

## **Texte 87/2003**

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES BUNDESMINISTERIUMS FÜR  
UMWELT, NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Förderkennzeichen 299 25 261  
UBA-FB 000508

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

von

**Dipl.- Biol. Carolin Peters und Dr. Wolfgang Ahlf**

Technische Universität Hamburg-Harburg  
Arbeitsbereich Umweltschutztechnik

## Kurzfassung

Um die Qualität von Meer- und Brackwasser-Sedimenten hinsichtlich ihres toxischen Potenzials bewerten zu können, ist der Einsatz mariner Biotests erforderlich. Deshalb sind marine Biotestverfahren in internationalen Richtlinien zum Monitoring der Meeresumwelt und zum Baggergut- Management (HELCOM 1992; PIANC 1997, 1998; OSPARCOM 1998; IDAC/ CEDA 1999; LC 2000) vorgesehen. In den Baggergut- Richtlinien sind sie Bestandteil der Risikoabschätzung (*Risk Assessments*) einer Verbringung des Baggerguts ins Meer und stellen somit die Basis für das Risikomanagement (*Risk Management*) dar.

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

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

Das Testset besteht aus zwei Tests für die Wasserphase (Eluate): dem Leuchtbakterientest (DIN EN ISO 11348- 1-3) und dem marinen Algentest mit *Phaeodactylum tricornutum* (DIN EN ISO 10253) sowie dem Gesamtsedimenttest mit dem aestuarinen und marinen Amphipoden *Corophium volutator* (ISO DIS 16712). Damit wurden zwei akute Tests und ein chronischer Test ausgewählt, die als internationale (ISO), europäische (EN) und nationale (DIN) Standards vorlagen bzw. sich im ISO Standardisierungsverfahrens befanden. Mit diesem Testset wurden Beobachtungsgrößen erhoben, die von einem integralen Indikator für ungestörte

Stoffwechselforgänge (Biolumineszenz), über Verhaltensbeobachtungen (Sedimentmeidung während des Tests und Wiedereingrabeverhalten der Amphipoden nach Testende) bis zu den integrierenden Parametern wie Reproduktion (Algenwachstum) und Mortalität (Amphipoden) reichen. Alle drei Tests sind als sehr sensibel im Vergleich zu anderen marinen Biotests empfohlen worden (Herbst & Nendza 2000).

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

Für alle drei Testverfahren wurde künstliches Meerwasser sowohl für die Kultivierung der Testorganismen als auch für die Testdurchführung eingesetzt. Dies ist sowohl im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse als auch für die Implementierung der Testverfahren in küstenfernen Laboratorien von entscheidender Bedeutung.

Die einzelnen Testverfahren wurden auf Ihre Eignung für die Bewertung von Meer- und Brackwasser- Sedimentproben geprüft und den Erfordernissen angepasst. Der Leuchtbakterientests musste für Brack- und Meerwasser- Eluate modifiziert werden. Die Modifikation wurde in einem deutschlandweiten Ringtest unter Beteiligung von 24 Laboratorien erfolgreich validiert. Derzeit wird von uns die Aufnahme der Modifikation als informativen Annex für die Testung von Brack- und Meerwasserproben in den ISO Standard (ISO EN DIN 11348- 1-3) vorbereitet.

Der standardisierte marine Algentest lag zunächst als Test zur Stoffbewertung vor und wurde im Rahmen des Projekts auf die Testung von Meer- und Brackwasser-Eluate erweitert. Diese Erweiterung wurde von uns bei der Revision des ISO Standards (10253) in den überarbeiteten Standard integriert (Abschluss im Jahr 2003) und wird somit auch als nationaler Standard zur Verfügung stehen.

Die ISO Standardisierung des akuten Amphipodentest wurde von uns im Rahmen des Projekts intensiv unterstützt und wird im Jahr 2003 abgeschlossen sein. In Ergänzung zu den in der Testvorschrift vorgesehenen Parametern Mortalität, Sedimentmeidung und Wiedereingrabeverhalten des Schlickkrebsses wurde von uns zusätzlich eine Zustandsbeschreibung der Tiere am Testende („tot“, „moribund“ und „lebend“) erfasst, womit Effekte frühzeitiger und differenzierter erfasst werden konnten.

Der akute Amphipodentest basierte bis dato auf Wildfängen von *Corophium volutator*. Entsprechend war die Vorbelastung der Freilandtiere unterschiedlich und die Verfügbarkeit im Winter sehr stark eingeschränkt sowie mit einem Eingriff ins Ökosystem verbunden. Um diese Nachteile auszuschließen, wurde der Schlickkrebsses *Corophium volutator* an der TUHH erstmals über einen Zeitraum von einem Jahr zur Reproduktion unter Laborbedingungen gebracht. Es gelang, die Tiere auch im Winter zu reproduzieren. Die Fitness der gezüchteten Tiere wurde durch langfristige Haltungen, Toxizitätstests und morphologischen Untersuchungen unter dem Binokular (einschließlich der Prüfung auf Parasitenbefall) überprüft. Mit der erfolgreichen Reproduktion und Kultivierung des Schlickkrebsses im Labor wurde sowohl ein großer Beitrag für die Implementierung des Tests in anderen Laboratorien geleistet als auch die Basis für die Entwicklung eines chronischen Tests gelegt. Der Bedarf eines solchen Testverfahrens wurde vielfach formuliert (u.a. HELCOM 1992; OSPARCOM 1998; EC TGD 2002).

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

Damit wurde das Testset für die Bewertung von Brack- und Meerwassersedimenten bereitgestellt und eine erste Datengrundlage für die Ableitung von marinen Sedimentqualitätskriterien geschaffen.

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

Aufgrund der internationalen Zusammenarbeit und des Wissenstransfers in die internationale Standardisierung wurde mit diesem Projekt auch ein Beitrag für eine europäische Harmonisierung zur Bewertung von Brack- und Meerwassersedimenten (inkl. Baggergut) geleistet.

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

ENVIRONMENTAL RESEARCH OF THE FEDERAL MINISTRY OF THE  
ENVIRONMENT, NATURE CONSERVATION AND NUCLEAR SAFETY

Research Report 299 25 261  
UBA-FB 000508

**Validation, harmonization and implementation of a  
base-set of bioassays for the assessment of brackish  
and marine sediment samples**

by

**Dipl.- Biol. Carolin Peters and Dr. Wolfgang Ahlf**

Technical University of Hamburg-Harburg  
Department of Environmental Science and Technology

## Executive summary

Marine bioassays are necessary in order to evaluate the quality of marine and brackish sediment samples with regard to their toxic potential. Thus, marine bioassays are required in international guidelines for the monitoring of the marine environment and for dredged material management (OSPARCOM; HELCOM; LC; PIANC; IDAC/ CEDA). The estimation of the toxicological hazard is part of the risk assessment for the disposal of dredged material and therefore essential for dredged material management decisions.

Because of the lack in national research with regard to application of marine ecotoxicological methods for the assessment of marine and brackish sediment samples, marine bioassays were not considered or only considered to a limited extent in national dredged material management guidelines. In the framework of this project, a marine bioassay test-set for the assessment of brackish and marine sediment quality was validated, harmonized and implemented for the first time in laboratories within Germany. It is now ready for implementation in international conventions for the protection of North Sea and Baltic Sea in national regulations.

The standardization of the test procedures was of high importance, because of the need for an implementation of the test-set in national regulations. For that reason, the project was conducted in close cooperation with the national standardization working group on marine bioassays (DIN AK 5.3) and the international standardization organisation (ISO/ TC 147 „Water quality“).

The test-set consists of two tests for the water phase of brackish and marine sediments (elutriates): bacteria bioluminescence test (DIN EN ISO 11348- 1-3) and the marine algae growth inhibition test with *Phaeodactylum tricorutum* (DIN EN ISO 10253) as well as a whole sediment bioassay with the estuarine and marine amphipod *Corophium volutator* (ISO DIS 16712). In other words, two acute and one chronic toxicity tests were selected, which existed as international (ISO), European (EN) and national (DIN) standards or were subject of the international standardization procedure.

With this battery a broad spectrum of endpoints – metabolism (bioluminescence), behavioural (avoidance of sediment and reburial of the amphipods in uncontaminated sediment at the end of the test) and integrating parameters like reproduction (algae growth) and mortality (amphipods) - are considered. All three test methods were recommended as sensitive in comparison to other marine bioassays (Herbst & Nendza 2000).

The test-set was established in parallel at four laboratories: a university (Technical University of Hamburg-Harburg, TUHH), a private laboratory (Dr. U. Noack-Laboratorium für Angewandte Biologie), a federal authority (Bundesanstalt für Gewässerkunde, BfG) and a federal state authority (Niedersächsisches Landesamt für Ökologie, NLÖ). Both authorities have not established the acute amphipod test yet, but plan to do this in the future.

For the marine biological methods artificial sea water was successfully used both for culturing the test organism and for the test procedure. This was of high importance, both with regard to the reproducibility of the test results as well as for establishing the test methods in inland laboratories, which are far away from a natural sea water supply.

The tests were examined for their suitability in the assessment of marine and brackish sediment samples and were further refined. The bioluminescence test had to be modified for brackish and marine elutriates. The modification was validated in a round robin test with 24 laboratories within Germany. At present, the implementation of the modification in the standard protocol (ISO EN DIN 11348- 1-3) as an informative annex is in preparation.

The standardized marine algae growth inhibition test was initially meant for single substance testing. Now, it has been expanded for the testing of brackish and marine sediment samples (elutriates) within this project. This enhancement has been integrated in the revision of the ISO standard (10253) and will be finished in the year 2003. Thus, it will consecutively be transferred into a national standard.



The ISO standardization of the acute toxicity test of estuarine or marine sediments with amphipods was intensively supported by this project and will be finished by the end of 2003. In addition to the endpoints which are demanded by the test procedure (mortality and reburial in uncontaminated sediment at the end of the test), a sub-lethal parameter describing the fitness of the test organism at the end of the test has been provided. With this addition, effects are detected earlier and in a more differentiated way.

The acute toxicity test to amphipods was up to the beginning of the project based on field-collected test organism *Corophium volutator*. Therefore, the preload of the test organism varied and its availability in winter was very poor. Moreover, the field collection may be an impact to the ecosystem at the reference site. To solve these disadvantages of field collection, the amphipod *Corophium volutator* was continuously reproduced at the TUHH over a period of one year under laboratory conditions for the first time. Thus, offspring was also available in winter. The fitness of the cultured organism was controlled by long-term culturing, toxicity tests and morphological examinations (incl. check for parasites). With the successful cultivation of *Corophium volutator* important progress in both the implementation of the test within Germany and in the development of a chronic bioassay has been achieved. The need of such a chronic test has often been stressed (b. o. HELCOM 1992; OSPARCOM 1998; EC TGD 2002).

Sediment sampling, sample preparation including the preparation of elutriates, the test procedure and interpretation of the results were harmonised for all three test procedures and within the laboratories. The successful harmonisation between the laboratories and the validation of the test-set has been demonstrated in round robin tests on North Sea and Baltic Sea sediment samples. Thus, the test-set is ready for the assessment of brackish and marine sediment samples and a first data set has been collected for the setting of marine sediment quality criteria.

The success of the project is also indicated by the fact that the federal and state authorities responsible for dredged material management (Bundesanstalt für Gewässerkunde, BfG) and Landesamt für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-

Holstein, LANU) are currently implementing this marine bioassay test-set for dredged material management.

The strong international cooperation and the knowledge transfer in the international standardization procedure in the course of this project helped to make it an important contribution to the European harmonization in the ecotoxicological quality assessment of brackish and marine sediment samples (incl. dredged material)

The implementation of marine bioassays should not focus on dredged material management only, but also on ecological risk assessment and the management of other emissions. This holds, in particular for the notification of substances (EC TGD 2002), if the substances are directly deployed in the marine environment, and for any kind of discharge to the marine environment. The peculiarities of marine ecosystems and their complexity as well as the necessity to comply with the precautionary principle give reason to do so.