

	Wasserbeschaffenheit Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] Teil 3: Durchflußverfahren (ISO 7346-3 : 1996) Deutsche Fassung EN ISO 7346-3 : 1997	DIN EN ISO 7346-3
--	---	---

ICS 13.060.01

Deskriptoren: Wasserbeschaffenheit, Toxizität, Fisch, Testorganismus, Durchfluß

Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh-water fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Part 3: Flow-through method (ISO 7346-3 : 1996); German version EN ISO 7346-3 : 1997

Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Téléostei, Cyprinidae)] — Partie 3: Méthode avec renouvellement continu (ISO 7346-3 : 1996); Version allemande EN ISO 7346-3 : 1997

Die Europäische Norm EN ISO 7346-3 : 1997 hat den Status einer Deutschen Norm.

Diese Norm ist Bestandteil der Reihe

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

und beschreibt das Verfahren

Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch

[Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] —

Teil 3: Durchflußverfahren (L 44)

Nationales Vorwort

Die Internationale Norm ISO 7346-3, die vom ISO/TC 147 „Wasserbeschaffenheit“ (Sekretariat: Deutschland) erarbeitet wurde, wurde von CEN aufgrund der Ergebnisse des Einstufigen Annahmeverfahrens (UAP) ohne Änderungen als Europäische Norm EN ISO 7346-3 übernommen.

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die als DIN-Normen veröffentlichten Einheitsverfahren sind beim Beuth Verlag einzeln oder zusammengefaßt erhältlich. Außerdem werden die genormten Einheitsverfahren in der Loseblatt-Sammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam vom Beuth Verlag GmbH und dem Wiley-VCH-Verlag publiziert. Die für das Wasserhaushalts-

Fortsetzung Seite 2
und 15 Seiten EN

Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

gesetz (WHG) und für das Abwasserabgabengesetz (AbwAG) relevanten Einheitsverfahren sind zusammen mit dem WHG und allen bisher erschienenen Abwasserverwaltungsvorschriften als DIN-Taschenbuch (DIN-TAB 230) herausgegeben worden.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel

„Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)	(DIN 38402)
Sensorische Verfahren (Gruppe B)	(DIN 38403)
Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)	(DIN 38404)
Anionen (Gruppe D)	(DIN 38405)
Kationen (Gruppe E)	(DIN 38406)
Gemeinsam erfaßbare Stoffgruppen (Gruppe F)	(DIN 38407)
Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)	(DIN 38408)
Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)	(DIN 38409)
Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)	(DIN 38410)
Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)	(DIN 38411)
Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)	(DIN 38412)
Einzelkomponenten (Gruppe P)	(DIN 38413)
Schlamm und Sedimente (Gruppe S)	(DIN 38414)
Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)	(DIN 38415)

Außer den in der Reihe DIN 38402 bis DIN 38415 genormten Untersuchungsverfahren liegen eine Reihe Europäischer und Internationaler Normen als DIN-EN-, DIN-EN-ISO- und DIN-ISO-Normen vor, die ebenfalls Bestandteil der „Deutschen Einheitsverfahren“ sind.

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon (0 30) 26 01 – 24 23, oder der Beuth Verlag GmbH, Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin, Postanschrift 10772 Berlin, Auskunft.

ICS

Deskriptoren: Wasser, Beschaffenheit, Wasserverunreinigung, Untersuchungen, Wasseruntersuchungen, Biologische Untersuchungen, Bestimmung, Toxizität

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit
Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber
einem Süßwasserfisch
[Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]
Teil 3: Durchflußverfahren
(ISO 7346-3 : 1996)

Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Part 3: Flow-through method (ISO 7346-3 : 1996)

Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Téléostei, Cyprinidae)] — Partie 3: Méthode avec renouvellement continu (ISO 7346-3 : 1996)

Diese Europäische Norm wurde von CEN am 1997-10-30 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist.

Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Zentralsekretariat oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Zentralsekretariat mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, der Tschechischen Republik und dem Vereinigten Königreich.

CEN

EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
European Committee for Standardization
Comité Européen de Normalisation

Zentralsekretariat: rue de Stassart 36, B-1050 Brüssel

Vorwort

Der Text der Internationalen Norm des Technischen Komitees ISO/TC 147 „Water quality“ der „International Organization for Standardization“ (ISO) wurde als Europäische Norm durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muß den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 1998, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 1998 zurückgezogen werden.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen:

Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, die Tschechische Republik und das Vereinigte Königreich.

Diese Europäische Norm besteht aus folgenden Teilen:

EN ISO 7346-1

Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Teil 1: Statisches Verfahren

EN ISO 7346-2

Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Teil 2: Semistatisches Verfahren

EN ISO 7346-3

Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Teil 3: Durchflußverfahren

Die Anhänge A, B und C von diesem Teil der EN ISO sind informativ.

Anerkennungsnotiz

Der Text der Internationalen Norm ISO 7346-3 : 1997 wurde von CEN als Europäische Norm ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Die drei Teile der ISO 7346 beschreiben Verfahren zur Bestimmung der akuten letalen Toxizität von Substanzen gegenüber dem Zebrafisch (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan); es muß jedoch betont werden, daß der empfohlene Einsatz des Zebrafisches die Verwendung anderer Spezies nicht ausschließt. Die hier vorgestellten Verfahrensweisen lassen sich auch auf andere Süßwasser-, Meeres- oder Brackwasserfische übertragen, wobei entsprechende Modifikationen von z. B. der Zusammensetzung des Verdünnungswassers oder der Temperaturbedingungen vorgenommen werden.

Innerhalb der drei Teile der ISO 7346 kann die Wahl zwischen einem statischen, einem semistatischen und einem Durchflußverfahren getroffen werden. Das in diesem Teil der ISO 7346 beschriebene statische Verfahren, in dem die Testlösung nicht erneuert wird, hat den Vorteil des Einsatzes einfacher Geräte, allerdings können die Substanzen in den Testgefäßen während des Tests abgebaut und die Wasserqualität kann generell herabgesetzt werden. Das in diesem Teil der ISO 7346 beschriebene Durchflußverfahren, in dem die Testlösung kontinuierlich ersetzt wird, vermeidet diese Schwierigkeit, benötigt jedoch eine etwas kompliziertere Ausstattung. Im semistatischen Verfahren, beschrieben in ISO 7346-2, werden die Testlösungen jeweils nach 24 h oder 48 h erneuert, damit stellt dieses Verfahren einen Kompromiß zwischen den beiden anderen dar.

Das Durchflußverfahren kann für die meisten Substanzklassen verwendet werden, einschließlich für in Wasser instabile Substanzen, deren Konzentration wird jedoch, wenn immer möglich, bestimmt. Der Einsatz des statischen Verfahrens beschränkt sich auf die Untersuchung von Substanzen, deren Konzentration während der Testdauer relativ konstant ist. Das semistatische Verfahren kann zur Untersuchung derjenigen Substanzen verwendet werden, deren Konzentration während des Tests zufriedenstellend beibehalten werden kann, indem die Lösungen nach 24 h oder 48 h erneuert werden. Spezielle Vorkehrungen müssen im Fall von leichtflüchtigen Verbindungen getroffen werden.

Um die Lösung und die Beibehaltung der Konzentration von Substanzen, deren letale Wirkung im Bereich der Wasserlöslichkeit liegt oder ihr entspricht, sicherzustellen, darf ein geringes Volumen an Lösemittel eingesetzt werden, wie es in den Verfahren beschrieben ist.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil der ISO 7346 legt ein Durchflußverfahren zur Bestimmung der akuten letalen Konzentration von stabilen, nicht-flüchtigen, unter den gegebenen Bedingungen wasserlöslichen Einzelsubstanzen gegenüber einem Süßwasserfisch [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae) — Trivialname Zebrafisch] in Wasser einer bestimmten Beschaffenheit fest.

Das Verfahren ist anwendbar auf die Ermittlung einer großen Bandbreite akuter letaler Toxizität der zu untersuchenden Substanz gegenüber *Brachydanio rerio* unter den Testbedingungen.

Die Ergebnisse selbst sind jedoch ungenügend, um Wassergütestandards im Umweltschutz zu definieren.

Das Verfahren ist auch anwendbar, wenn bestimmte andere Spezies von Süßwasserfischen als Testorganismus eingesetzt werden¹⁾.

¹⁾ Die folgenden Spezies von Süßwasserfischen können zusätzlich zu *Brachydanio rerio* ohne Änderung dieses Teils der ISO 7346 verwendet werden:

- *Lepomis macrochirus* (Teleostei, Centrarchidae)
- *Oryzias latipes* (Teleostei, Poeciliidae)
- *Pimephales promelas* (Teleostei, Cyprinidae)
- *Poecilia reticulata* (Teleostei, Poeciliidae)

Das Verfahren kann für den Einsatz anderer Süßwasser-, Meeres- oder Brackwasserfische adaptiert werden, wobei die Testbedingungen, insbesondere hinsichtlich der Quantität und der Qualität des Verdünnungswassers, und der Temperatur modifiziert werden.

2 Grundlagen des Verfahrens

Die auf 50 % einer Testpopulation von *Brachydanio rerio* letale Konzentration einer Testsubstanz nach Expositionszeiten von 24 h, 48 h, 72 h und 96 h in Wasser wird unter definierten Bedingungen bestimmt. Diese mittleren letalen Konzentrationen werden als die 24 h — LC 50, 48 h — LC 50, 72 h — LC 50 und 96 h — LC 50 bezeichnet.

Der Test wird in zwei Stufen durchgeführt:

- a) Vortest, in dem eine ungefähre mittlere letale Konzentration ermittelt wird und der dazu dient, den Konzentrationsbereich für den Haupttest festzulegen;
- b) Haupttest, dessen Ergebnisse ausschließlich angegeben werden.

Wenn es Hinweise gibt, daß die Testkonzentration während der Untersuchung relativ konstant bleibt (z. B. innerhalb etwa 20 % des Nominalwerts), werden entweder die gemessenen oder die Nominalkonzentrationen zur Abschätzung der LC 50 verwendet. Wenn die Analysenergebnisse zeigen, daß die Konzentration zwar relativ stabil, aber unter 80 % oder über 120 % liegt, werden die Analysenwerte zur Abschätzung der LC 50 verwendet. Wenn es keine Information darüber gibt, daß die Testkonzentrationen während der Untersuchung annehmbar stabil sind oder wenn bekannt ist (oder vermutet wird) daß die Konzentrationen der Testsubstanz in irgendeinem Teststadium signifikant herabgesetzt sind, unabhängig davon, ob Analysenwerte zur Verfügung stehen, kann die LC 50 nach diesem Verfahren nicht ermittelt werden. In diesen Fällen ist das Testergebnis nicht notwendigerweise ungültig, es kann jedoch lediglich festgehalten werden, daß die $LC\ 50 \leq x$ mg/l ist; wobei der Wert x aus den eingesetzten Nominalkonzentrationen abgeschätzt wird.

3 Testorganismus und Reagenzien

Die Reagenzien müssen von anerkannter analytischer Qualität sein. Das zur Herstellung der Lösungen verwendete Wasser muß aus einer Glasapparatur destilliertes oder deionisiertes Wasser von mindestens vergleichbarer Reinheit sein.

3.1 Testorganismus

Testspezies ist *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae), allgemein bekannt als Zebrafisch. Jeder Testfisch muß eine Länge von (30 ± 5) mm haben, die im allgemeinen einer Masse von $(0,3 \pm 0,1)$ g entspricht. Sie müssen aus einer Population eines einzigen Stamms entnommen werden. Die Tiere einer Lieferung müssen akklimatisiert werden und in jedem Fall vor Testbeginn mindestens sieben Tage in kontinuierlich, mit Luftblasen