

Applikationsbericht: Durchführung des Manometrischen Respirationstests nach OECD 301F mit dem OxiTop® Control Messsystem unter GLP-Bedingungen

Anmerkung: Dieser Report wurde unter Verwendung des OxiTop® Control Systems erstellt. Das vorgestellte Verfahren ist problemlos auf das OxiTop®-IDS System übertragbar.

1 Einleitung

Die Bestimmung der leichten biologischen Abbaubarkeit als wichtige Stoffeigenschaft in Hinblick auf mögliche langfristige Wirkungen von Chemikalien ist bereits für den Grunddatensatz von Chemikalienbewertungen nach Chemikaliengesetz (ChemG) oder anderen Regulierungen (z.B. EU Detergenzien-Verordnung) gefordert. Hierfür werden meist die OECD Guidelines 301 A-F angewandt, die nahezu wortgleich in den Anhang V (Methodensammlung) der Richtlinie 67/548/EWG übernommen wurden, der für Chemikalienprüfungen in der EU verbindlich ist (vgl. Beek et al., 2001).

Bei den Methoden zur Bestimmung der „*leichten biologischen Abbaubarkeit*“ können verschiedene Endpunkte unterschieden werden. Bei den OECD 301 A und E wird die Abnahme des DOC als Maß für die Abbaubarkeit bestimmt, bei der OECD 301 B hingegen die CO₂-Freisetzung während der Mineralisierung, bei den OECD 301 C, D und F die Sauerstoffzehrung infolge der Mineralisierung unter aeroben Bedingungen.

Die Bestimmung der leichten biologischen Abbaubarkeit über die Sauerstoffzehrung, die anhand von Druckmessungen in Respirometern erfasst wird, ist in der OECD 301 F bzw. der 92/69 EWG, C.4-D „Manometric Respirometry Test“ beschrieben. Im Labor der Hydrotox GmbH wird hierfür seit vier Jahren das OxiTop® Control Messsystem der Firma Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (WTW) in Weilheim verwendet. Die Durchführung erfolgt unter GLP-Bedingungen. Über Erfahrungen hinsichtlich der Qualitätssicherung wollen wir berichten.

2 Gute Labor-Praxis

Nach § 19a des ChemG sind alle nicht-klinischen gesundheits- und umweltrelevanten Sicherheitsprüfungen von Stoffen oder Zubereitungen, deren Ergebnisse eine Bewertung ihrer möglichen Gefahren für Mensch und Umwelt in einem Zulassungs-, Erlaubnis-, Registrierungs-, Anmelde- oder Mitteilungsverfahren ermöglichen sollen, unter Einhaltung der Grundsätze der Guten Laborpraxis (GLP) durchzuführen. Die

gesetzlichen Vorgaben zur GLP sind im Anhang 1 ChemG spezifiziert. Die GLP ist ein Qualitätssicherungssystem, das sich mit dem organisatorischen Ablauf und den

Rahmenbedingungen befasst, unter denen solche Prüfungen geplant, durchgeführt und überwacht werden. Wichtige Aspekte sind die Aufzeichnung, Archivierung und Berichterstattung der durchgeführten Prüfungen. Die Anerkennung der GLP erfolgt für bestimmte Prüfkategorien nach einer behördlichen wiederkehrenden Inspektion.

3 Manometrischer Respirationstest OECD 301 F

3.1 Grundlagen

Der Test wird zur Bestimmung der vollständigen biologischen Abbaubarkeit organischer Substanzen im wässrigen Medium mittels Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs in einem geschlossenen Respirometer verwendet. Der Prüfgegenstand wird als einzige Kohlenstoffquelle einem mineralischen Verdünnungswasser zugesetzt. Der durch die Sauerstoffzehrung entstehende Unterdruck wird manometrisch erfaßt, wobei das entstehende CO₂ in konzentrierter NaOH absorbiert wird. Der Respirometertest eignet sich vor allem für die Bewertung der biologischen Abbaubarkeit wasserlöslicher Substanzen, insbesondere auch für Abwasser, kann jedoch auch für flüchtige und schwerlösliche Substanzen angewendet werden. Die Testkonzentration beträgt standardmäßig 100 mg/l, mindestens jedoch einen theoretischen Sauerstoffbedarf (ThSB) von 100 mg/l.

Es handelt sich um einen Test auf "ready biodegradability" (leichte Abbaubarkeit). Eine Sauerstoffzehrung von < 60% des ThSB nach 28 Tagen muß nicht notwendigerweise bedeuten, daß die Substanz nicht biologisch abbaubar ist.

3.2 Beschreibung des OxiTop® Control Messsystems

Es werden die Meßköpfe OxiTop® -C, der Controller OxiTop® OC110 und der Thermostatschrank TS606-6/4-i der Firma WTW, Weilheim verwendet. Die Meßköpfe und der Controller messen den Sauerstoffverbrauch in einem geschlossenen System. Sie werden für Messungen des biologischen Sauerstoffbedarfs (BSB) und für biologische Abbaubarkeitstests mit dem Endpunkt "Sauerstoffzehrung" verwendet. Durch den Verbrauch von Sauerstoff und das gleichzeitige Binden von entstehendem Kohlendioxid an Natronlauge-Plätzchen entsteht ein Unterdruck im geschlossenen System. Die Meßköpfe registrieren und speichern diesen Druck semikontinuierlich (bei 28 Tagen Laufzeit erfolgen die Messungen alle 112 Minuten) über den eingestellten Meßzeitraum.

Die gespeicherten Werte der Messköpfe werden mittels Infrarotübertragung in den Controller eingelesen. Diese Daten werden über das mitgelieferte Programm Achat OC auf den PC übertragen und über ein firmeneigenes Excel-Formblatt ausgewertet.

3.3 Durchführung

Das Verdünnungswasser besteht aus deionisiertem Wasser und vier mineralischen Nährlösungen (vgl. OECD 301 F in Verbindung mit OECD 301 A).

Als Inokulum wird standardmäßig Belebtschlamm einer Kläranlage mit überwiegend kommunalem Abwasser entsprechend einer Konzentration von 30 mg TS/l verwendet.

In jeder Versuchsreihe wird eine Referenzsubstanz (Natriumacetat oder Natriumbenzoat) in einer parallelen Serie in einer Konzentration von 100 mg/l mit getestet.

Ein typisches Versuchsschema sieht folgendermaßen aus:

- 2-3 Flaschen mit dem Prüfgegenstand und Inokulum
- 2 Flaschen mit dem Prüfgegenstand, der Referenzsubstanz und Inokulum (Toxizitätstest, optional)
- 2-3 Flaschen mit Referenzsubstanz
- 1-2 Flaschen mit dem Prüfgegenstand ohne Inokulum aber mit einem Biozid (abiotische Kontrolle, optional)
- 2-3 Flaschen mit Inokulum (Blindwerte)

Das Füllvolumen beträgt standardmäßig 164 ml/Flasche. Damit lassen sich BSB-Werte bis 400 mg/l in der wässrigen Phase bestimmen. Von Feststoffen werden etwa 16,4 mg/-Flasche direkt in die Reaktoren eingewogen (entspricht 100 mg/l). Bei wassergelösten Stoffen oder Abwasserproben eine entsprechende Stoff- bzw. CSB-Menge. Optional kann die Toxizität der Prüfsubstanz gegenüber Belebtschlammorganismen anhand der Hemmung der Abbaubarkeit der Referenzsubstanz bestimmt werden.

Die abiotische Kontrolle (optional) wird mit 1 ml einer Kupfersulfatlösung (10 g CuSO₄ * 5H₂O / l aqua deion.) vergiftet, um abiotische Effekte bei der Mineralisierung zu erfassen.

In jede Flasche wird ein Magnetrührstab gegeben, es wird der Gummiköcher aufgesetzt, ein NaOH-Plätzchen zur Absorption des freigesetzten CO₂ eingesetzt und die Meßköpfe dicht aufgeschraubt.

3.4 Auswertung

In Ableitung des allgemeinen Gasgesetzes und unter Berücksichtigung der Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser gilt die folgende Formel für die Berechnung des Sauerstoffverbrauchs (BSB), die bereits im OxiTop® Controller einprogrammiert ist:

$$BSB = \frac{M}{R * T_m} * \left\{ \frac{V_t - V_l}{V_l} + \alpha \frac{T_m}{T_o} \right\} * \Delta p$$

wobei gilt:

BSB	Sauerstoffverbrauch des Prüfgegenstandes in mg/l
M	Molekulargewicht von Sauerstoff (32000 mg/mol)
R	Gaskonstante (83.144 l*mbar/(mol*K))
T _o	Referenz-Temperatur (273.15 K)
T _m	Inkubationstemperatur (294.65 K)
V _t	Flaschenvolumen in ml
V _l	Füllvolumen in ml
α	Bunsen Absorptionskoeffizient (0.03103)
Δp	Differenz des Sauerstoffpartialdruckes in hPa

Die Berechnung der Abbaurate erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Abbau in \% des ThSB} = \frac{BSB_{\text{Testansatz}} [\text{mg/l}] - BSB_{\text{Kontrollansätze}} [\text{mg/l}]}{\text{ThSB} [\text{mg/l}]} * 100$$

Der theoretische Sauerstoffbedarf (ThSB) wird anhand der Formeln nach OECD 301 Annex IV über die Summenformel berechnet, wobei zwischen der Mineralisierung des Stickstoffs zu Ammoniak (ThSB_{NH4}) bzw. Nitrifizierung des Stickstoffs zu Nitrat (ThSB_{NO3}) unterschieden wird. Standardmäßig erfolgt die Auswertung über den ThSB_{NH4}, gegebenenfalls werden die Ergebnisse für beide Referenzwerten angegeben. Bei Abwasserproben wird anstelle des berechneten ThSB der Chemische Sauerstoffbedarf (CSB) der Probe als Bezugspunkt verwendet. In den mit der Referenzsubstanz beaufschlagten Toxizitätsansätzen werden die Abbauwerte auf den ThSB_{gesamt} (Summe ThSB_{Referenzsubstanz} + ThSB_{Prüfgegenstand}) bezogen.

Prüfgegenstände, die nach 28 Tagen eine Sauerstoffzehrung von > 60% des ThSB ergeben, gelten als *"ready biodegradable"* bzw. *"leicht biologisch abbaubar"*. Dieser Wert muß innerhalb von 10 Tagen nach der lag-Phase (Abbau erreicht 10% des ThSB) erreicht sein (= 10-Tage-Fenster). In der EU-Detergenzienverordnung wird das 10-Tage-

Fenster nicht angewendet und das Ergebnis als „*Endabbaubarkeit*“ („*ultimate biodegradability*“) angegeben.

Wenn in den Toxizitätstestansätzen, die sowohl die Test- als auch die Referenzprobe enthalten, eine Abbaurate von weniger als 25 % in 14 Tagen (bezogen auf Gesamt-ThSB) erreicht wird, ist die Testsubstanz als toxisch anzusehen und der Versuch möglicherweise mit einer geringeren Testkonzentration und/oder einer höheren Animpfdichte zu wiederholen.

3.5 Validitätskriterien

Eine Prüfung wird nur dann als gültig akzeptiert, wenn folgende Validitätskriterien erfüllt sind:

- Die O₂-Eigenzehrung soll nach 28 Tagen 60 mg/l nicht übersteigen, übliche Werte liegen zwischen 20-30 mg/l.
- Die Referenzsubstanz muß in den ersten 14 Tagen zu > 60 % abgebaut sein.
- Die Differenz der Abbauraten in Parallelansätzen der Testsubstanz soll nach Ablauf des 10-Tage-Fensters unter 20 % betragen.
- Wenn der pH-Wert nach Prüfungsende außerhalb von 6,0 bis 8,5 liegt, sollte die Prüfung mit einer geringeren Prüfgegenstandskonzentration wiederholt werden.

4 Auswertungsbeispiel

Ein Beispiel für die Auswertung eines (anonymisierten) Prüfgegenstandes ist im Anhang in Tabelle 1 und 2 und in Grafik 1 zu finden. Es handelte sich hierbei um eine wasserlösliche, nicht flüchtige Prüfsubstanz. Die Prüfsubstanz hat eine Endabbaubarkeit von 61,1 % nach 28 Tagen. Am Ende des 10-Tage Fensters liegt der biologische Abbau der Prüfsubstanz noch unter 60 %, so dass keine Einstufung in eine „leichte biologische Abbaubarkeit“ vorgenommen werden konnte. Die Referenzsubstanz erreicht das Kriterium eines Abbaus > 60 % bereits nach vier Tagen. In Tabelle 1 ist zu sehen, dass sich die verschiedenen Ansätze einer Serie sehr parallel verhalten. Das Kriterium der Eigenzehrung in den Impfzehrkontrollen unter 60 mg/l konnte gut eingehalten werden.

5 Anwendung der GLP-Grundsätze

5.1 Überprüfung der Messköpfe

Das OxiTop® Control Messsystem sieht einen GLP-Modus vor, bei dem angezeigt wird, wann eine „Rekalibrierung“ der Druckmessköpfe erforderlich ist. Letztlich handelt es sich hierbei um keine „Kalibrierung“ im eigentlichen Sinne, sondern lediglich um eine „Überprüfung“ der Messköpfe, da diese nur beim Hersteller nachjustiert werden können. In unserem Labor werden die Druckmessköpfe standardmäßig alle 12 Monate sowie nach auffallenden Messergebnissen überprüft. Für die Kalibrierung werden Kalibriertabletten von WTW (Best. Nr. 209 333) verwendet. Diese werden in jeweils mit 164 ml deionisiertem Wasser gefüllte und 4 Stunden vortemperierte BSB-Flaschen gegeben. Anschließend werden die zu überprüfenden Druckmessköpfe auf die Flaschen geschraubt und die Messwerte über 5 Tage aufgenommen. Die Prüfwerte und Toleranz der Kalibriertabletten sind chargenabhängig und jeweils auf dem Etikett angegeben. Erfüllt ein Meßkopf nicht die erforderlichen Anforderungen, wird er nicht weiter verwendet und an den Hersteller geschickt.

5.2 Versuchsdesign und Validitätskriterien

Nach bisherigen Erfahrungen muß damit gerechnet werden, dass einzelne Messköpfe aus unterschiedlichen Gründen sich nicht wie erwartet verhalten und damit als Ausreißer zu werten sind. Der häufigste Grund besteht vermutlich in einer Undichtigkeit zwischen der Flasche und dem Messkopf. Es können aber auch andere Gründe, wie eine ungleiche Verteilung des Inokulums (Schlammflocken) oder Temperaturschwankungen eine Rolle spielen. Diese Nachteile werden durch die einfache und damit kostengünstige Durchführung wett gemacht. Um durch einzelne Ausreißer nicht den gesamten Versuch zu gefährden, werden in unserem Labor für jede Serie ein bis zwei zusätzliche Flaschen angesetzt (bis zu vier Flaschen mit dem Prüfgegenstand). Nach der OECD 301 F sind auch einzelne Ansätze zulässig. Eine größere Anzahl von Parallelansätzen bietet den Vorteil, dass eine verlässlichere Aussage über die Variabilität der Einzelmessungen möglich ist.

Die Validitätskriterien (vgl. 3.5) beinhalten in sich schon Qualitätsmerkmale hinsichtlich der Variabilität der Messergebnisse (20% Kriterium), der Eigenzehrung des Inokulums und des Verlaufs der Abbaubarkeit der Referenzsubstanz. Weitere Qualitätsmerkmale können aufgrund des „Expert-Knowledge“ definiert werden. So wäre beispielsweise ein Abbaugrad von Prüf- oder Referenzsubstanz von deutlich

über 100% oder eine Abnahme schon erreichter Abbauwerte über die Zeit nicht akzeptabel und ein Hinweis auf Unregelmäßigkeiten oder Nitrifikation.

5.3 Temperaturkonstanz

Die OECD 301 F sieht einen zugelassenen Temperaturbereich von 22 +/- 2°C vor. Innerhalb dieses Bereichs darf die Temperatur maximal um +/- 1°C schwanken. Im WTW-Thermoschrank werden diese Kriterien sicher eingehalten. Schwankungen der Temperatur wirken sich unmittelbar auf den Unterdruck in den Flaschen und damit auf die Messergebnisse aus. Unter GLP-Gesichtspunkten ist grundsätzlich eine Überprüfung der Temperatur über den gesamten Versuchszeitraum mittels eines MIN/MAX-Thermometers gefordert.

5.4 Beispieldatensatz

Grundsätzlich ist eine Qualitätssicherung von computergestützten Systemen erforderlich. Die Druckwerterfassung über die Messköpfe sind als „Black-Box-System“ anzusehen und können nur indirekt, anhand der Kalibrierung mittels der Kalibriertabletten überprüft werden (vgl. 5.1). Nach dem Auslesen der Daten über das Programm Achat OC werden diese 1:1 in eine Excel-Vorlage kopiert. Da hierbei jeder einzelne Messkopf sowie jede Testserie eindeutige Kennungen haben, ist an dieser Stelle kein Datenverlust und keine falsche Zuordnung zu befürchten. Im Labor der Hydrotox GmbH werden zusätzlich in jeder Serie einzelne Messwerte per Hand ausgelesen, notiert und stichprobenhaft mit dem späteren Ausdruck der Exceltabelle verglichen. Bei der Auswertung der Daten wird grundsätzlich eine schreibgeschützte validierte Excel-Vorlage verwendet. Die Validierung des Programms erfolgt anhand von Beispieldatensätzen, die durch Handrechnungen überprüft wurden. Als Rohdaten werden neben den handgeschriebenen Aufzeichnungen alle Messdaten und Rechenschritte sowie die Programmvalidierung und Messkopfüberprüfung als *Hardcopy* archiviert, um eine spätere Überprüfbarkeit der Ergebnisse jederzeit zu gewährleisten.

6 Schlussfolgerungen

Der Manometrische Respirometer test nach OECD 301 F kann mit dem OxiTop® Control Messsystem unter GLP-Bedingungen durchgeführt werden und dient als einfach durchzuführender Test für die Bewertung der leichten biologischen Abbaubarkeit von Chemikalien. Anders als bei den anderen Abbautests der OECD 301-Reihe benötigt der

Versuch während der gesamten Versuchsdauer keine weitere Betreuung. Dennoch sei darauf hingewiesen, dass die Auswahl geeigneter Abbautests von den Substanzeigenschaften (Wasserlöslichkeit, Flüchtigkeit, Stickstoffanteil, Schaumbildung u.a.), dem gewünschten Endpunkt (DOC, O₂, CO₂) und der Potenz des Inokulums bestimmt wird, so dass auch die übrigen OECD-Tests weiterhin ihre Berechtigung haben.

7 Quellenangaben

BEEK, B.; BÖHLING, S.; FRANKE, C.; JÖHNCKE, U.; STUDINGER, G.; THUMM, E. (2001): The Assessment of Biodegradation and Persistence. In: Biodegradation and Persistence, ed. by B. Beek. The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2, Reactions and Processes, Part K (O. Hutzinger, Editor-in-Chief); p. 291-320; ISBN 3-540-62576-3.

Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen ChemG - Chemikaliengesetz vom 20. Juni 2002. BGBl. Teil I Nr. 40 vom 27.06.2002 S. 2090; zuletzt geändert am 13.5.2004, S. 934

OECD 301 F: Manometric Respirometry Test. Organisation for Economic Co-operation and Development Chemicals Testing - Guidelines. Adopted 17.07.1992

Richtlinie 67/548/EWG des Rates vom 27. Juni 1967 zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe. ABl. Nr. L 196 vom 16.8. 1967 S. 1, letzte Änderung durch 2004/73/EG, ABl. Nr. L 152 vom 30. 4.2004 vom 30.4.2004 S. 1
Bestimmung der Ökotoxizität

92/69 EWG, C.4-D: Manometrischer Respirationstest (Anhang V der 67/548/EWG)

EG-Verordnung Nr. 648/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 31. März 2004 über Detergenzien. Amtsblatt der Europäischen Union L 104, S. 1-35 vom 8.4.2004

8 Anhang

Tab. :1 measurement of oxygen consumption

	test item			Sodium acetate			Blank		
test item [ml/ 164 ml]*	1,64	1,64	1,64						
reference item [mg/ 164 ml]				16,4	16,4	16,4			
ThOD [mg/l]	101,3	101,3	101,3	78,0	78,0	78,0			
day of measurement	oxygen consumption [mg O ₂ /l]								
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	30,9	33,8	36,6	59,1	59,1	56,3	11,3	8,4	8,4
8	53,5	56,3	59,1	76	67,5	70,3	16,9	14,1	14,1
12	67,5	70,3	73,2	84,4	73,2	76	19,7	19,7	19,7
16	73,2	76	73,2	81,6	73,2	73,2	22,5	22,5	16,9
20	81,6	84,4	84,4	90	78,8	78,8	25,3	25,3	25,3
24	87,2	87,2	87,2	92,8	78,8	78,8	28,1	28,1	22,5
28	90	90	90	92,8	78,8	81,6	28,1	30,9	25,3

Tab.2: degradation in % of ThOD

	test item			Sodium acetate		
test item [mg/ 164 ml]	1,64	1,64	1,64			
reference item [mg/ 164 ml]				16,4	16,4	16,4
ThOD [mg/l]	101,3	101,3	101,3	78,0	78,0	78,0
day of measurement	degradation [%]					
0	0	0	0	0	0	0
4	21,3	24,1	26,9	63,8	63,8	60,2
8	38,0	40,7	43,5	78,2	67,3	70,9
12	47,2	49,9	52,8	82,9	68,6	72,2
16	51,9	54,6	51,9	78,2	67,4	67,4
20	55,6	58,3	58,3	82,9	68,6	68,6
24	60,2	60,2	60,2	85,3	67,4	67,4
28	61,1	61,1	61,1	82,9	65,0	68,6

