälterung sind Halterungsprotokolle (Musterprotokoll s. S. 13 des Merkblatts) anzulegen. Zur Dokumentation der Testdurchführung ist ein entsprechendes Testprotokoll (Musterprotokoll, s. S. 10 - 12 dieses Merkblattes) anzufertigen.

Über die Ergebnisse der Positivkontrolltestung mit DCA ist eine Zielwert-Kontrollkarte zu führen.

P-9/10	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	Januar 2016
---------------	---	----------------

14 Literatur

- [1] CD-Rom zum Fischeitest, Beuth Verlag (2003)
- [2] Abwasserverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 17. Juni 2004 (BGBl. I S. 1108, berichtigt 2625), geändert durch Art. 20 G . 31.07.2009 I 2585, zuletzt geändert durch Art. 1 V v. 2.9.2014 I 1474, Anlage zu § 4 „Analysen- und Messverfahren“ Giftigkeit gegenüber Fisch-eiern (GEi) in der Originalprobe DIN EN ISO 15088 (Ausgabe Juni 2009)
- [3] TierschG: "Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 20 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934) geändert worden ist" Neugefasst durch Bek. v. 18.5.2006 I 1206, 1313; zuletzt geändert durch Art. 4 Abs. 90 G v. 7.8.2013 I 3154
- [4] TVT (Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V.): Empfehlung für die Haltung, den Transport und das tierschutzgerechte Töten von Versuchsfischen, Merkblatt Nr. (118), Stand: Januar 2010
- [5] Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung – Validierungs-dokumente (Validierungsdokument zu DIN 38415-T6 (2003))
<http://www.wasserchemische-gesellschaft.de/de/dev/validierungsdokumente.html>

P-9/10	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	Januar 2016
---------------	---	----------------

Anlage 2

MUSTER

Testauswertung

Platte 1 - Kontrollen (Verdünnungswasser, 3,4-DCA)

zu Testbeginn	Reihe	Befund am Testende					IK		gültig**	Summe toter Eier/ Embryonen	% überlebende Eier
pH: <u>8,0</u> O ₂ : <u>8,2</u>	A	N	N	N	N	N	N	Negativkontrolle	ja	0	100
	B	N	N	N	N	N	N				
pH: : <u>8,0</u> O ₂ : : <u>8,2</u>	C	N	H	N	H	N	N	Positivkontrolle 3,4-DCA	ja	5	50
	D	N	H	S	N	N	S / H				

Platte 2 - Abwasser-Verdünnungen

zu Testbeginn	Reihe	Befund am Testende						gültig**	Summe toter Eier/ Embryonen	% überlebende Eier	
pH: : <u>7,0</u> O ₂ : : <u>6,3</u>	A	N	K	K	K	K	K	G = 1	ja	10	0
	B	N	K	K	K	K	K				
pH: : <u>7,2</u> O ₂ : : <u>7,7</u>	C	N	K	K	S / H	S / H	K	G = 2	ja	9	10
	D	N	K	N	K	K	S / H				

Platte 3 - Abwasser-Verdünnungen

zu Testbeginn	Reihe	Befund am Testende						gültig**	Summe toter Eier/ Embryonen	% überlebende Eier	
pH: <u>7,3</u> O ₂ : : <u>7,9</u>	A	N	N	S / H	N	N	H	G = 3	ja	5	50
	B	N	N	K	H	N	K				
pH: <u>7,5</u> O ₂ : <u>8,0</u>	C	N	N	N	S / H	N	N	G = 4	ja	1	90
	D	N	N	N	N	N	N				

Januar 2016	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	P-9/10
----------------	---	---------------

Verdünnungswasser	Negativkontrolle auf Platte 1 IK - Interne Kontrolle auf jeder Platte
DCA - Positivkontrolle	
Probenverdünnungen G = 1 bis G = 4	

Auswertungskriterien:

N = normal entwickelte Embryo
K = koaguliertes Ei
S = keine Schwanzablösung
H = kein Herzschlag

**Gültigkeitskriterien:

- Ist mehr als 1 Ei/Embryo pro Platte in einer internen Kontrolle tot, wird die betreffende Platte von der Bewertung ausgeschlossen.
- 90 % Überlebensrate in der Externen Kontrolle auf Platte 1 (bei 10 Eiern müssen 9 überleben)
- > 10% Sterblichkeitsrate bei 3,7mg/l DCA auf Platte 1 (Sterblichkeit zwischen 20% und 90%, d.h. 2 Eier müssen sterben, bis max. 9 Eier können sterben, 1 Ei muss überleben)
- G_{Ei} -Wert: 90 % Überlebensrate in den Abwasserverdünnungen Platten 2-3 (bei 10 Eiern müssen 9 überleben)

Testende: _____ / _____
Datum Uhrzeit

Testauswertung durch: _____
Unterschrift

- Temperatur im Inkubator: min _____ °C max _____ °C

Der Test ist gültig: Ja Nein

Ergebnis	$G_{Ei} = 4$
-----------------	--------------------------------

-

Datum , Unterschrift

P-9/10	Bestimmung der akuten Toxizität von Abwasser auf Zebrafisch-Eier (Danio rerio) (DIN EN ISO 15088: 2009-06)	Januar 2016
---------------	---	----------------

Anlage 5

Beispiel für die Nachzucht von Zebrabärblingen

Für die Nachzucht gibt man die gesamte Eiablage eines Tages in ein halb mit Hälterungswasser gefülltes Aquarium. Das Wasser ist auf etwa 26 °C temperiert und der Durchfluss der Umwälzpumpe / Filteranlage auf eine möglichst geringe Stärke eingestellt. Der Ansaugkorb wird zur Verringerung des Sogs durch eine Schaumstoffpatrone ersetzt. Das Aquarium wird kontinuierlich belüftet und mit fest eingestelltem Hell-Dunkel-Wechsel beleuchtet.

Frühestens nach 72 h schlüpfen die ersten Embryonen. Sie ernähren sich zunächst vom Dottersack. Am Tag 4 nach Ansatz sollte mit der Fütterung begonnen werden.

Bewährt haben sich folgende Fütterungsarten:

- Eine Mischung aus 40 ml frisch geschlüpfter Artemien und einem Laborlöffel TetraMin Baby-Trockenfutter, mit dem Ultra-Turrax zur einer homogenen Flüssigkeit vermischt. Von diesem Flüssigfutter werden 2 x täglich ca. 5 ml verfüttert.
- Fütterung mit Microzell und TetraMin-Baby Futter, später kleine Artemien.
- Zugabe von frischen Grünalgen.

Nach 4 Wochen reicht in der Regel die Fütterung von TetraMin Baby-Trockenfutter über einen Automaten aus.

Das Aquarium kann jetzt ganz befüllt werden.

Wasserwechsel und Reinigung sollten der Fischgröße entsprechend vorsichtig erfolgen.