

TEXTE

19/2014

Weiterentwicklung der UBA-Handlungsempfeh- lung zur ökotoxikologi- schen Charakterisierung von Abfällen

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ, BAU UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungskennzahl 3711 35 301
UBA-FB 001742

Weiterentwicklung der UBA- Handlungsempfehlung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen

von

Dr. Jörg Römbke

ECT Oekotoxikologie GmbH, Flörsheim

Ralf Ketelhut

Stromdesign, Neumünster

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

UMWELTBUNDESAMT

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter <http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/weiterentwicklung-der-uba-handlungsempfehlung-zur> verfügbar.

Die in der Studie geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

ISSN 1862-4804

Durchführung der Studie	ECT Oekotoxikologie GmbH (Koordination) Böttgerstr. 2-14 65439 Flörsheim am Main
Abschlussdatum:	Februar 2013
Herausgeber:	Umweltbundesamt Wörlitzer Platz 1 06844 Dessau-Roßlau Tel.: 0340/2103-0 Telefax: 0340/2103 2285 E-Mail: info@umweltbundesamt.de Internet: http://www.umweltbundesamt.de http://fuer-mensch-und-umwelt.de/
Redaktion:	Fachgebiet III 1.5 Kommunale Abfallwirtschaft, Gefährliche Abfälle, Anlaufstelle Basler Übereinkommen Mareike Walther

Dessau-Roßlau, Februar 2014

Kurzbeschreibung

Aufgabe des Vorhabens war es, die regulatorische Umsetzung des im Europäischen Abfallverzeichnis aufgeführten Gefährlichkeitskriteriums H14 für Abfälle zu spezifizieren. Ausgehend von dem Entwurf der im UBA erarbeiteten „Handlungsempfehlung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen“ (Moser 2008) sowie Erfahrungen aus der Literatur (speziell einem EU-weiten Ringtest und aus dem UBA-25-Abfälle-Programm) wurden vier Arbeitspakete bearbeitet:

1. Zusammenfassung der Kenntnisse zur ökotoxikologischen Untersuchung von Abfällen aus der Literatur, mit dem Ziel der Erstellung praktischer Vorschläge.
2. Erarbeitung konkreter Vorgaben zur Auswertung dieser Tests (z.B. Wirkschwellen) unter Einsatz statistischer Methoden im Hinblick auf die Gewinnung aussagesicherer Messergebnisse, d.h. letztlich Beantwortung der Frage, ab wann ein Abfall als gefährlich einzustufen ist.
3. Erstellung einer überarbeiteten UBA-Handlungsempfehlung in deutscher und englischer Sprache und Vorbereitung der Publikation der jeweiligen Ergebnisse im nationalen und internationalen Rahmen.
4. Erarbeitung von Stellungnahmen für die Expertengruppe der EU-Kommission im Rahmen der Überarbeitung des Europäischen Abfallrechts. Diese Kommentare erfolgten in Kooperation mit den UBA-Kollegen vor allem 2011 und 2012 in Brüssel.

Abstract

It was the aim of this project to provide detailed recommendations for the regulatory application of the hazard criterion HP 14 for wastes as specified in the European List of Wastes. Starting with the UBA-document „Recommendations for the ecotoxicological characterization of wastes“ (Moser 2008) and experiences published in literature (in particular the results of an EU-wide ring test and a recently finished UBA project – the so-called 25-wastes-program) four work packages were performed:

1. Compilation of the knowledge on the ecotoxicological investigation of wastes from literature, trying to extract practical recommendations.
2. Preparation of detailed proposals for the evaluation of the tests (e.g. threshold values) based on statistical methods in order to provide reliable results. They would form the basis for answering the question whether a waste has to be classified as hazardous or not.
3. Formulation of a modified UBA-document in two versions (German, English) and preparation of a publication as contribution to the national and international context.
4. Preparation of comments for the „Expert Group meetings“ of the EU Commission in the context of the revision of the waste policies in the European Union (this work was done together with UBA colleagues mainly in Brussels in 2011/2012).

Berichts - Kennblatt

Berichtsnummer 1. UBA-FB 00	2.	3.
4. Titel des Berichts: Weiterentwicklung der UBA-Handlungsempfehlung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen		
5. Autor(en), Name(n), Vorname(n) Römbke, Jörg; Stoldt, Peter; Wuttke, Joachim; Ketelhut, Ralf	8. Abschlussdatum 28.02.2013	
	9. Veröffentlichungsdatum	
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) ECT Oekotoxikologie GmbH; Böttgerstr. 2-14; 65439 Flörsheim am Main (Koordination)	10. UFOPLAN - Nr.	
	11. Seitenzahl: 174	
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt, Postfach 1406, 06813 Dessau-Roßlau	12. Literaturangaben: 220	
	13. Tabellen / Diagramme: 40	
	14. Abbildungen: 51	
15. Zusätzliche Angaben		
16. Kurzfassung: Aufgabe des Vorhabens war es, die regulatorische Umsetzung des im Europäischen Abfallverzeichnis aufgeführten Gefährlichkeitskriteriums H14 für Abfälle zu spezifizieren. Ausgehend von dem Entwurf der im UBA erarbeiteten „Handlungsempfehlung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen“ (Moser 2008) sowie Erfahrungen aus der Literatur (speziell einem EU-weiten Ringtest und aus dem UBA-25-Abfälle-Programm) wurden vier Arbeitspakete bearbeitet: 1. Zusammenfassung der Kenntnisse zur ökotoxikologischen Untersuchung von Abfällen aus der Literatur, mit dem Ziel der Erstellung praktischer Vorschläge: 1a) Modifikation bzw. Konkretisierung der Vorgaben zur Abfallbehandlung (Probenahme, Lagerung, usw.); 1b) Identifikation einer aquatisch / terrestrischen Testbatterie einschließlich von Vorschlägen zum Einsatz und zum Design dieser Tests in einer Teststrategie (Ablaufschema). 2. Erarbeitung konkreter Vorgaben zur Auswertung dieser Tests (z.B. Wirkschwellen) unter Einsatz statistischer Methoden im Hinblick auf die Gewinnung aussagesicherer Messergebnisse, d.h. letztlich Beantwortung der Frage, ab wann ein Abfall als gefährlich einzustufen ist. Nach intensiven Diskussionen im nationalen wie internationalen Rahmen wurde das ECx-Design als die am besten geeignete Methode zur Beurteilung des ökotoxikologischen Gefährdungspotentials von Abfällen identifiziert. 3. Erstellung einer überarbeiteten UBA-Handlungsempfehlung in deutscher und englischer Sprache und Vorbereitung der Publikation der jeweiligen Ergebnisse im nationalen und internationalen Rahmen. Der Entwurf einer modifizierten Handlungsempfehlung wurde in enger Absprache mit Kollegen aus dem UBA erstellt. Dieser diente zugleich als Grundlage für die Erstellung von mindestens zwei Publikationen zu diesem Thema. 4. Erarbeitung von Stellungnahmen für die Expertengruppe der EU-Kommission im Rahmen der Überarbeitung des Europäischen Abfallrechts. Diese Kommentare erfolgten in Kooperation mit den UBA-Kollegen vor allem 2011 und 2012 in Brüssel. Die ursprünglich geplante Präsentation der Ergebnisse des Vorhabens in einem nationalen Fachgespräch sowie Einarbeitung der dort erzielten Ergebnisse in die finale Fassung der Handlungsempfehlung unterblieb aufgrund der geänderten rechtlichen Vorgaben. Stattdessen wurde ein Positionspapier für die EU-Kommission mit konkreten Vorschlägen zum weiteren Vorgehen bei der ökotoxikologischen Gefährdungsklassifikation von Abfällen erarbeitet.		
17. Schlagwörter Europäische Abfall-Liste, Ökotoxikologie, Gefährdungsklassifikation, HP14, Teststrategie, Empfehlungen zur Probenbehandlung von Abfallproben, Testbatterie, Beurteilungskriterien.		
18. Preis	19.	20.

Report - Data Sheet

1. Report No.: UBA-FB 00	2.	3.
4. Report Title Further development of the UBA recommendations for the ecotoxicological characterisation of wastes		
5. Author(s), Family Name(s), First Name(s) Römbke, Jörg; Stoldt, Peter; Wuttke, Joachim; Ketelhut, Ralf		8. Report Date 28.02.2013
		9. Publication Date
6. Performing Organization (Name, Address) ECT Oekotoxikologie GmbH; Böttgerstr. 2-14; 65439 Flörsheim am Main (Coordination)		10. UFOPLAN – No.
		11. No. of Pages: 174
7. Sponsoring Agency (Name, Address) Umweltbundesamt, Postfach 1406, 06813 Dessau-Roßlau		12. No. of References: 220
		13. Tables / Diagrams: 40
		14. Figures: 51
15. Supplementary Notes		
16. Abstract It was the aim of this project to provide detailed recommendations for the regulatory application of the hazard criterion HP 14 for wastes as specified in the European List of Wastes. Starting with the UBA-document „Recommendations for the ecotoxicological characterization of wastes“ (Moser 2008) and experiences published in literature (in particular the results of an EU-wide ring test and a recently finished UBA project – the so-called 25-wastes-program) four work packages were performed: 1. Compilation of the knowledge on the ecotoxicological investigation of wastes from literature, trying to extract practical recommendations: 1a) Modification and firm establishment of specifications for the treatment of wastes (sampling, storage etc.); 1b) Identification of an aquatic / terrestrial battery of ecotoxicological tests, including proposals for their use and design of these tests as part of a testing strategy (flow chart). 2. Preparation of detailed proposals for the evaluation of the tests (e.g. threshold values) based on statistical methods in order to provide reliable results. They would form the basis for answering the question whether a waste has to be classified as hazardous or not. After an intensive (national and international) discussion the ECx-design was identified as the most suitable method for the evaluation of the ecotoxicological hazard potential of wastes. 3. Formulation of a modified UBA-document in two versions (German, English) and preparation of a publication as contribution to the national and international context. The modified UBA-document was prepared in close contact with UBA colleagues. At the same time, it will form the basis for at least two publications. 4. Preparation of comments for the „Expert Group meetings“ of the EU Commission in the context of the revision of the waste policies in the European Union (this work was done together with UBA colleagues mainly in Brussels in 2011/2012). The presentation of our results at a national workshop (including the incorporation of the results of this conference in the modified UBA-document) was cancelled due to the changed legal context. In contrast a position paper for the European Union was written, containing detailed recommendations on how to proceed in the area of the ecotoxicological hazard classification of wastes.		
17. Key Words: European Waste List, Ecotoxicology, Hazard classification, HP14, Testing concept, Recommendations of waste sample treatment, Assessment criteria.		
18. Charge	19.	20.

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Ziel der Arbeiten</i>	13
2.	<i>Kurzdarstellungen der fünf Berichtsteile</i>	14
2.1	Handlungsempfehlung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen	14
2.2	Recommendations for the Ecotoxicological Characterization of Wastes.....	15
2.3	Scientific Position Paper for the European Commission: Ecotoxicological Classification of Wastes (Criterion HP 14).....	17
2.4	Literature review on the current knowledge of the ecotoxicological testing of waste (including an overview on the current legislation of the classification of waste regarding their ecotoxicity (HP14))	19
2.5	Statistische Auswertung der ökotoxikologischen Tests nach HP14	21
3.	<i>Zusammenfassung des Gesamtvorhabens</i>	24
4.	<i>Literatur / References:</i>	25
	<i>Appendix 1: Handlungsempfehlung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen</i>	27
1.	<i>Einleitung</i>	30
2.	<i>Anwendungsbereich</i>	30
3.	<i>Gesetzlicher Hintergrund</i>	31
4.	<i>Wissenschaftliche Grundlagen</i>	32
5.	<i>Anmerkungen zur Methode</i>	33
5.1	Begriffe	33
5.1.1	Effektkonzentration (EC).....	33
5.1.2	Grenzkonzentration	34
5.1.3	Testdesign	34
5.2	Methodische Besonderheiten bei der Abfalltestung	34
5.2.1	Einführung	34
5.2.2	Probenahme und Probenkonservierung	35
5.2.3	Probentransport und -lagerung.....	36
5.2.4	Probenvorbehandlung	37
5.2.5	Herstellung von Abfalleluaten	37
5.2.6	Lagerung von Abfalleluaten	38
5.2.7	pH-Werte der Abfalleluate	39
5.2.8	Kontrollmedium.....	39

6	<i>Teststrategien</i>	40
6.1	Identifikation umweltgefährlicher Abfälle in Spiegeleinträgen der Abfallverzeichnisverordnung	40
6.1.1	Allgemein	40
6.1.2	Teststrategie	42
6.1.3	Auswahl der Testverfahren	42
6.1.4	Bewertung der Testergebnisse	43
6.2	Detaillierte ökotoxikologische Charakterisierung von Abfällen	44
6.2.1	Generelle Maßnahmen	44
6.2.2	Auswahl der Testverfahren	45
6.2.3	Bewertung der Ergebnisse	45
7	<i>Ökotoxikologische Charakterisierung im Rahmen einer Risikobewertung von Abfallentsorgungsszenarien</i>	46
7.1	Allgemein	46
7.2	Teststrategie	46
7.3	Auswahl der Testverfahren	48
7.4	Bewertung der Testergebnisse	48
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	49
8.1	Richtlinien	49
8.2	Publikationen	51
	<i>Anhang A: Sieblinie</i>	52
	<i>Appendix 2: Recommendations for the Ecotoxicological Characterization of Wastes</i>	53
1	<i>Introduction</i>	56
2	<i>Scope of application</i>	56
3	<i>Legal background</i>	57
4	<i>Scientific background</i>	58
5	<i>Methodology</i>	59
5.1	Terms	59
5.1.1	Effect concentration (EC)	59
5.1.2	Limit concentration	59
5.1.3	Test design	59
5.2	Methodological requirements for the testing of waste	60
5.2.1	Sampling and sample preservation	60
5.2.1	Sampling and sample preservation	61

5.2.2	Transport and storage of samples.....	62
5.2.3	Pretreatment of samples.....	62
5.2.4	Preparation of waste eluates	63
5.2.5	Storage of waste eluates	64
5.2.6	pH of waste eluates.....	64
5.2.7	Control medium.....	64
6	<i>Test strategies.....</i>	64
6.1.	Identification of ecotoxicological wastes in mirror entries in the Waste List Ordinance.....	65
6.1.1	General	65
6.1.2	Test strategy	66
6.1.3	Selection of test methods.....	67
6.1.4	Evaluation of test results.....	68
6.2	Detailed ecotoxicological characterisation of waste.....	68
6.2.1	General approach.....	68
6.2.2	Selection of test methods.....	70
6.2.3	Evaluation of test results.....	70
7	<i>Ecotoxicological characterisation for assessing the risks of waste management scenarios.....</i>	71
7.1	General	71
7.2	Test strategy	71
7.3	Selection of test methods.....	73
7.4	Evaluation of test results.....	74
8	<i>References.....</i>	75
8.1	Guidelines	75
8.2	Publications	77
	<i>Annex A: Sieve analysis.....</i>	78
	<i>Appendix 3: Scientific Position Paper.....</i>	79
1.	<i>Brief history: Ecotoxicological testing of wastes.....</i>	81
2.	<i>Current discussion on how to proceed in the area of waste ecotoxicity.....</i>	82
3.	<i>Scientific recommendations concerning the HP14 classification of wastes.....</i>	84
4.	<i>References.....</i>	86

<i>Appendix 4: Literature review on the current knowledge of the ecotoxicological testing of waste (including an overview on the current legislation of the classification of waste regarding their ecotoxicity (HP14))</i>	89
<i>Abstract</i>	90
<i>1 Introduction</i>	93
1.1 Background	93
1.2 Aims of this review.....	94
<i>2 Legal Situation of Waste in Context of Classification Legislations</i>	95
2.1 CLP Regulation	96
2.1.1 Classification of substances.....	96
2.1.2 Classification of mixtures	99
2.2 Implications of the CLP Regulation to the Waste Management and Future Developments of Legislative Measures.....	101
2.3 ABANDA – A German approach to Classify on Experience and Comparison	103
2.4 Current Status of the Discussion and Outlook	104
<i>3 Overview of the Analyzed Literature</i>	104
3.1 Types of Publications	104
3.2 Data of the Analyzed Literature	105
<i>4 Results of the Literature Survey</i>	105
4.1 Characterisation of the Waste Samples Published	105
4.2 Treatment and Preparation of Test Solutions and Solid Wastes.....	110
4.3 Analytics	110
4.3.1 Physico-chemical properties	110
4.3.2 Residue analytics.....	110
4.3.3 Chemical Analysis and the Classification of Waste.....	111
4.4 Test Protocols	112
4.5 Test Organisms	113
4.6 Endpoints and Sensitivity.....	115
4.7 Test Batteries	117
4.8 Ecotoxicological Effects of Physicochemical Properties	119
4.8.1 Effects Related to Physical Appearance and Origin	119
4.8.2 Effects of pH, Salt and Organic Matter	119
4.9 Heavy Metals and Toxic Effects.....	120

4.10 PAH contamination and Toxic Effects.....	120
5 Conclusion and Recommendations.....	121
Acknowledgements.....	122
6 References.....	123
Appendix 5: Statistische Auswertung der ökotoxikologischen Tests nach HP14.....	129
1 Zusammenfassung.....	131
2 Einleitung, Hintergrund und Vorgehensweise.....	135
2.1 Untersuchte Tests und Herkunft der ausgewerteten Daten.....	136
2.2 Probenahme und Probenvorbehandlung	136
2.3 Abbildung von Messwerten	137
2.4 Bedeutung der Probenaufbereitung.....	138
2.5 Aussagesichere Messung.....	139
3 Daphnientest.....	144
3.1 Ergebnisse	144
3.2 Beurteilung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung.....	145
3.3 Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen.....	147
4 Algentest.....	149
4.1 Ergebnisse	149
4.2 Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung.....	151
4.3 Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen.....	152
5 Bakterienkontakttest.....	153
5.1 Ergebnisse	153
5.2 Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung.....	155
5.3 Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen.....	157
6 Pflanzenwachstumstest	158
6.1 Ergebnisse	158
6.2 Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung.....	160
6.3 Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen.....	161
7 Regenwurmfluchttest.....	163
7.1 Ergebnisse	163

7.2	Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung.....	163
7.3	Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen.....	164
8	<i>Schlussfolgerungen und Empfehlungen</i>	166
9	<i>Literatur</i>	167

1. Ziel der Arbeiten

Im Rahmen dieses Vorhaben wurden folgende Teilaspekte bearbeitet:

- a) Zusammenfassung der bisherigen Kenntnisse zur ökotoxikologischen Untersuchung von Abfällen aus der Literatur und darauf aufbauend die Identifikation von:
 - Zusammensetzung einer Testbatterie (aquatisch/terrestrisch), einschließlich eines Ablaufschemas sowie des Testdesigns (Limittest?);
 - Grenzkonzentrationen (G-Werte (= Verdünnungsstufen) oder „Effect concentrations“ (ECx-Werte): d.h. ab wann ist ein Abfall als gefährlich einzustufen.
- b) Überprüfung der testspezifischen Wirkschwellen unter Einsatz statistischer Methoden im Hinblick auf die Gewinnung aussagesicherer Messergebnisse;
- c) Überarbeitung und Ergänzung der UBA-Handlungsempfehlung in deutscher und englischer Sprache und Ausarbeitung von Teilaspekten zur Publikation im nationalen und internationalen Rahmen.
- d) Erarbeitung von Stellungnahmen für die Expertengruppen der EU im Rahmen der Überarbeitung des Europäischen Abfallrechts.

Die in der ursprünglichen Ausgestaltung des Vorhaben vorgesehene Beteiligung der Fachöffentlichkeit wurde zugunsten der Stellungnahmen für die EU-KOM zurückgestellt, da die im Umweltbundesamt und bei den Auftragnehmern vorliegenden Erkenntnisse für die Novellierung des Europäischen Abfallverzeichnis in aufbereiteter Form zur Verfügung gestellt werden sollten.

In diesem Bericht werden alle fünf Punkte in folgender Reihenfolge aufgeführt:

1. Handlungsempfehlung in deutscher Sprache;
2. Handlungsempfehlung in englischer Sprache;
3. Positionspapier für die EU-Kommission;
4. Literaturübersicht zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen;
5. Statistische Detailauswertung durchgeführter Testverfahren.

Jedes der fünf Dokumente ist dabei ein in sich geschlossener Text, der auch ohne Kenntnis der anderen Abschnitte verständlich ist. Die hier dargestellten Ergebnisse des Vorhabens, speziell die Literaturübersicht, Vorschläge zum weiteren Vorgehen und die statistische Detailauswertung, sollen neben der Verwendung im regulatorischen Kontext auch in der wissenschaftlichen Literatur zur Diskussion gestellt werden. Im Folgenden werden die fünf Teile in Kurzzusammenfassungen dargestellt. Die ausführlichen Dokumente sind, jedes für sich, in gleicher Reihenfolge als Anhang beigelegt.

2. Kurzdarstellungen der fünf Berichtsteile

2.1 Handlungsempfehlung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen

Joachim Wuttke, Jörg Römbke & Ralf Ketelhut

Die vorliegende Handlungsempfehlung basiert auf einem Entwurf aus dem Jahr 2008, der wiederum auf den Erfahrungen eines internationalen Ringversuchs zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen (Moser & Römbke 2009) beruhte. Seitdem wurden die Ergebnisse mittels einer Vielzahl von (allerdings kaum publizierten) kommerziellen Abfalltests sowie in einer breit angelegten Studie des Umweltbundesamts, in der 25 Abfälle in Spiegeleinträgen getestet wurden, ausgewertet (vgl. Kapitel 2.5; Römbke et al. 2010). Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse wurde beschlossen, eine aktualisierte Fassung der Handlungsempfehlung zu erstellen. Die grundlegenden Annahmen zur Klassifikation von Abfällen hinsichtlich ihres ökotoxikologischen Gefährdungspotentials haben sich seitdem nicht geändert, sondern wurden im Gegenteil noch bestärkt.

Demnach sollte die ökotoxikologische Charakterisierung von Abfällen durch eine Kombination chemischer und biologischer Untersuchungsmethoden erfolgen, da sich die Gefährlichkeit von Abfällen durch einen Vergleich chemischer Analysenwerte mit bestehenden Schwellenwerten nicht ausreichend belegen lässt. Eine Beurteilung der Umweltgefährlichkeit von Abfällen ist nur mit Hilfe biologischer Testverfahren möglich, da nur diese die Wirkungen aller bioverfügbaren Kontaminanten (einschließlich deren möglicher Wechselwirkungen sowie analytisch nicht erfassbarer Abfallschadstoffe) abbilden können. Die Auswertung der vorliegenden Tests von mehr als 350 Abfallproben hat gezeigt, dass biologische Testverfahren auch für heterogene Abfallgemische gut reproduzierbare Ergebnisse liefern. Es besteht daher Anlass zu der Vermutung, dass über die Wirkung einzelner Kontaminanten hinaus auch Matrixeffekte abgebildet werden können, die mit chemisch-analytischen Methoden nicht erkannt werden.

Ziel dieser Handlungsempfehlung ist es, die ökotoxikologische Untersuchung von Abfällen anwendungsorientiert auf eine belastbare methodische Grundlage zu stellen, die eine Vergleichbarkeit von Untersuchungsergebnissen ermöglicht. Sie ist als Handreichung für Abfalleinstufer und Vollzugsbehörden gedacht, daher wird nicht auf wissenschaftliche Details der Vorgehensweise eingegangen, sondern es werden lediglich die wesentlichen Eckpunkte erläutert und auf die einschlägigen Richtlinien verwiesen. Ergebnisse der zu Grund liegenden Studien sowie der Durchführung und Auswertung ökotoxikologischer Studien mit Abfällen sind den Anhängen dieses Dokuments zu entnehmen.

Primär enthält diese Handlungsempfehlung Angaben zur Planung, Durchführung und Auswertung von ökotoxikologischen Tests im Rahmen der Identifikation umweltgefährlicher Abfälle in Spiegeleinträgen der Abfallverzeichnisverordnung anhand des Kriteriums HP14 („Ecotoxicity“). Zudem werden kurz die grundlegenden Prinzipien einer ökotoxikologischen Basischarakterisierung von Abfällen sowie der ökotoxikologischen Charakterisierung im Rahmen einer Risikobewertung von Abfallentsorgungsszenarien vorgestellt. Im Gegensatz zur ersten Version (Moser 2008), in der ein Limittest-Design für die HP14-Klassifikation von Abfällen propagiert wurde, wird auf der Grundlage der seitdem gemachten Erfahrungen sowie in Hinsicht auf eine Vereinheitlichung im europäischen Rahmen (speziell Frankreichs) ein ECx-

Design vorgeschlagen. Dadurch erhöht sich der Aufwand (statt drei sind nun im Allgemeinen fünf Verdünnungsstufen zu testen), doch zugleich auch die Aussagesicherheit. Eine deutliche Ausweitung und Konkretisierung der methodischen Empfehlungen erfolgte in Bezug auf Probenahme und Probenkonservierung, Probentransport und -lagerung sowie die Probenvorbehandlung. Insbesondere hat sich herausgestellt, dass die Herstellung und Lagerung der aus den Abfallproben hergestellten Eluate einen maßgeblichen Einfluss auf die Testergebnisse hat, wahrscheinlich aufgrund von Veränderungen der Verfügbarkeit der in den Abfällen enthaltenen Schadstoffe. Auf diesem Gebiet besteht für viele bisher kaum bearbeitete Abfalltypen noch Forschungsbedarf.

Als Teststrategie wird der Vorschlag von Pandard & Römbke (2013) empfohlen (siehe Kap. 2.3 dieses Dokuments). Auch hinsichtlich der aufgeführten Standardtestverfahren gibt es keine großen Änderungen. Konsequenterweise wird auf eine Batterie von jeweils drei aquatischen und terrestrischen Tests gesetzt, in der jeweils eine Spezies aus den taxonomischen Gruppen der Bakterien, der Pflanzen sowie der Invertebraten stammt. Ökologisch liegt der Schwerpunkt dabei auf den Primärproduzenten (Algen, höhere Pflanzen) sowie den herbivoren (Daphnien) bzw. saprophagen (Regenwürmer) Invertebraten plus je einer Bakterienart. Dazu kommt noch bei entsprechenden Hinweisen ein Test auf Genotoxizität. Diese Testbatterie unterscheidet sich kaum von derjenigen, die schon im EU-weiten Ringtest als „Standardbatterie“ vorgeschlagen wurde (Moser & Römbke 2009). Allerdings ist jetzt die Auswertung und Beurteilung der Testergebnisse aufgrund der gleichen Anzahl aquatischer und terrestrischer Tests einfacher und besser vergleichbar geworden. Die anderen beiden Anwendungsgebiete unterscheiden sich nur wenig von diesem Vorschlag. Als Beurteilungskriterium wird für alle Tests eine Grenzkonzentration von <10% Testsubstrat vorgeschlagen.

2.2 Recommendations for the Ecotoxicological Characterization of Wastes

Joachim Wuttke, Jörg Römbke & Ralf Ketelhut

This Recommendation is based on a draft version published in 2008 which in turn refers to the experiences gained in an international inter-laboratory ring test on the ecotoxicological characterization of wastes (Moser & Römbke 2009). Since then, the results of a large number of tests with wastes were evaluated. These studies were partly performed commercially (but usually not published), partly they were conducted by the German Federal Environment Agency in a project focusing on a large number of wastes in mirror entries (Römbke et al. 2010). Basing on these new insights it was decided to prepare an actual version of the Recommendation. The basic assumptions for the classification of wastes according to their ecotoxicological hazard potential did not change in the meantime but in fact have been proven.

Basically, a combination of chemical and biological test methods should be used for the ecotoxicological characterization of wastes, since a comparison of the results of chemical analyses with existing threshold values is insufficient for the derivation of the hazards posed by waste. Instead, an evaluation of the environmental hazards of waste is only possible by the use of biological test methods, as only these can mirror the effects of all bioavailable contaminants including their potential interactions as well as pollutants in waste which cannot be determined by chemical analysis. The analysis of available tests of more than 350 waste samples showed that biological test methods produce well repeatable results for heterogeneous waste composites. Thus, there is reason to assume, that not only effects of single contaminants,

but also matrix effects, which are undetectable by chemical analysis, could be detected in biological tests.

Goal of this recommendation is to support a reliable method base for the application-orientated ecotoxicological analysis of wastes, which facilitates the comparability of test results. For this reason, this Recommendation focusses on explaining the main outline and giving references to the necessary guidelines instead of going into detail about procedures e.g. to be used by waste authorities. Supplementary information, mainly the results of the most important studies with wastes, is given in the Annexes of this document. In particular, this Recommendation contains details for the planning, performance and data evaluation of ecotoxicological tests performed in the context of their identification as hazardous in mirror entries of the European Waste List according to the criterion HP14 ("Ecotoxicity"). In addition, basic principles of the ecotoxicological characterization of wastes as well as their ecotoxicological characterization as part of the risk assessment of waste disposal scenarios are presented.

In previous years, as proposed in the first version of this guidance (Moser 2008), extended limit tests have been used for the classification of wastes. Referring to the experiences made since then, the utilization of a more elaborated design (ECx) is recommended. Utilizing an EC50 design helps to harmonize different law sectors (environmental risk assessment of chemicals, in particular pesticides, follows the same approach) and practices of waste testing in other European countries. France, for example, prefers the ECx-design. Due to this change the efforts conducting tests increases (i.e. instead of three at least five dilution steps have to be used), but at the same time the robustness of the evaluation of the test results increases considerably.

In this document, recommendations concerning sampling and sample preservation, transport and storage of samples as well as the pre-treatment of samples have been described in much more detail. This is in particular true for the preparation and the storage of waste eluates since these steps can drastically influence the test results, probably because of changes in the bioavailability of contaminants occurring in the waste samples. However, research is needed in order to handle those waste types adequately which have not been tested so far.

The most appropriate test strategy was proposed by Pandard & Römbke (2013), which is described in detail in Chapter 2.3 of this document (in particular see the flow chart there). In addition, there are no big modifications regarding the recommendable standard test methods. Consequently, a battery consisting of three aquatic and three terrestrial tests should be used. For each compartment, one species out of the following taxonomic groups has been selected: Bacteria, plants and invertebrates. Ecologically speaking, the focus is on primary producers (Algae, higher plants) as well as on herbivore (Daphnia) or saprophagous (earthworms) invertebrates in addition to two species of Bacteria. In case of specific hints the genotoxicity of the eluate has also be tested. This test battery is very similar to the „standard battery“ which has already been used in the EU-wide ring test. However, the evaluation and data assessment has been improved due to the fact that now the same number of tests are performed for eluates and solid wastes. The other two areas in which ecotoxicological test methods can be used (basic characterization of wastes as well as the risk assessment of wastes applied in the environment. A limit concentration of $\leq 10\%$ test-substrate is proposed to be used as evaluation criterion (Pandard & Römbke 2013).

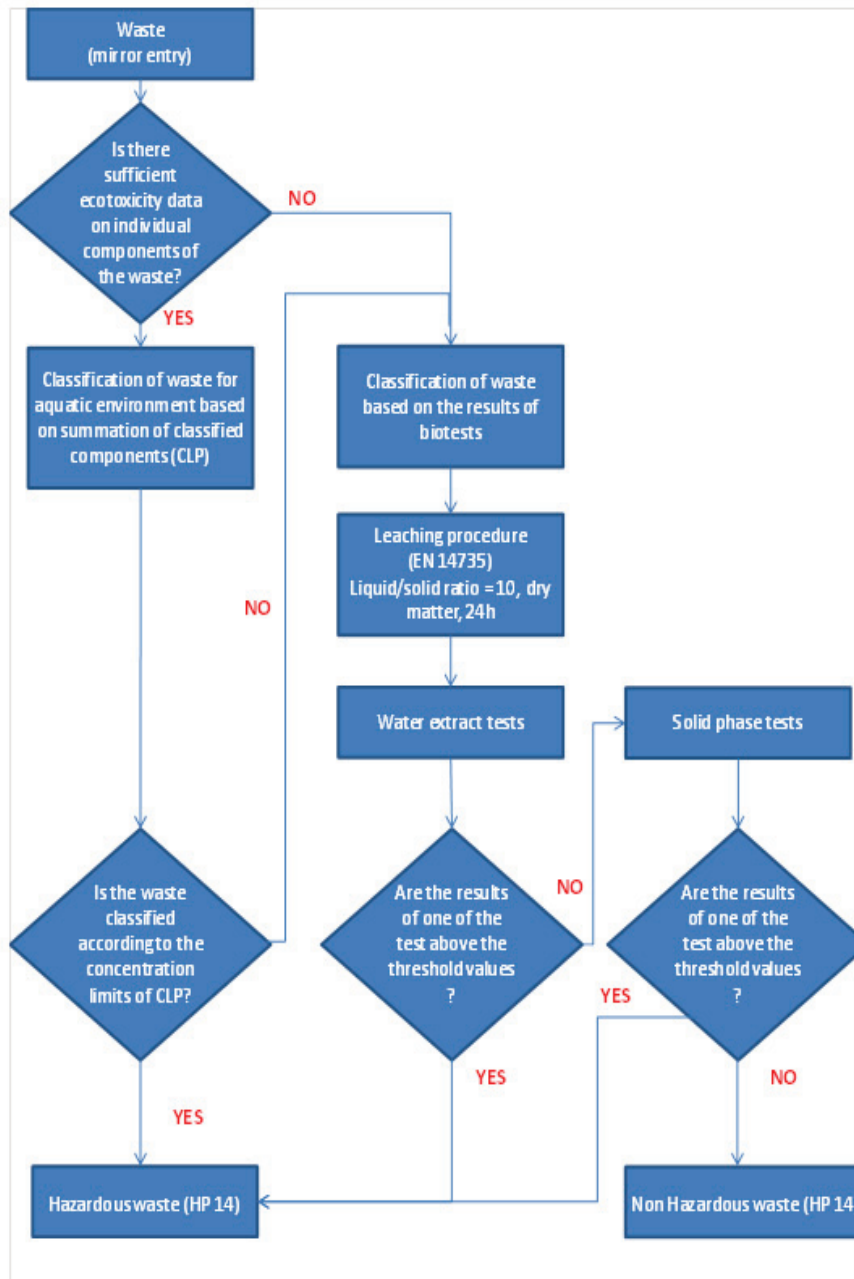
2.3 Scientific Position Paper for the European Commission: Ecotoxicological Classification of Wastes (Criterion HP 14)

Jörg Römbke, Ralf Ketelhut & Joachim Wuttke

In Europe, the decision whether waste is hazardous or not is based on 15 properties, among them the HP14 property (“ecotoxic”: waste which presents or may present immediate or delayed risks for one or more sectors of the environment). This document describes a strategy for assessing the HP 14 property, which is based on a combination of two approaches: the summation of classified compounds in the waste carried out according to the CLP regulation and the usage of the results of biotests performed on waste eluates and solid wastes. The proposal is based mainly on recommendations of an European ring test performed in 2007 (Moser & Römbke 2009), the work carried out in the CEN/TC 292/WG 7 standardization working group (especially CEN 14735 (2005)) and the results of various research projects regarding the ecotoxicological characterization of waste performed mainly in France and Germany. Furthermore, a battery of tests (three using waste eluates, and three using solid waste samples, plus, under certain conditions, a genotoxicity test (ISO 2000; 2012e) is recommended for the ecotoxicological testing of wastes.

Test	Endpoints	Duration	Standard
Luminescent bacteria test (<i>Vibrio fischeri</i>)	Inhibition of light emission	30 min	ISO 2007a
Freshwater algal test (<i>Desmodesmus subspicatus</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	Inhibition of population growth	72 h	ISO 2012a
Acute crustacean test (<i>Daphnia magna</i>)	Inhibition of mobility	48 h	ISO 2012b
Bacteria Soil contact test (<i>Arthrobacter globiformis</i>)	Inhibition of enzyme activity	6 h	ISO 2012c
Test with higher plants (<i>Brassica napus</i>)	Inhibition of growth	14 d	ISO 2012d
Short term test with the earthworm <i>Eisenia andrei/fetida</i>	Avoidance behaviour	48 h	ISO 2007b

Examples are provided showing that using this approach a distinction between hazardous and non-hazardous wastes is possible, independently which type of threshold values is used (currently, both Effect Concentrations (EC) or Lowest Inhibition Dilutions (LID) values have successfully been employed). However, it is proposed to assess the hazard potential of wastes in tests using an ECx design (see also Chapter 2.5). It is proposed to consider the combined approach (see below) when defining the legal requirements for the ecotoxicological classification of wastes.



However, there are still some issues needing further research (e.g. as a LIFE+ proposal):

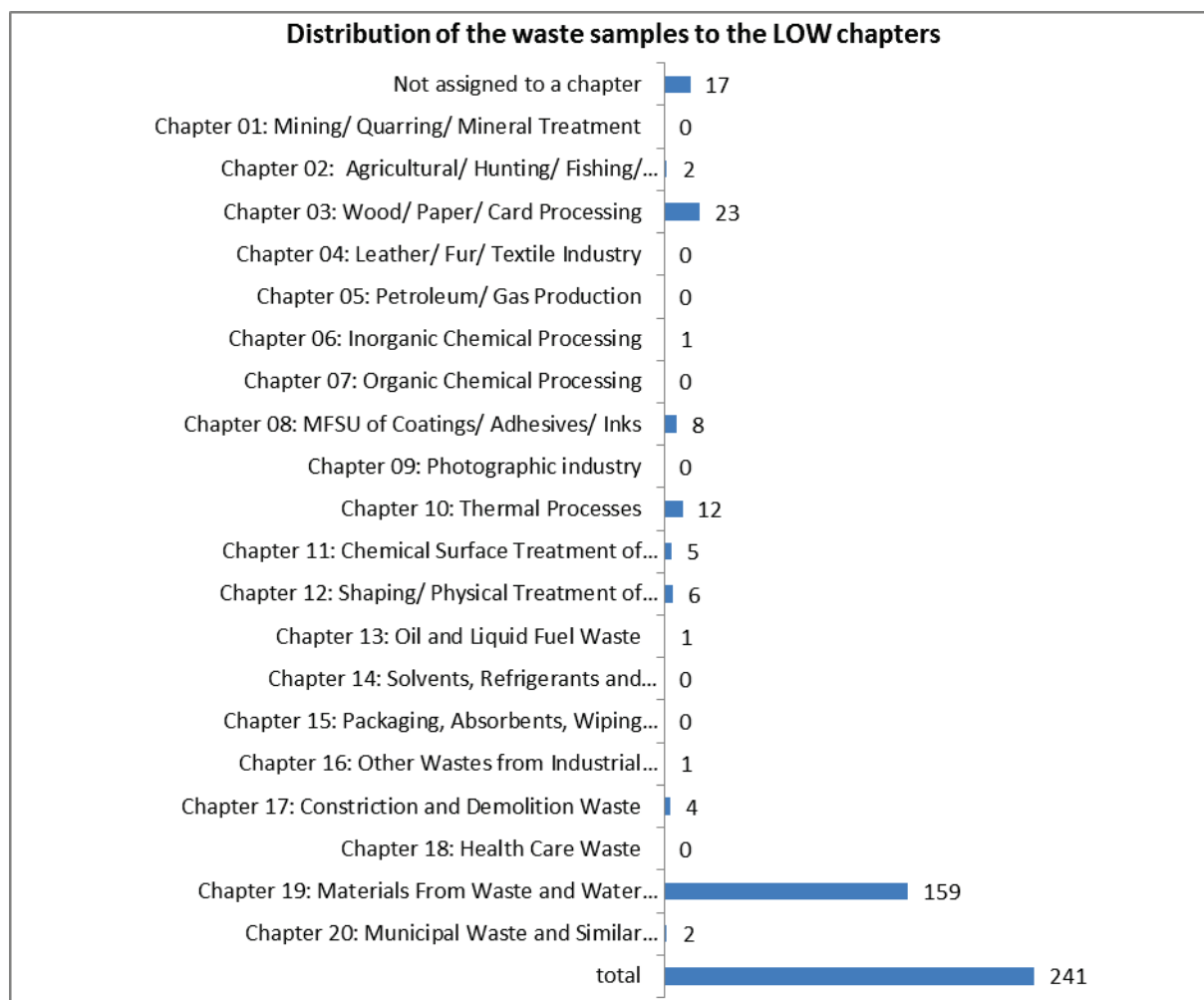
- Coverage of a wide range of wastes with their very differing properties;
- Improvement of existing guidelines and guidance papers on the sampling, sample preparation and storage of waste samples (especially when preparing heterogeneous waste mixtures of larger grain sizes);
- Performance of the tests of the proposed test battery;
- Identify the ecological and economic benefits when applying the improved HP14 classification strategy as described in this contribution.

2.4 Literature review on the current knowledge of the ecotoxicological testing of waste (including an overview on the current legislation of the classification of waste regarding their ecotoxicity (HP14))

Peter Stoldt & Jörg Römbke

The aim of this work was to compile the current knowledge on the ecotoxicological hazard classification of wastes. In order to reach this goal a literature review was performed. Starting with some extended papers published in the last ten years (e.g. Kostka-Rick 2004; Pandard et al. 2006; Moser & Römbke 2009) individual reports, thesis and peer-reviewed papers covering ecotoxicological test data (including, if available, residue analysis) on different waste types and landfill leachates were evaluated. However, due to the clear dependency between the performance of ecotoxicological studies and legal requirements the review starts with an overview on existing directives of the European Union covering the classification of wastes (mainly the Waste Framework Directive and the European Waste List (EC 2000; EC 2008a)). So far, clear criteria for the assignment of the hazard class “HP14 ecotoxic” are lacking. Therefore, future legal requirements are discussed, arising partly due to the introduction of the CLP Regulation (originally defined for chemicals in the context of REACH). Some of the current proposals for revising the European Waste List and the Waste Framework Directive (OEKOPOL 2008), tend to focus only on the legislation on chemicals and recommend to apply the CLP rules for mixtures (Regulation (EC) No 1272/2008 (EC 2008b)) for classifying wastes as ecotoxic. Although this regulation excludes wastes from its scope, this approach can be regarded as relevant for mixtures with a limited number of constituents. For complex mixtures of only partly known composition (a common situation for wastes) it is much more difficult to implement. In this latter case, the performance of ecotoxicity tests on waste is generally considered as the most relevant approach because it allows integrating the effects of all contaminants including additive, synergistic and antagonistic effects. However, no further details about the status of the legislative progress are known to the authors.

Regarding ecotoxicological testing only 54 publications (peer-reviewed papers, agency reports or university thesis) were identified as being relevant for this review. After excluding some papers for reasons like doubled data sets, 29 publications covering 242 waste samples were chosen for a detailed analysis. They are very unevenly distributed among the 20 classes of the European List of Wastes (see next figure): 67% belong to Class 19 (Material from Waste and Water Treatments), while eight classes were never tested.



Unfortunately, in many of these studies no or insufficient descriptions on the sampling, storage or treatment of the wastes are given. This is especially evident when it comes to the documentation of the preparation and handling of eluates, a very crucial step. In addition, often data on the physico-chemical properties as well as the content of potential toxic substances of the waste samples is lacking. In detail, the literature was searched for:

- Information on the physical and chemical characterization of the waste samples;
- Test protocols, organism, endpoints, and test batteries;
- Effects on organisms, caused by waste properties (e.g. pH), or concentrations of chemicals, in particular heavy metals, and PAHs (other organic chemicals were either not present or were not reported).

Because of the extreme heterogeneity of the provided information the conclusions from this analysis are very general. Protocols: Out of 54 studies, 50% were performed to ISO and 20% according to OECD guidelines (plus 10% Toxkits). Preparation of test solutions: Eluate preparation was rarely described in detail, but ca. 50% of all studies listed a guideline. Residue analysis (incl. physico-chemical properties): Often not reported; few data on salts or organic matter are available. Test species: Always listed, mostly standard species.

Regarding the toxicity of individual contaminants it can be stated that heavy metals are the best studied chemical group in waste testing. In particular, cadmium, copper, mercury (partly

zinc) were most often reported as being toxic. Rarely, clear relationships between the observed toxicity and the concentrations of metals did occur; i.e. there was no correlation (e.g. Römbke et al. 2009). However, there are strong indications of the influence of abiotic conditions on the toxicity of (some) metals (e.g. pH). It became clear that information on other metals than Cd, Cu and Hg is lacking; as well as their interaction with other stressors. Among organic chemicals, PAHs are the best studied group. Unfortunately, while toxicity of all PAHs together is several times stated it is difficult to link these effects with single PAHs since many studies report only the total PAH content. Again, as in the case of metals, there is no direct correlation between effects and exposure (e.g. Baun et al. 2004). In all tests there is a clear tendency showing that acute endpoints are (much) less sensitive than chronic parameters (a good example is the SOI sample in the EU ringtest (Moser & Römbke 2009). One issue not addressed so far is the bioaccumulation of chemicals by organisms.

Conclusion:

With regard to the special conditions of waste, preferably the concentration, distribution and environmental fate of the substances contained in the waste, should be known. However, in (almost) all cases the chemical mixture of a waste sample is so complex that it is impossible to have this information quantitatively. Therefore, the performance of aquatic and terrestrial ecotoxicological tests following an ECx design is the appropriate approach for the hazard classification of wastes. When doing so, it is common sense, to choose species for ecotoxicological tests differing in their ecology, taxonomy, morphology and exposure. In addition, it is necessary to cover acute but mainly chronic endpoints. More emphasis should be given to robust guidance on sampling, storage and pre-treatment of waste samples used in ecotoxicological tests.

2.5 Statistische Auswertung der ökotoxikologischen Tests nach HP14

Ralf Ketelhut

Im Rahmen der Weiterentwicklung der UBA-Handlungsempfehlung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen sind Primärdaten ökotoxikologischen Untersuchungen von Abfallgemischen aus dem Zeitraum 2008 bis 2011 einer vergleichenden Evaluation unterzogen worden. Im Einzelnen sind folgende Untersuchungen betrachtet worden:

Test	Untersuchte Abfallproben	Vorliegende Einzeltests
Daphnientest ISO 6341 (1996)	113	433
Algentest ISO 8692 (2004a)	92	264
Bakterien-Kontakttest ISO/CD 18187 (2008)	55	1.196
Pflanzenwachstumtest ISO 11269-2 (2004)	57	1.920
Regenwurmfluchttest ISO 17512-1 (2007)	44	431

Die Untersuchung beinhaltet die statistische Evaluation sämtlicher verfügbarer Primärdaten der durchgeführten Kontrollanalysen wie auch der Messproben, wie auch die vergleichende Prüfung und Auswertung der in den Testsystemen angewandten Verfahren zur Messung und Ergebnisdarstellung ökotoxikologischer Untersuchungen. Auch für Abfallproben zur ökotoxikologischen Untersuchung gilt, dass die Qualität und Aussagekraft des Messergebnisses

maßgeblich von der Repräsentativität der Probe auf dem Weg von der Grundgesamtheit zur Analysenprobe abhängt. Um Bewertungen von Abfällen gegenüber einem Grenzwert vorzunehmen, kann der Vertrauensbereich eines Messwertes zuweilen von höherer Bedeutung sein als der Messwert selbst, denn die Varianz des Messwertes bestimmt seine Aussagesicherheit. Messwerte werden idealer Weise in Form von Verteilungen für Wahrscheinlichkeitsdichte und Summenhäufigkeit dargestellt. Beide visualisieren den Vertrauensbereich und damit nicht nur die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Wert zu messen (Dichte) sondern auch die Aussagesicherheit gegenüber einem beliebigen Wert auf der x-Achse.

Das wesentliche Ziel ökotoxikologischer Untersuchungen ist es, aufzuzeigen, dass mit Prüfmedien versetzte Proben ein gegenüber Kontrollproben signifikant abweichendes Wirkungsspektrum aufweisen. Daher werden Wirkschwellen definiert, bei deren Überschreitung die eingesetzte Prüfkonzentration als wirksam bezeichnet wird. Leider wird dabei bis dato in der Regel mit Mittelwerten gearbeitet, ohne deren Vertrauensbereiche anzugeben. Dabei bietet die Ökotoxikologie mit ihren routinemäßig durchgeführten Mehrfachuntersuchungen ideale Voraussetzungen für eine statistische Absicherung, die bei vergleichbaren chemisch-analytischen Untersuchungen im Normalfall nicht gegeben sind.

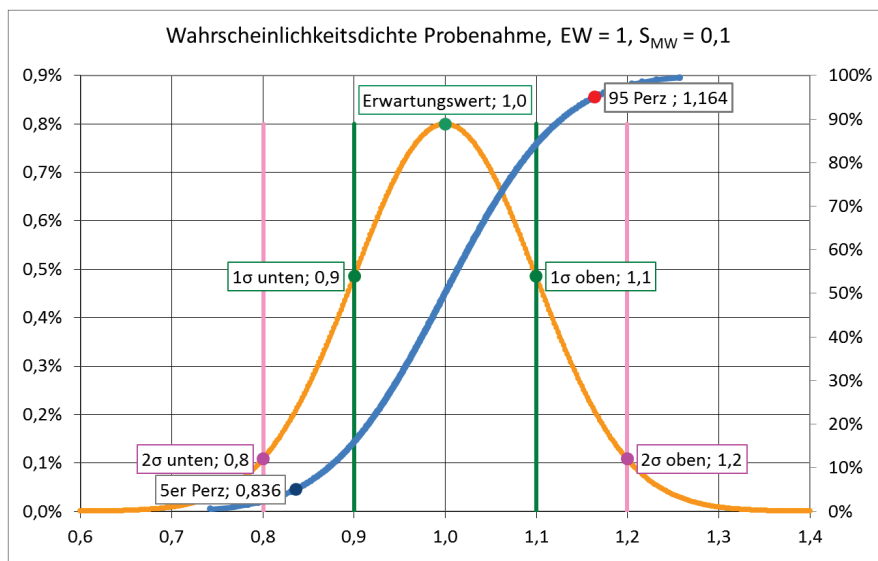


Abbildung 1: Abbildung eines normalverteilten Messwertes als Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung (gelb) und Summenhäufigkeitsverteilung (blau)

Die Primärdaten sämtlicher verfügbaren Untersuchungen sind daher mit der Zielsetzung, eine 95%iger Aussagesicherheit für die Feststellung von Wirkung herzustellen, nochmals ausgewertet worden. Unabhängig von der Art der Test und den normativen Vorgaben zu Wirkschwellen und Auswertungsprozedur wurde dabei der Bezug zu einer einheitlichen Definition von signifikanter Wirkung hergestellt, die auf zwei Grundregeln zurückgeht:

1. Die Wirkschwelle (WS) definiert sich aus den Werten der im Originalversuch eingesetzten Kontrollproben. Die ist definiert als Mittelwert der Kontrollen minus drei Standardabweichungen des Mittelwertes

$$WS = K - 3 \cdot \sigma_K$$

2. Eine Prüfprobe wird dann als signifikant (einseitig 95%) wirksam betrachtet, wenn der mittlere Messwert (MWM) die Wirkschwelle um 2 Standardabweichungen des Messprobenmittelwertes überschreitet.
$$M - 2 \cdot \sigma_M > K - 3 \cdot \sigma_K$$

Im Rahmen der Qualitätssicherung ist ergänzend sicherzustellen, dass die Kontrollproben den Validierungskriterien genügen und $\sigma_M < 1$ ist um die Repräsentativität der Probe zu verifizieren.

Für einzelne Tests ergeben sich auf der Basis der auf die Varianzanalyse gestützten Auswertung Abweichungen von der normgerechten Auswertung, da diese die Varianzen der Messwerte unberücksichtigt lässt. Beispielphaft werden hier zwei Fälle vorgestellt.

Im Algentest zeigen die Kontrolluntersuchungen im Mittel eine Wachstumsrate von 1,55. Der CV liegt bei 0,04, so dass die Wirkschwelle als dreifache Standardabweichung der Kontrollproben nach unten bei einem Wert von 1,44 liegt. Die gesetzte Wirkschwelle von 20% Hemmung gegenüber dem Mittelwert liegt mit etwa 1,24 deutlich niedriger. Sämtliche Messwerte liegen gut reproduzierbar im Bereich zwischen 1,33 und 1,4 und damit zwar deutlich oberhalb der gesetzten Wirkschwelle, aber dennoch aussagesicher außerhalb des Bereiches der Kontrollproben. Hier liegt eine statistische signifikante Wirkung vor, obwohl die Wirkschwelle von 20% vom Mittelwert nicht überschritten wird.

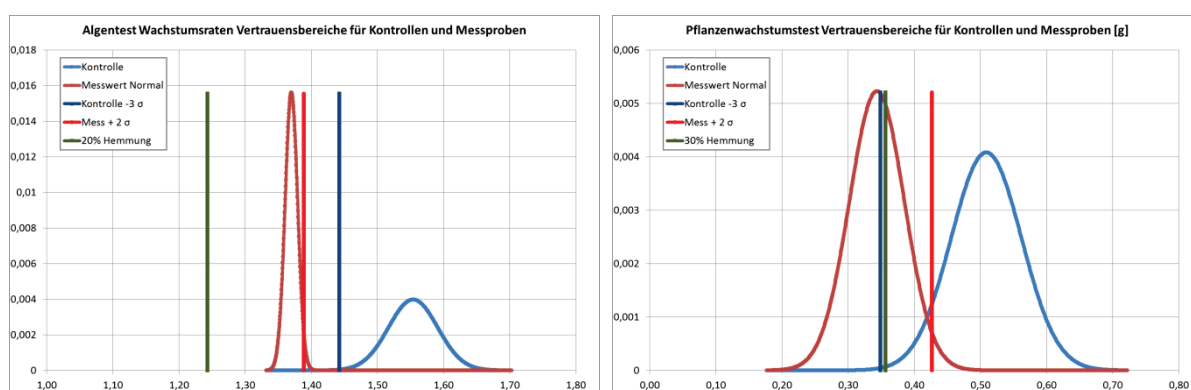


Abbildung 2: Veränderte Bewertungen im Algentest sowie im Pflanzenwachstumstest, beispielhaft

Im Pflanzenwachstumstest handelt es sich um einen Versuch mit nur vier Replikaten. Das Pflanzengewicht der Kontrolluntersuchungen ist mit 0,51 g relativ gering, der CV des Mittelwertes liegt bei 0,1. Die aus der Varianzanalyse ermittelte Wirkschwelle fällt nahezu mit der auf 30% festgesetzten Wirkschwelle zusammen. Der Mittelwert der Messreihe liegt mit 0,34 g zwar unterhalb beider Wirkschwellen, aber der Variationskoeffizient der Messreihe ist mit 0,12 zu groß, um eine Aussagesicherheit von 95% zu gewährleisten. Nachfolgende Übersicht stellt testbezogen die Rahmendaten der Evaluation zusammen. Als additives Kriterium wurde für alle Tests die Dosis-Wirkungs-Beziehung als Indikator für die Repräsentativität der Analysenproben evaluiert. Auf die Darstellung uneindeutiger Befunde wurde dabei verzichtet.

Test	Zahl der untersuchten Abfallproben	Zahl der vorliegenden Einzeltests	Anteil veränderter Bewertungen	Dosis-Wirkungs-Beziehung positiv	Dosis-Wirkungs-Beziehung negativ
Daphnie	113	433	32,7%	39%	9%

Algen	92	264	22,8%	62%	13%
Bakterien	55	1.196	50,9%	67%	15%
Pflanzen	57	1.920	12,3%	75%	9%
Regenwurm	44	431	47,7%	77%	20%

Die Bewertung ökotoxikologischer Wirkung wird damit sinnvoller Weise auf eine nachweislich mit 95% Aussagesicherheit wirksame, effektive Konzentration (ECX) umgestellt.

3. Zusammenfassung des Gesamtvorhabens

Aufgabe des Vorhabens war es, die regulatorische Umsetzung des im Europäischen Abfallverzeichnis aufgeführten Gefährlichkeitskriteriums H14 für Abfälle zu spezifizieren. Ausgehend von dem Entwurf der im UBA erarbeiteten „Handlungsempfehlungen zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen“ (Moser 2008) sowie Erfahrungen aus der Literatur (speziell einem EU-weiten Ringtest und aus dem UBA-25-Abfälle-Programm) wurden vier Arbeitspakete bearbeitet:

1. Zusammenfassung der Kenntnisse zur ökotoxikologischen Untersuchung von Abfällen aus der Literatur, mit dem Ziel der Erstellung praktischer Vorschläge: 1a) Modifikation bzw. Konkretisierung der Vorgaben zur Abfallbehandlung (Probenahme, Lagerung, usw.); 1b) Identifikation einer aquatisch / terrestrischen Testbatterie einschließlich von Vorschlägen zum Einsatz und zum Design dieser Tests in einer Teststrategie (Ablaufschema).
2. Erarbeitung konkreter Vorgaben zur Auswertung dieser Tests (z.B. Wirkschwellen) unter Einsatz statistischer Methoden im Hinblick auf die Gewinnung aussagesicherer Messergebnisse, d.h. letztlich Beantwortung der Frage, ab wann ein Abfall als gefährlich einzustufen ist. Nach intensiven Diskussionen im nationalen wie internationalen Rahmen wurde das ECx-Design als die am besten geeignete Methode zur Beurteilung des ökotoxikologischen Gefährdungspotentials von Abfällen identifiziert.
3. Erstellung einer überarbeiteten UBA-Handlungsempfehlung in deutscher und englischer Sprache und Vorbereitung der Publikation der jeweiligen Ergebnisse im nationalen und internationalen Rahmen. Der Entwurf einer modifizierten Handlungsempfehlung wurde in enger Absprache mit dem UBA erstellt. Dieser diente zugleich als Grundlage für die Erstellung von mindestens zwei Publikationen zu diesem Thema.
4. Erarbeitung von Stellungnahmen für die Expertengruppen der EU-Kommission im Rahmen der Überarbeitung des Europäischen Abfallrechts. Diese Kommentare erfolgten in Kooperation mit den UBA-Kollegen vor allem 2011 und 2012 in Brüssel. Die ursprünglich geplante Präsentation der Ergebnisse des Vorhabens in einem nationalen Fachgespräch sowie Einarbeitung der dort erzielten Ergebnisse in die finale Fassung der Handlungsempfehlung unterblieb aus Gründen der geänderten rechtlichen Vorgaben. Stattdessen wurde ein Positionspapier für die EU-Kommission mit konkreten Vorschlägen zum weiteren Vorgehen bei der ökotoxikologischen Gefährdungsklassifikation von Abfällen erarbeitet.

4. Literatur / References:

- Baun, A., Ledin, A., Reitzel, L.A., Bjerg, P.L., Christensen, T.H. 2004. Xenobiotic organic compounds in leachates from ten Danish MSW landfills - chemical analysis and toxicity tests. *Water Research* 38: 3845-3858
- [CEN] Comité Européen de Normalisation. 2005. Characterization of waste – Preparation of waste samples for ecotoxicity tests. CEN 14735. European Standard, Brussels, Belgium.
- [EC] European Commission. 2000. European Waste List 2000/532/EC: Commission Decision of 3 May 2000 replacing Decision 94/3/EC establishing a list of wastes pursuant to Article 1(a) of Council Directive 75/442/EEC on waste and Council Decision 94/904/EC establishing a list of hazardous waste pursuant to Article 1(4) of Council Directive 91/689/EEC on hazardous waste.
- [EC] European Commission. 2008a. Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives, Official Journal of the European Union L312, 22.11.2008, p 3-30.
- [EC] European Commission. 2008b. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. Official Journal of the European Union L 353, 31.12.2008, p 1-1355.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2000. Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test. ISO 13829. Geneva, Switzerland.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2007a. Water quality – Determination of the inhibitory effect on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). 11348-3. Geneva, Switzerland.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2007b. Soil Quality – Avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals. Test with Earthworms (*Eisenia fetida/andrei*). ISO 17512-1. Geneva, Switzerland.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2012a. Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692. Geneva, Switzerland.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2012b. Water quality –Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. ISO 6341, Geneva, Switzerland.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2012c. Soil Quality – Quality of solid samples - Solids contact test using the dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis*. ISO/WD 18187. Geneva, Switzerland.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2012d. Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part II: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants. ISO 11269-2. Geneva, Switzerland.
- [ISO] International Organization for Standardization. 2012e. Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test). ISO 11350. Geneva, Switzerland.

- Kostka-Rick, R. 2004. Ökotoxikologische Charakterisierung von Abfall – Literaturstudie. LfU Karlsruhe, Ökologische Umweltbeobachtung 3: 1-108.
- Moser, H. 2008. Handlungsempfehlungen zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen. Entwurf, Stand September 2008
- Moser, H., Römbke, J. 2009. Ecotoxicological characterization of waste - Results and experiences of an European ring test. Springer Ltd., New York. 308 pp.
- OEKOPOL 2008. Review of The European List of Waste, Final Report, 532 pp., available from <http://ec.europa.eu/environment/waste/framework/list.htm>.
- Pandard P, Devillers J, Charissou AM, Poulsen V, Jourdain MJ, Férard J-F, Grand C, Bispo A. 2006. Selecting a Battery of Bioassays for Ecotoxicological Characterization of Wastes. Science of the Total Environment 363: 114-125.
- Pandard, P., Römbke, J. 2013. Proposal for a "Harmonized" Strategy for the Assessment of the HP 14 Property. Integ. Envir. Assess. Manag. (IEAM). In press.
- Römbke, J., Moser, TH., Moser, H. 2009. Ecotoxicological characterization of 12 incineration ashes (MWI) using 6 laboratory tests. Waste Management 29: 2475-2482.
- Römbke, J., Moser, Th., Neumann-Hensel, H., Ketelhut, R. 2010. Identifikation umweltgefährlicher Abfälle in Spiegeleinträgen der AVV. Bericht für das Umweltbundesamt, FKZ 3708 31 300, 124 S.



Appendix 1: Handlungsempfehlung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen

Kontakt:

Umweltbundesamt

FG III 1.5 Kommunale Abfallwirtschaft, Gefährliche Abfälle,

Anlaufstelle Basler Übereinkommen

Dr. Joachim Wuttke

joachim.wuttke@uba.de, Tel. 2103-3459

ECT Oekotoxikologie GmbH

Dr. Jörg Römbke

J-Roembke@ect.de, Tel. 06145 956450

Stoffstromdesign (SSD)

Ralf Ketelhut

ketelhut@stoffstromdesign.de, Tel: 04321 78 39 211

26. Februar 2013

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	30
2.	Anwendungsbereich.....	30
3.	Gesetzlicher Hintergrund.....	31
4.	Wissenschaftliche Grundlagen.....	32
5.	Anmerkungen zur Methode	33
5.1	Begriffe	33
5.1.1	Effektkonzentration (EC).....	33
5.1.2	Grenzkonzentration	34
5.1.3	Testdesign.....	34
5.2	Methodische Besonderheiten bei der Abfalltestung	34
5.2.1	Einführung	34
5.2.2	Probenahme und Probenkonservierung	35
5.2.3	Probentransport und -lagerung.....	36
5.2.4	Probenvorbehandlung.....	37
5.2.5	Herstellung von Abfalleluaten.....	37
5.2.6	Lagerung von Abfalleluaten	38
5.2.7	pH-Werte der Abfalleluate	39
5.2.8	Kontrollmedium	39
6	Teststrategien	40
6.1	Identifikation umweltgefährlicher Abfälle in Spiegeleinträgen der Abfallverzeichnisverordnung	40
6.1.1	Allgemein	40
6.1.2	Teststrategie	42
6.1.3	Auswahl der Testverfahren	42
6.1.4	Bewertung der Testergebnisse.....	43
6.2	Detaillierte ökotoxikologische Charakterisierung von Abfällen.....	44
6.2.1	Generelle Maßnahmen	44
6.2.2	Auswahl der Testverfahren	45
6.2.3	Bewertung der Testergebnisse.....	45
7	Ökotoxikologische Charakterisierung im Rahmen einer Risikobewertung von Abfallentsorgungs-szenarien	46
7.1	Allgemein.....	46
7.2	Teststrategie	46

7.3	Auswahl der Testverfahren.....	48
7.4	Bewertung der Testergebnisse	48
8	Literaturverzeichnis	49
8.1	Richtlinien.....	49
8.2	Publikationen.....	51
Anhang A:	Sieblinie	52

1. Einleitung

Die vorliegende Handlungsempfehlung basiert auf den Ergebnissen und Erfahrungen eines internationalen Ringversuchs zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen (Moser & Römbke 2009), der Auswertung biologischer Wirkungsanalysen mineralischer Abfälle, dem Erfahrungsaustausch mit CEN TC 292 WG7 sowie dem ökotoxikologischen Screening einer großen Zahl von Abfällen in Spiegeleinträgen (Römbke et al. 2010a). Darüber hinaus wurden bei ihrer Erstellung verschiedene Normen (z.B. der ISO), technische Dokumente und Forschungsberichte zur ökotoxikologischen Beurteilung komplexer Umweltmatrizes (Abwässer, kontaminierte Böden) sowie insbesondere die Empfehlungen der CEN TC 292 WG7 berücksichtigt.

Die ökotoxikologische Charakterisierung von Abfällen sollte durch eine Kombination chemischer und biologischer Untersuchungsmethoden erfolgen, da sich die Gefährlichkeit von Abfällen durch einen Vergleich chemischer Analysenwerte mit bestehenden Schwellenwerten nicht ausreichend ableiten lässt. Eine Beurteilung der Umweltgefährlichkeit von Abfällen ist nur mit Hilfe biologischer Testverfahren möglich, da nur diese die Wirkungen aller bioverfügbaren Kontaminanten (einschließlich deren möglicher Wechselwirkungen sowie analytisch nicht erfassbarer Abfallschadstoffe) abbilden können.

Die Auswertung der vorliegenden Tests von mehr als 100 Abfallproben hat gezeigt, dass biologische Testverfahren auch für heterogene Abfallgemische gut reproduzierbare Ergebnisse liefern. Es besteht daher Anlass zu der Vermutung, dass über die Wirkung einzelner Kontaminanten hinaus auch Matrixeffekte abgebildet werden können, die mit chemisch-analytischen Methoden nicht erkannt werden.

Ziel dieser Handlungsempfehlung ist es, die ökotoxikologische Untersuchung von Abfällen anwendungsorientiert auf eine belastbare methodische Grundlage zu stellen, die eine Vergleichbarkeit von Untersuchungsergebnissen ermöglicht. Es wird daher nicht auf sämtliche Details der Vorgehensweise eingegangen, sondern es werden lediglich die wesentlichen Eckpunkte erläutert und auf die einschlägigen Richtlinien verwiesen.

2. Anwendungsbereich

Diese Handlungsempfehlung enthält einerseits eine Anleitung für die Auswahl und Anwendung geeigneter biologischer Testverfahren, um das ökotoxikologische Potenzial und somit die auf diesem Kriterium basierende Gefährlichkeit von Abfällen für die Umwelt abzuschätzen. Die dabei vorgeschlagenen Teststrategien sind Empfehlungen und dürfen ergänzt oder aufgrund spezifischer Abfalleigenschaften sowie geplanter Verwertungsszenarien verändert werden. Andererseits sind in ihr Normen und methodische Erfahrungen zusammengefasst, die eine Beurteilung der Testergebnisse erleichtern. Damit kann diese Handlungsempfehlung als Hilfestellung bei der Einstufung und Klassifikation von Abfällen im abfallrechtlichen Vollzug eingesetzt werden.

Neben der Einstufung von Abfällen können die Ergebnisse der biologischen Wirkungsanalyse auch für die Risikobewertung von Abfällen mit Blick auf geplante Verwertungsmaßnahmen eingesetzt werden. Die Anwendung der Testverfahren erlaubt damit eine Abschätzung möglicher schädlicher Wirkungen auf aquatische und terrestrische Ökosysteme.

In den vergangenen Jahren wurden im Einklang mit der ersten Version dieser Handlungsempfehlung (Moser 2008) für die Klassifikation von Abfällen meist Erweiterte Limit-Tests durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein vereinfachtes bzw. verkürztes Design, in dem die zu untersuchende Abfallprobe nicht in einer Verdünnungsreihe bis zur Nulltoxizität untersucht wird, sondern lediglich die Konzentrationsstufen untersucht werden, die der Grenzkonzentration und den beiden unmittelbar angrenzenden Konzentrationsstufen entsprechen. Diese verkürzte Untersuchung hat allerdings den Nachteil, dass sie stark von der vorab festgelegten (und als unveränderlich angenommenen) Grenzkonzentration abhängig ist. Zudem wird dabei nicht unterschieden, ob die Grenzkonzentration gering oder drastisch überschritten wurde.

Abweichend von diesem Vorschlag wird nun ein aussagekräftigeres Design empfohlen, bei dem diejenige Verdünnung bestimmt wird, bei dem der jeweilige Testparameter einer Testspezies zu 50% beeinträchtigt wurde. Die Verwendung eines EC50-Ansatzes dient zudem der Harmonisierung zwischen verschiedenen Rechtsbereichen (die Umweltrisikobeurteilung von Chemikalien, u.a. Pestiziden, folgt dem gleichen Ansatz) und zwischen dem Vorgehen bei der Abfalltestung in verschiedenen Staaten in Europa: so wird z.B. in Frankreich auch der EC-Ansatz präferiert (Pandard et al. 2006).

3. Gesetzlicher Hintergrund

Grundlage der Klassifikation von Abfällen ist die Europäische Abfallrahmenrichtlinie (Waste Framework Directive (WFD); 2008/98/EC (EC 2008a)). Das Europäische Abfallverzeichnis (EAV, Entscheidung 2000/532/EG (EC 2000)), in der geltenden Fassung beschreibt eine harmonisierte Liste von Abfallarten, die Abfälle nach ihrer Herkunft oder ihrem Entstehungsprozess gruppiert. Das EAV dient EU-weit als Nomenklatur zur Bezeichnung von Abfällen. Das Europäische Abfallverzeichnis wurde 2002 mit der Abfallverzeichnisverordnung in deutsches Recht überführt und beschreibt 839 Abfallschlüssel in 20 Abfallkapiteln mit 405 als gefährlich gekennzeichneten Abfällen und ca. 200 Abfällen in so genannten „Spiegeleinträgen“.

Spiegeleinträge bestehen aus paarweise auftretenden Einträgen, bei denen ein Abfall je nach Art und Konzentration der Schadstoffe als gefährlich oder als nicht-gefährlich eingestuft werden kann. Ein als gefährlich eingestuft Abfall ist dabei mit einem Stern „*“ gekennzeichnet. Die Mehrheit der Spiegeleinträge bezieht sich dabei auf den Begriff „gefährliche Stoffe“. Einige Spiegeleinträge beschreiben „gefährliche Eigenschaften“ oder die spezifische, gefährliche Abfallkomponente (siehe Tab. 1).

Zur Unterscheidung zwischen gefährlichen und nicht-gefährlichen Abfällen in Spiegeleinträgen sind im Europäischen Abfallverzeichnis 15 Gefährlichkeitskriterien genannt, die zur Bewertung herangezogen werden und die ihren Ursprung im europäischen Gefahrstoffrecht (Richtlinie 67/548/EWG (EC 1967)) haben. Eines dieser Kriterien (HP14 „ökotoxisch“ – Stoffe und Zubereitungen, die unmittelbare oder mittelbare Gefahren für einen oder mehrere Umweltbereiche darstellen können) beschreibt das ökotoxikologische Potenzial, also die Umweltgefährlichkeit als inhärente Abfalleigenschaft. Auch im Basler Übereinkommen zur Kontrolle der grenzüberschreitenden Verbringung gefährlicher Abfälle erfordert das Kriterium HP12 („Ökotoxische Stoffe – Stoffe oder Abfälle, die nach Freisetzen durch Bioakkumulation und/ oder toxische Wirkung auf Lebenssysteme sofort oder später nachteilige Wirkungen auf

die Umwelt haben oder haben können“) eine Bewertung des ökotoxikologischen Potenzials der Abfälle.

Tabelle 1: Beispiele für Spiegeleinträge aus dem Europäischen Abfallverzeichnis

Beispiel 1	
19 01 11*	Rost- und Kesselaschen sowie Schlacken, die gefährliche Stoffe enthalten
19 01 12	Rost- und Kesselaschen sowie Schlacken mit Ausnahme derjenigen, die unter 19 01 11 fallen
Beispiel 2	
10 08 10*	Krätzen und Abschaum, die entzündlich sind oder in Kontakt mit Wasser entzündliche Gase in gefährlicher Menge abgeben
10 08 11	Krätzen und Abschaum mit Ausnahme derjenigen, die unter 10 08 10 fallen
Beispiel 3	
06 03 11*	Feste Salze und Lösungen, die Cyanid enthalten
06 03 13*	Feste Salze und Lösungen, die Schwermetalle enthalten
06 03 14	Feste Salze und Lösungen mit Ausnahme derjenigen, die unter 06 03 11 und 06 03 13 fallen

4. Wissenschaftliche Grundlagen

In biologischen Testverfahren nutzt man die Fähigkeit spezifisch ausgewählter Organismen, unter standardisierten Bedingungen auf Schadstoffbelastungen mit einer Veränderung ihrer Lebensfunktion zu reagieren. Die Sensitivität biologischer Testorganismen gegenüber toxischen Abfallbestandteilen kann signifikant von einer Art zur anderen abweichen. Die Kombination unterschiedlicher Testverfahren in einer so genannten Testbatterie muss daher Organismen einschließen, die zu verschiedenen taxonomischen Gruppen gehören sowie unterschiedliche trophische Ebenen repräsentieren. Neben einer möglichst breiten Empfindlichkeit wird damit zugleich angestrebt, einen Eindruck von potentiellen Auswirkungen auf die ökologischen Funktionen aquatischer wie terrestrischer Organismen zu erhalten. Dabei sollten die Testverfahren neben der akuten auch die chronische Toxizität und die Gentoxizität abdecken. An die im praktischen Vollzug einzusetzenden Testverfahren werden zusätzlich verschiedene grundsätzliche Anforderungen gestellt (unabhängig davon, ob es sich um Chemikalien, Mischungen oder um genetisch veränderte Organismen handelt), wie z.B. eine standardisierte Testvorschrift, eine ausreichende Sensitivität, eine gute methodische Handhabbarkeit und Wirtschaftlichkeit (Römbke et al. 2010b). Darüber hinaus ist es zwingend notwendig, dass Erfahrungen über die besonderen Anforderungen bei der Untersuchung von Abfällen und Abfalleluaten im jeweiligen Testsystem vorliegen.

Die in dieser Handlungsempfehlung vorgeschlagene Testbatterie ermöglicht es, das Gefährlichkeitskriterium HP14 „ökotoxisch“ sicher, valide und reproduzierbar zu bestimmen und somit die in Spiegeleinträgen befindlichen gefährlichen Abfälle in Bezug auf dieses Gefährlichkeitskriterium zu identifizieren. Diese Bestimmung der inhärenten Abfalleigenschaften ist für die Festlegung einer umwelt- und gemeinwohlverträglichen Beseitigung oder einer ordnungsgemäßen und schadlosen Verwertung nicht ausreichend, sondern muss häufig durch weitergehende Untersuchungen erweitert werden. Hierzu gehört

z.B. die Einbeziehung möglicher Expositionsszenarien bei einer geplanten umweltoffenen Verwertung oder bei der Genehmigung von Abfallbehandlungsanlagen im Rahmen einer Risikobewertung.

Der Einsatz biologischer Testverfahren ermöglicht Aussagen über die akute und chronische Toxizität auf die Testorganismen direkt und näherungsweise auf Organismen vergleichbarer Biologie. Die Gefahren für die abiotischen Umweltbereiche Boden, Wasser oder Klima werden dabei nicht oder nicht vollständig erfasst. Die Beurteilung der Umweltgefährlichkeit persistenter Schadstoffe, die durch Akkumulation in Umweltkompartimenten und in Nahrungsketten Schäden hervorrufen, kann physikalisch-chemisch oder durch geeignete Bioakkumulationstests erfolgen (z.B. OECD 315; OECD 317). Klimaschädliche Abfallbestandteile hingegen können lediglich durch chemische Analytik bestimmt werden.

Bei einer Auswertung der in den letzten 20 Jahren erschienen Arbeiten zur ökotoxikologischen Testung von Abfällen stellte sich heraus, dass die Zahl der entsprechenden Publikationen kontinuierlich zunahm. Allerdings wird in diesen Arbeiten eine sehr große Bandbreite von Abfällen und Testmethoden (speziell zur Eluatherstellung) abgedeckt. Aufgrund dieser großen Heterogenität der publizierten Daten zur Ökotoxizität von Abfällen ist es sehr schwer, diese Ergebnisse zu vergleichen bzw. zu verallgemeinern. Dennoch ist als Fazit dieser Auswertung festzuhalten, dass die vorliegenden ISO-Test-Richtlinien gut für die ökotoxikologische Charakterisierung einer Vielzahl von flüssigen und festen Abfällen (inkl. Schlämmen) geeignet sind. Dabei zeigt sich auch, dass sich die Ergebnisse der ökotoxikologischen Tests in Abhängigkeit von den jeweiligen Abfalleigenschaften deutlich unterscheiden können; d.h. diese Tests können zur Differenzierung in ökotoxische bzw. nicht-ökotoxische Abfälle benutzt werden.

5. Anmerkungen zur Methode

Dieser Handlungsempfehlung liegen genormte Verfahren zu Grunde, die ursprünglich zur Untersuchung von Böden, Abwasser oder Chemikalien eingesetzt und anschließend für die ökotoxikologische Charakterisierung von Abfällen weiterentwickelt wurden. Diese biologischen Verfahren und ergänzende Hinweise zu Probenahme und Probenvorbereitung sind in DIN 14735 zusammengefasst. Zur Probenahme und -behandlung von Abfällen sind weitere genormte Verfahren und technische Anleitungen verfügbar (vgl. die Liste von DIN-Tests zur Beurteilung von kontaminierten Böden oder Bodeneluat (DIN 17616)). Eine Vereinheitlichung der Vorgehensweisen auf den diversen Ebenen von europäischen und nationalen Normen sowie Handlungsanweisungen (z.B. LAGA PN 98) liegt noch nicht vor. Im nächsten Kapitel wird auf Besonderheiten bei der wirkungsbezogenen Untersuchung von Abfällen hingewiesen. Diese Hinweise ersetzen nicht die methodische Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte in den Normen.

5.1 Begriffe

5.1.1 Effektkonzentration (EC)

Die Ökotoxizität eines Abfalls wird durch biologische Tests bestimmt, deren Ergebnis in Form eines EC50-Werts angegeben wird. Dieser wird wie folgt definiert (DIN 11269-2): Konzentration

einer Verdünnung, bei der der jeweilige Messparameter am Ende des Tests nur noch 50% des Kontrollwerts entspricht.

5.1.2 Grenzkonzentration

Als Grenzkonzentration wird denjenigen EC50-Wert bezeichnet, ab dem der getestete Abfall hinsichtlich des Kriteriums HP14 als „gefährlich“ klassifiziert werden muss. Vorbehaltlich einer endgültigen Festlegung wird in dieser Handlungsempfehlung vorgeschlagen, als Grenzkonzentration diejenige Konzentration des Abfalls) anzunehmen, bei der die $EC_{50} \leq$ eines Tests substratanteils von 10% ist (Pandard & Römbke 2013). Dies findet sowohl im Eluat wie auch bei der Feststofftestung Anwendung.

5.1.3 Testdesign

Der EC50-Wert wird mittels eines „Dose-Response-Designs“ ermittelt, wobei mindestens fünf verschiedene Verdünnungsstufen eines Abfalls anzusetzen sind. Dabei werden die Abfalleluat für die aquatischen Testsysteme mit dem jeweiligen testspezifischen Verdünnungswasser versetzt, die Abfallfeststoffproben der terrestrischen Testsysteme dagegen mit einem entsprechenden Kontrollmedium (z.B. künstlichem Bodensubstrat, Standardboden oder Quarzsand). Die zu untersuchenden Verdünnungsstufen ergeben sich meist aus ineinander geschachtelten geometrischen Reihen auf der Basis der Zahlen 2 und 3, doch können auch, je nachdem ob der jeweilige Wirkungsbereich bekannt ist, auch andere Faktoren gewählt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Beispielberechnung der Probengehalte für die Testansätze in Verdünnungsreihen

Reihe A			Reihe B		
LID-Wert	Verdünnung	Probenkonzentration im Testansatz [%]	LID-Wert	Verdünnung	Probenkonzentration im Testansatz [%]
2	1:2	50	1,5	1:1,5	66,667
4	1:4	25	3	1:3	33,334
8	1:8	12,5	6	1:6	16,667
16	1:16	6,25	12	1:12	8,334
32	1:32	3,125	24	1:24	4,167
64	1:64	1,562	48	1:48	2,084
etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.

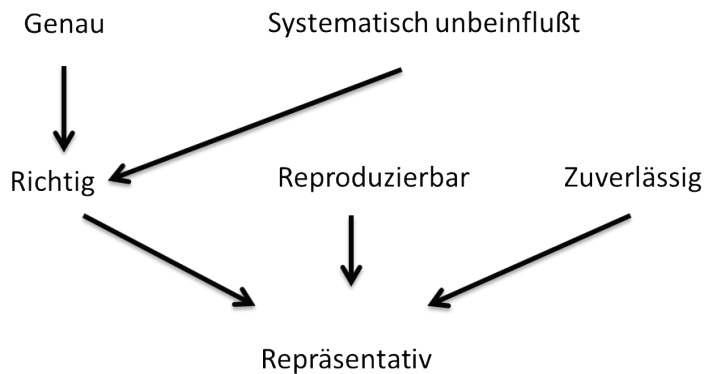
5.2 Methodische Besonderheiten bei der Abfalltestung

5.2.1 Einführung

Nach wie vor ist die Gewinnung repräsentativer Proben aus heterogenen Abfallgemischen ein schwieriges Unterfangen. Auch in der chemischen Analytik gestaltet es sich ausgesprochen schwierig, für Parameter wie zum Beispiel den Gehalt verschiedener Schwermetalle reproduzierbare Ergebnisse zu gewinnen. Die Länderarbeitsgemeinschaft Abfall betrachtet die Probenahme für heterogene, feste Abfälle nicht als repräsentativ, sondern spricht von einer „abfallcharakterisierenden“ Probenahme (LAGA PN 98, Seite 5f). Zielsetzung dieser

abfallcharakterisierenden Probenahme bleibt es, gesicherte Aussagen über die Materialqualität anhand von Untersuchungsergebnissen zu erhalten.

Die LAGA macht die Repräsentativität von Merkmalen einer abfallcharakterisierenden Probe an folgenden Aspekten fest:



Dabei sind die verwendeten Attribute wie folgt definiert:

Genau	Varianz der Messwertabweichungen hält eine vorgegebene obere Schranke ein
Systematisch unbeeinflusst	Frei von systematischen (skalenverschiebenden) Fehlern
Richtig	Genau und systematisch unbeeinflusst
Reproduzierbar	Bei Wiederholmessung treten statistisch identische Ergebnisse auf
Zuverlässig	Risiko der Falschbeurteilung ist kleiner als ein vorgegebener Wert

Die LAGA begegnet diesen Anforderungen in der LAGA PN 98 dahingehend, dass stets eine größere Zahl von Laborproben untersucht werden soll, um parameterspezifische Schwankungen abbilden zu können. Dieser Ansatz ist in der DIN 19698 übernommen worden. Für die biologische Testung wird daraus abgeleitet, sämtliche Untersuchungen im Hinblick auf die Aussagesicherheit und Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse zu überprüfen. Aus der sich bei vergleichbarer Probenqualität aus einer Reihe von Analysenergebnissen ergebenden Varianz kann eine Aussage gegenüber einem vorgegebenen Grenzwert getroffen werden. Für die Aussagesicherheit wird ein Wert von 95% angestrebt.

5.2.2 Probenahme und Probenkonservierung

Die DIN 14735 „Characterization of waste – Preparation of waste samples for ecotoxicity tests“ weist in Bezug auf die Probenahme auf einen in der Erarbeitung befindlichen Standard der CEN/TC 292/WG 1 hin. Dieser liegt bis dato noch nicht abschließend vor. Seitens des DIN ist im Oktober 2012 der Entwurf der DIN 19698-1 „Abfalluntersuchung – Probenahme von festen und stichfesten Abfällen – Teil 1: Anleitung für die segmentorientierte Entnahme von Proben aus unbekannten Haufwerken“ vorgelegt worden. Dieser Entwurf basiert wesentlich auf den in der LAGA PN 98 „Richtlinie für das Vorgehen bei physikalischen, chemischen und biologischen Untersuchungen im Zusammenhang mit der Verwertung/Beseitigung von Abfällen“. Dieser Ansatz deckt sich allerdings nicht mit dem theoretischen Hintergrund, der in den europäischen

Standards verfolgt wird, wie er zum Beispiel in der DIN 15442 „Feste Sekundärbrennstoffe – Verfahren zur Probenahme“ der CEN/TC 343 niedergelegt ist.

Für die biologische Testung wird in Kenntnis der relevanten Literatur, Regelwerke und Richtlinien (Gy 1979, Gy 1992, DIN 19698, DIN 15442, LAGA PN 98, LAGA 2012) im Hinblick auf eine hinreichende Aussagesicherheit und einen vertretbaren Aufwand folgende Vorgehensweise für die Probenahme empfohlen:

1. In einer Laborprobe sollte die Masse oberhalb des 20er Perzentils der Sieblinie durch mehr als 20.000 Partikel repräsentiert sein
2. Eine Probenahme sollte im Idealfall zu zufälligen Zeitpunkten über den gesamten Querschnitt eines fallenden Stromes erfolgen. Ist eine Probenahme aus dem fallenden Strom nicht möglich, muss die Probenahme aus einem Haufwerk erfolgen.
3. Bei einer Probenahme aus einem Haufwerk ist darauf zu achten, dass die Haufwerksbildung nicht zu einer Entmischung geführt hat.
4. Unabhängig von der Größe der Grundgesamtheit sind mindestens 16 Einzelproben zu entnehmen
5. Die Einzelproben sollen Zufallsstichproben sein. Das heißt, jeder Partikel der Grundgesamtheit muss die gleiche Chance besitzen, Bestandteil einer Einzelprobe zu werden.
6. Bei einer Probenahme aus dem Haufwerk kann diese mittels Radlader erfolgen. Die 16 Radladerproben sind dann zu einem Probenahmet Teppich von ca. 1 bis 1,5 dm Höhe auszubreiten. Die Einzelproben können dann als Zufallsstichproben aus zufälligen Koordinaten des zweidimensionalen Teppichs entnommen werden.
7. Alle Einzelproben sind zu einer Mischprobe zu vereinigen. Diese Mischprobe stellt die Laborprobe dar.
8. Eine Probenverjüngung ohne vorhergehende Reduktion der Partikelgröße ist nicht zulässig.

Ergänzend sei darauf hingewiesen, dass Abfälle nach ihrer Probenahme häufig chemischen, physikalischen und biologischen Veränderungen unterliegen. Mögliche Veränderungen sind daher zu berücksichtigen und die Probennahmebedingungen sind so zu gestalten, dass die Auswirkungen solcher Veränderungen auf die Ergebnisse der biologischen Testverfahren minimiert werden. Ein Zusatz von Konservierungsstoffen (z.B. von Säuren) zur Verzögerung der chemischen und biologischen Abläufe ist nicht normgerecht.

5.2.3 Probentransport und -lagerung

Der Transport von Abfallproben sollte so kurz wie möglich sein. Veränderungen der Probeneigenschaften sollten verhindert werden. Die Transportdauer ist als Teil der Lagerungsdauer anzusehen, dabei ist eine Transportdauer von unter 48h und/ oder eine niedrige Temperatur von $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ einzuhalten. Die Proben sollten nicht länger als zwei Monate bei $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Sollte eine längere Lagerung erforderlich sein, ist durch eine begleitende physikalische, chemische oder biologische Analyse abfallspezifischer Parameter eine mögliche Veränderung der Abfallproben während der Lagerung zu bestimmen.

5.2.4 Probenvorbehandlung

Da eine Zerkleinerung des Materials durch die Schaffung neuer, frischer Oberflächen auch die ökotoxikologischen Eigenschaften ändern kann, sollte nach Möglichkeit von einer Zerkleinerung abgesehen werden.

Für Materialien mit einem $d_{95} > 4$ mm aber einem relevanten Massenanteil von Material < 4 mm können unter Wichtung des Massenanteils auch aus dem Siebschnitt < 4 mm Informationen über das ökotoxikologische Verhalten gewonnen werden. Für sehr heterogene Materialien mit nur geringen Massenanteilen < 4 mm erscheint die ökotoxikologische Charakterisierung im ersten Ansatz nur bedingt geeignet. Es kann für auf ein $d_{95} < 4$ mm gebrochenes oder zerkleinertes Material aber zumindest eine Abschätzung gewonnen werden.

Ist der überwiegende Anteil des Originalprobenmaterials > 4 mm, so ist aus einer hinreichenden Materialprobe eine Sieblinie zu erstellen. Diese Sieblinie muss nicht zwingend den Anforderungen der DIN 66165 entsprechen. Da es sich um relativ grobstückige Materialien handelt, ist eine Handsiebung zur überschlägigen Bestimmung einer Sieblinie ausreichend. In Bezug auf die Probenmasse und die Siebdimensionierung sollte jedoch darauf geachtet werden, dass in der größten Siebfraction (d_{95+}) mehr als 200 Partikel enthalten sind. Eine beispielhafte Sieblinie findet sich im Anhang „Sieblinie“.

Soll Material mit hohem Massenanteil > 4 mm charakterisiert werden, ist der Überkornanteil > 4 mm zu zerkleinern, wobei das Material in keinem Fall fein gemahlen werden darf. Eventuell kann hierzu eine kryogene Behandlung notwendig werden. Eine zur Siebung möglicherweise notwendige Trocknung des Materials kann unterschiedliche Eigenschaften des Abfalls verändern, daher darf die Trocknungstemperatur nicht über 40°C liegen.

In der Probe enthaltene nicht zerkleinerbare grobstückige Materialien wie auch große Einzelstücke, die nicht dem typischen Charakter der Probe entsprechen, sind der Probe im Rahmen der Vorbehandlung zu entnehmen. Sie sind fotografisch sowie in ihrer Stückzahl, ihrem Gewicht sowie dem Anteil am Gesamtgewicht der Probe zu protokollieren.

Grundsätzlich ist zu beachten, dass es bei der Probenvorbehandlung und Probenvorbereitung zur Laborprobe je nach angestrebtem Untersuchungs- bzw. Analyseverfahren zu einer weiteren Einengung der Probe kommt, die die Aussagesicherheit mindert. Da die Repräsentativität der Probe im Hinblick auf die zu untersuchende Eigenschaft aber vorab nicht bekannt ist, können Anhaltspunkte zur Aussagesicherheit der Untersuchung nur durch in Paralleluntersuchungen reproduzierter Ergebnisse gewonnen werden. Für die Verjüngung von Probenmaterial im Rahmen der Probenvorbehandlung und Probenvorbereitung wird der Einsatz eines Riffelteilers empfohlen. Alternativ kann die Methode „Kegeln und Vierteln“ genutzt werden (LAGA PN 98).

5.2.5 Herstellung von Abfalleluaten

Zur Charakterisierung und Bewertung von Bestandteilen, die aus Abfall eluiert werden können, sind verschiedene Verfahren entwickelt worden. Die Abgabe wasserlöslicher Bestandteile aus dem Abfall wird als Hauptmechanismus einer potenziellen Umweltgefährdung durch Abfälle angesehen. Ziel der Elutionsverfahren ist es daher, ein wässriges Extrakt herzustellen, das die Bestimmung der ökotoxischen Eigenschaften der wassereludierbaren Bestandteile des Abfalls ermöglicht. Die Komplexität der Elutionsprozesse kann in einem Laborverfahren nur näherungsweise abgebildet werden, so dass Vereinfachungen in der Testvorschrift erforderlich sind. Darüber hinaus beeinflussen bestimmte Abfalleigenschaften die Eignung der

Elutionsmethode. So machen z.B. Abfallproben mit organischen Schadstoffen eine Anpassung der Elutionsmethode erforderlich.

Zur Herstellung der Abfalleluate sind Methoden anzuwenden, die auf standardisierten, national oder international genormten Methodenbeschreibungen basieren.

DIN 12457-2 beschreibt eine geeignete Methode zur Elution von Abfällen bei einem Flüssigkeits-/Feststoffverhältnis von 10 Liter Elutionsmittel pro Kilogramm Feststoff. Sie gilt für Abfälle mit einer Korngröße unter 4 mm mit oder ohne Korngrößenreduzierung. Diese Elutionsmethode ist auch Bestandteil des DIN 14735 „Charakterisierung von Abfällen - Herstellung von Abfallproben für ökotoxikologische Untersuchungen“.

Nach aktuellen Forschungsprojekten und Validierungsuntersuchungen stellt auch die Gewinnung von Säuleneluat eine geeignete Elutionsmethode dar, wie beispielsweise der Säulenschnelltest (DIN 19528). Allerdings stehen derzeit noch keine Erfahrungen über die Biotestung des Eluates und mögliche Grenzkonzentrationen zur Einstufung von Abfällen zur Verfügung.

Die mittels Schüttelversuch oder Säulenelution hergestellten Eluate bilden lediglich den kurzfristig wasserverfügbaren Anteil möglicher toxischer Abfallinhaltsstoffe ab. Im Besonderen für die Risikobewertung einer geplanten umweltoffenen Verwertung sind Methoden anzuwenden, die die Randbedingungen im Verwertungsszenario abbilden. Hierbei ist jeder relevante Eintragspfad in die Umwelt zu berücksichtigen und dabei sind gegebenenfalls zeitabhängige Veränderungen des Materials zu bewerten bzw. zusätzliche Untersuchungen durchzuführen. Dort, wo untergesetzliche Regelwerke Testmethoden vorschreiben, ist die Auswahl des Elutionsverfahrens bestimmungsgemäß anzuwenden.

In Ergänzung zu Punkt 11.2.1 (Leaching Procedure) der DIN 14735 wird empfohlen, eine sich aus der Probeneinengung mittels Teilungsverfahren ergebende Teilmenge zwischen 100 g und 200 g Trockenmasse für das Eluat zu verwenden, um die teilungsbedingte Unsicherheit möglichst gering zu halten. Die eingesetzte Probenmasse sollte sich schlüssig aus der hälftigen Probenteilung ergeben. Die Teilungsschritte sind zu protokollieren. Die für das 1:10 Verhältnis erforderliche Wassermenge kann anschließend problemlos eingestellt werden. Um im Bedarfsfall den durch Probenvorbehandlung und Probenvorbereitung verursachten Unsicherheiten entgegenzuwirken, können mehrere Paralleleluat (z.B. 4) angesetzt und anschließend vermischt werden.

Da mögliche gentoxische Eigenschaften von Abfällen ein besonderes Risiko darstellen, kann zusätzlich zur gentoxikologischen Testung des wässrigen Eluates auch ein Festphasenextrakt zur Anreicherung des Eluates eingesetzt werden (Ehrlichmann et al. 2000).

5.2.6 Lagerung von Abfalleluaten

Die Abfalleluat müssen unmittelbar nach ihrer Herstellung (empfohlene maximale Lagerungszeit 48 Stunden, Lagerungshöchst-dauer 72 Stunden) im Test eingesetzt werden. Abfalleluat dürfen nicht durch die Zugabe von Konservierungsmitteln stabilisiert werden. Ein Einfrieren des Eluates kann zu irreversiblen Veränderungen und somit zu einer Beeinflussung der Testergebnisse führen und ist daher nur in Ausnahmefällen zulässig. Sollte ein Einfrieren unumgänglich sein, so ist dies im Untersuchungsbericht zu dokumentieren.

5.2.7 pH-Werte der Abfalleluate

Die Untersuchung der Abfalleluate in den Biotesten hat ohne eine Einstellung des pH-Werts zu erfolgen, wobei sich der pH-Wert der Prüfgemische vom pH-Wert des zu prüfenden Abfallmaterials aufgrund der Verdünnung erheblich unterscheiden kann. Ausschlaggebend hierfür sind der gewählte Verdünnungsbereich und die Pufferkapazität des Abfalls. In dem Fall, dass toxische Effekte in den Verdünnungen beobachtet werden, deren pH-Wert ein Überleben der Testorganismen nicht zulässt oder deutlich beeinflusst, können die Ökotoxizitätsprüfungen mit einer normgerechten Einstellung des pH-Wertes wiederholt werden.

Dabei ist zu beachten, dass auch ein saures oder alkalisches Eluat allein aufgrund des nicht-neutralen pH-Wertes eine ökotoxische Wirkung erzielen kann und dies somit die Abfalleinstufung beeinflussen kann.

5.2.8 Kontrollmedium

Die Bestimmung ökotoxischer Eigenschaften von Abfall erfordert die Verwendung eines Verdünnungsmediums, das die Reaktion der Testorganismen nicht beeinflusst und keine Wechselwirkungen mit der Probe eingeht. Da die Anforderungen an das Verdünnungsmedium von den Testorganismen abhängen, sind in den Testmethoden geeignete Verdünnungssubstrate beschrieben. Sowohl für die Kontrolle als auch für die Verdünnungsreihe ist das gleiche Medium zu verwenden.

Die Herstellung der Prüfgemische hängt auch von der zu untersuchenden Abfallart ab. Sie ist in DIN 14735 zusammengefasst.

6 Teststrategien

Die Bewertung von Abfällen ist an das Gefahrstoffrecht angelehnt. Insofern können ausreichende Kenntnisse über die gefährstoffrechtliche Zusammensetzung des Abfalls eine Einstufung des Abfalls ermöglichen. Jeder Abfall, der aufgrund seiner (bekannten) Zusammensetzung nach dem Gefahrstoffrecht (HP1 bis HP13) einzustufen und zu kennzeichnen ist, ist bereits ein gefährlicher Abfall.

Biologische Testverfahren sind darüber hinaus bei Abfällen unbekannter oder komplexer Zusammensetzung anwendbar für:

- die Identifikation gefährlicher Abfälle in Spiegeleinträgen der Abfallverzeichnisverordnung hinsichtlich des Kriteriums HP14 (Kap. 6.1),
- eine detaillierte ökotoxikologische Charakterisierung von Abfällen (Kap. 6.2),
- die Risikobewertung von Verwertungsmaßnahmen von Abfällen (Kap. 6.3).

6.1 Identifikation umweltgefährlicher Abfälle in Spiegeleinträgen der Abfallverzeichnisverordnung

6.1.1 Allgemein

Erlauben die chemisch-physikalisch analysierten Konzentrationsgehalte der Eluate bzw. der Abfallinhaltsstoffe keine gefährstoffrechtliche Einstufung, sind die Erkenntnisse über die Abfallzusammensetzung nicht hinreichend aussagekräftig oder sind die Abfallkomponenten gefährstoffrechtlich nicht eingestuft, so muss das in der Abfallverzeichnisverordnung gelistete Gefährlichkeitskriterium HP14 untersucht werden.

Diese Untersuchung sollte in einem mehrstufigen Prozess erfolgen (Abb. 1).

Die Abfallbeurteilung beginnt mit der Nutzung vorhandener Informationen; d.h. die Aufsummierungsmethode laut CLP-Regulierung (classification, labelling and packaging of substances and mixtures) für aquatische akute und chronische Testparameter wird verwendet (European Regulation EC 1272/2008). Sofern ausreichende Daten für die einzelnen Komponenten des Abfalls verfügbar sind, kann auf diese Weise eine Abfallklassifikation vorgenommen werden. Das heißt, in diesem Fall ist die Durchführung ökotoxikologischer Tests nicht notwendig. In allen anderen Fällen ist die experimentelle Bestimmung der Ökotoxizität eines Abfalls erforderlich. Eine Bewertung als nicht-ökotoxisch führt dabei nicht automatisch zu einer Einstufung als nicht-gefährlicher Abfall, da unabhängig von der ökotoxikologischen Bewertung auch alle anderen in der Abfallverzeichnisverordnung genannten und für die jeweilige Abfallart relevanten Gefährlichkeitskriterien geprüft werden müssen.

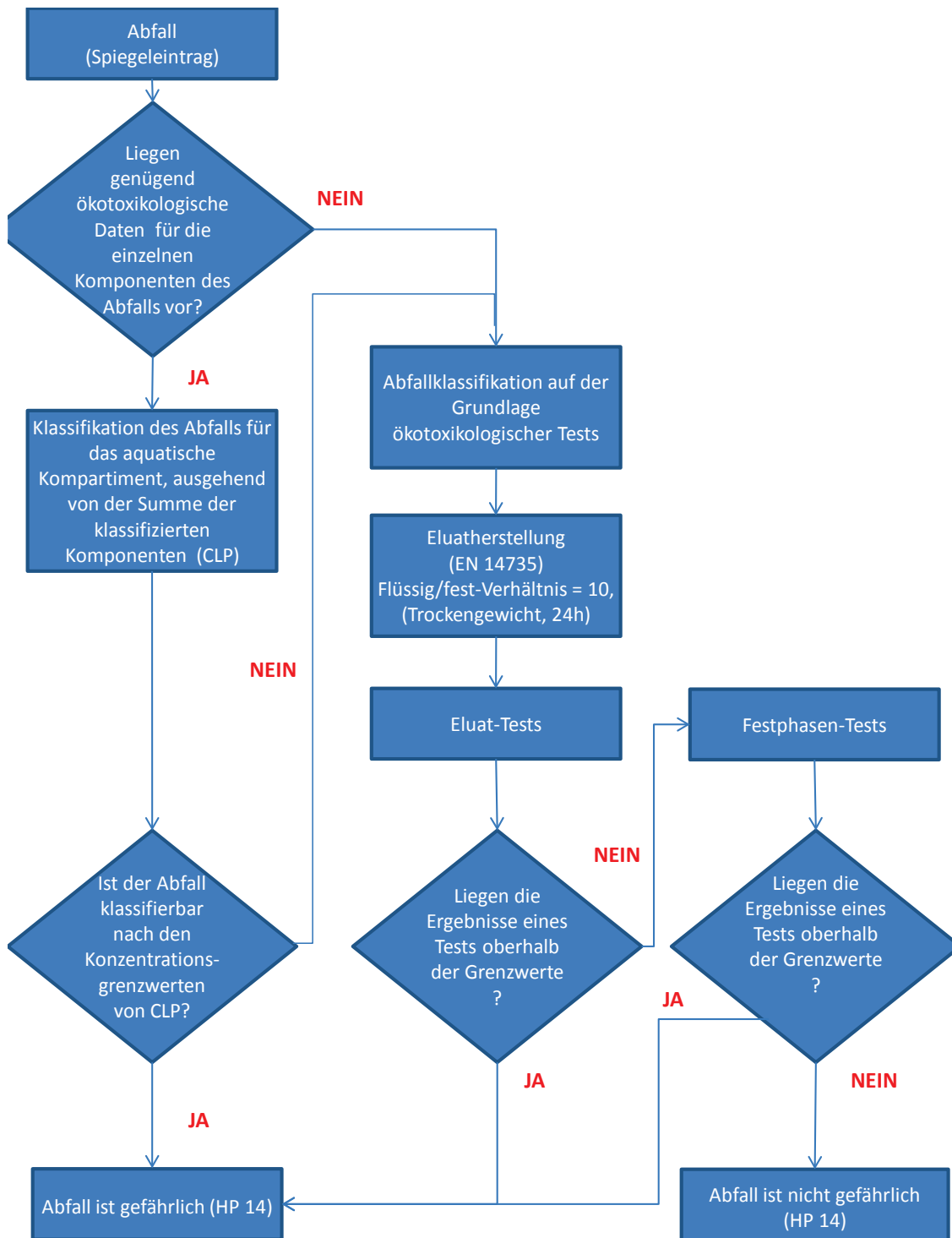


Abb. 1: Ablaufschema für die Abfallklassifikation nach HP14 (Pandard & Römbke 2013).

6.1.2 Teststrategie

Die praktische Durchführung ökotoxikologischer Tests erfolgt nach DIN 14735. Sie beginnt mit der Untersuchung von Abfalleluaten (Abb. 1), wobei diese mit einem Kontrollsubstrat (rekonstituiertes Wasser), gemischt werden. Dabei erfolgt im Regelfall keine Anpassung des pH-Wertes. Nur wenn der pH-Wert des Gemisches das Überleben der Testorganismen beeinträchtigt, kann der Test nach pH-Einstellung wiederholt werden, wobei das Ergebnis allerdings nicht die Klassifikation des Abfalls ändert, sondern primär der Ursachen-Identifikation dient. Die Ergebnisse dieser Tests werden als ECx-Werte (= effect concentrations) angegeben. Wenn dabei der jeweilige EC-Wert unterhalb der Grenzkonzentration liegt, ist der getestete Abfall als gefährlich zu klassifizieren und der Testprozess wird beendet. Andernfalls werden terrestrische Tests mit den Abfallproben untersucht. Der Abfall ist nur dann als ungefährlich zu klassifizieren, wenn alle Testergebnisse unterhalb der jeweiligen Grenzkonzentration liegen. Die bisher veröffentlichten ökotoxikologischen Daten aus Abfalltests zeigen keine durchgängig höhere Sensitivität aquatischer Tests (Römbke et al. 2009). Daher enthält die hier empfohlene Teststrategie sowohl aquatische wie auch terrestrische Tests, wobei allerdings der Schwerpunkt auf den Eluattests liegt, da diese im Allgemeinen kürzer und billiger sind.

6.1.3 Auswahl der Testverfahren

Die in Tabelle 3 dargestellte Biotestbatterie basiert auf den Erkenntnissen eines europäischen Ringversuchs zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen sowie den Erfahrungen in weiteren Forschungsprojekten (speziell Pandard et al. 2006; Römbke et al. 2010b). Sie beschreibt ein Mindestinstrumentarium, das es ermöglicht eine mögliche biologische Wirkung umweltgefährlicher Abfallinhaltsstoffe zu erfassen. Für die Auswahl der am besten geeigneten Tests wurden die folgenden Kriterien angelegt:

- Sowohl Eluat- als auch Feststofftests sollten vertreten sein (DIN 14735);
- Aus Praktikabilitätsgründen wurden nur drei Tests pro Kompartiment festgelegt;
- Die Testorganismen sollten jeweils die wichtigsten Organismengruppen (Mikroben, Pflanzen, Tiere) repräsentieren, wodurch zugleich verschiedene taxonomische und physiologische Gruppen sowie trophische Ebenen abgedeckt wurden;
- Fischtests wurden nicht in die Testbatterie aufgenommen, teils aus Tierschutzgründen, teils aufgrund der großen, für diese Tests notwendigen Eluatmenge;
- Nur standardisierte ISO- und/oder CEN- Methoden wurden berücksichtigt;
- Ausreichende Erfahrung zum Einsatz dieser Tests in der Abfallbeurteilung sollte vorliegen, um entsprechende belastbare Testergebnisse zu erhalten;
- Die getesteten Parameter sollten ausreichend empfindlich sein;
- Zudem sollte die ausgewählte Batterie durch eine hohe Praktikabilität bzw. einen geringen Aufwand gekennzeichnet sein; speziell in Hinsicht auf eine möglichst kurze Testdauer, den Verzicht auf aufwändige Geräteausstattung und eine hohe Zahl von Laboratorien in Europa, die die jeweiligen Tests durchführen können.

Die in Tabelle 3 aufgeführten aquatischen und terrestrischen Tests sind nach heutigem Kenntnisstand diejenigen Verfahren, die die obigen Kriterien am besten erfüllen. Zudem liegen für alle ausreichend Erfahrungen mit der Testung von Abfällen vor. Andere Testverfahren, die zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend standardisiert sind, könnten die vorgestellte Testbatterie ergänzen oder bestehende Tests ersetzen, wenn entsprechende Erfahrungen vorliegen.

Tabelle 3: Testbatterie für die Abfallklassifikation in Spiegeleinträgen nach HP14

Methoden für die Untersuchung von Abfalleluaten	
Beschreibung und Dauer der Tests	Referenz
Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von <i>Vibrio fischeri</i> (Leuchtbakterientest) (0,5 h)	DIN 11348-1/2/3
Süßwasseralgen-Wachstumshemmtest mit <i>Desmodesmus subspicatus</i> und <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (72 h)	DIN 8692
Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) - Akuter Toxizitäts-Test (48 h)	DIN 6341
Methoden für die Untersuchung von Abfallproben	
Feststoff-Kontakttest auf der Grundlage der Dehydrogenaseaktivität von <i>Arthrobacter globiformis</i> (6 h)	ISO 18187
Bestimmung der Wirkung auf die Bodenflora - Teil 2: Wirkung von Stoffen auf das Wachstum von <i>Brassica rapa</i> (14 d)	DIN 11269-2
Prüfung der Bodenbeschaffenheit auf das Verhalten - Prüfung mit Regenwürmern (<i>Eisenia fetida</i> oder <i>Eisenia andreii</i>) (48 h)	DIN 17512-1

Bei der Durchführung der ökotoxikologischen Tests wird davon ausgegangen, dass die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Abfalls bzw. des Abfalleluates einen Einsatz in den Biotests ermöglichen. Besondere Eigenschaften wie beispielsweise Eluate mit starker Eigenfärbung oder Abfallproben mit hohen Nährstoffgehalten können eine Ausweitung der Testbatterie erforderlich machen.

6.1.4 Bewertung der Testergebnisse

Zur Bewertung der Testergebnisse wird ermittelt, ob die Effektkonzentration (EC50) $\leq$ einem Testsubstratanteil von 10% ist (ECX-Ansatz) (vgl. DIN 17616). Die Festlegung einer bestimmten Verdünnungsstufe als Grenzkonzentration entfällt damit (Deutsches Institut für Bautechnik 2008). Beim Überschreiten dieser Grenzkonzentration ($\leq 10\%$ der jeweiligen EC50) liegen eindeutig negative Wirkungen auf die jeweiligen Testorganismen vor.

Einen Sonderfall stellt die Beurteilung des genotoxischen Potentials von Abfällen dar. Dieses wird durch das Kriterium HP 11 "mutagen" abgedeckt, aber nur für einzelne Inhaltsstoffe. Aufgrund möglicher Interaktionen zwischen diesen Stoffen bzw. der Auswirkungen unbekannter Stoffe in den Abfällen sollte ein Test mit dem Abfalleluat zur Bestimmung des genotoxischen Potentials durchgeführt werden: entweder der umu- (DIN 13829) oder der Ames Test (DIN 11350). Die Beurteilung erfolgt unabhängig von den anderen Tests (Römbke et al. 2009).

6.2 Detaillierte ökotoxikologische Charakterisierung von Abfällen

6.2.1 Generelle Maßnahmen

Neben der HP14-Klassifikation von Abfällen in Spiegeleinträgen kann es notwendig werden, Abfälle detailliert ökotoxikologisch zu charakterisieren. Diese umfassendere Untersuchung ist dann wichtig, wenn ein Abfall aufgrund von Feststoffgehalten als gefährlich nach HP14 eingestuft ist, der Abfallbesitzer aber dessen ökotoxikologische Unbedenklichkeit nachweisen will. Diese ökotoxikologische Charakterisierung kann zudem für die Bewertung von Abfällen eingesetzt werden, die aufgrund ihrer Herkunft oder Zusammensetzung nicht zweifelsfrei als nicht-gefährlich einzustufen sind. Die hier vorgeschlagene Teststrategie sollte auch eingesetzt werden, wenn die Untersuchung von Abfällen in Spiegeleinträgen aufgrund besonderer Abfalleigenschaften (z.B. stark getriebte Eluate) nicht möglich ist oder zu unklaren Ergebnissen geführt hat. Die Ökotoxizität des Abfalls sollte mittels Dosis-Wirkungsbeziehungen (d.h. dem ECx-Ansatz) ermittelt werden (Abb. 2). Durch den stufenweisen Aufbau (z.B. Abbruch der Tests nach Auftreten von Wirkungen) ist er kosten- und zeitoptimiert.

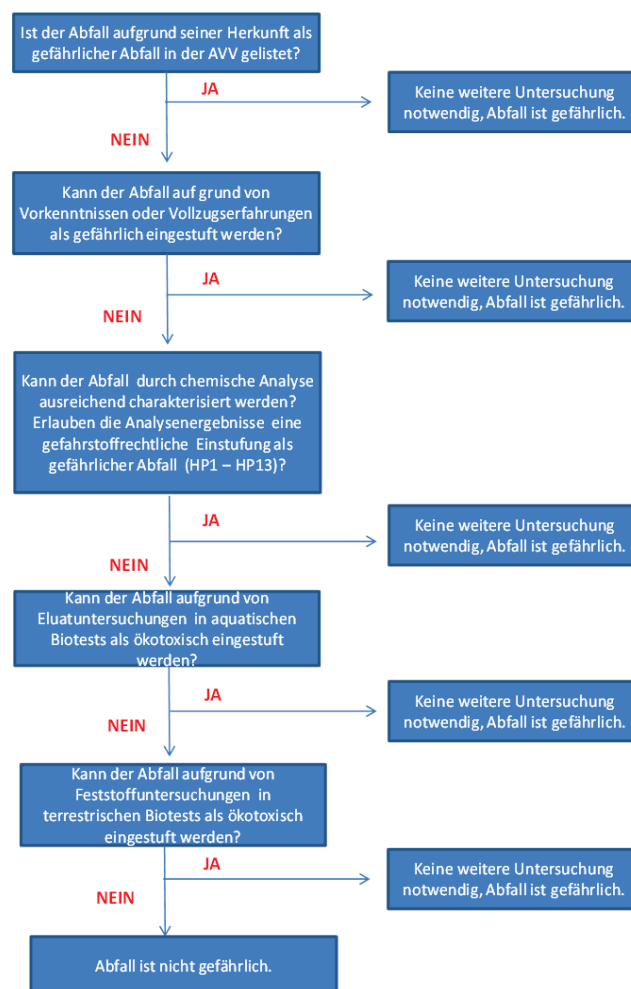


Abb. 2 Teststrategie zur Identifikation gefährlicher Abfälle

6.2.2 Auswahl der Testverfahren

Die Auswahl der biologischen Testverfahren beruht auf der Methodensammlung der CEN TC 292 WG7 und den Erfahrungen aus dem europäischen Ringtest (Moser & Römbke 2009). In der vorgeschlagenen Testbatterie kommen sowohl aquatische (inklusive eines Genotoxizitätstests) als auch terrestrische Verfahren zum Einsatz (Tab. 4). Dabei ist zu beachten, dass aus Gründen mangelnder Sensitivität der akute Regenwurmtest gestrichen wurde.

Tabelle 4: Testbatterie für die Identifikation gefährlicher Abfälle

Testmethoden für die Untersuchung von Abfalleluaten	
Beschreibung	Referenz
Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) – Akuter Toxizitäts-Test	DIN 6341
Süßwasseralgen-Wachstumshemmtest mit <i>Desmodesmus subspicatus</i> und <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	DIN 8692
Bestimmung der toxischen Wirkungen von Inhaltsstoffen und Abwasser auf Wasserlinsen (<i>Lemna minor</i>), Wachstumshemmtest	DIN 20079
Bestimmung der Gentoxizität von Wasser und Abwasser mit dem umu-Test	DIN 13829
Bestimmung der Langzeit-Toxizität von Stoffen gegenüber <i>Daphnia magna</i> (Cladocera, Crustacea)	ISO 10706
Testmethoden für die Untersuchung von Abfallproben	
Beschreibung	Referenz
Vermeidungsprüfung zum Prüfen der Bodenbeschaffenheit und der Auswirkungen von Chemikalien auf das Verhalten – Prüfung mit Regenwürmen (<i>Eisenia fetida</i> und <i>Eisenia andreii</i>)	DIN 17512-1
Bestimmung der Wirkung von Schadstoffen auf die Bodenflora – Teil 2: Wirkung auf das Wachstum von <i>Brassica rapa</i>	DIN 11269-2
Arthrobacter globiformis-Kontakttest für kontaminierte Feststoffe	ISO 18187
Hemmung der Reproduktion von Collembolen (<i>Folsomia candida</i>) durch Bodenschadstoffe	DIN 11267

6.2.3 Bewertung der Ergebnisse

Zur Basischarakterisierung wird die Abfallprobe in einer Verdünnungsreihe untersucht und der EC50-Wert bestimmt (Tabelle 5). Der untersuchte Abfall wird als gefährlich eingestuft, wenn sich bei mindestens einem der durchgeführten Tests ein ökotoxisches Potenzial nachweisen lässt. Dies ist auch dann immer der Fall, wenn das Eluat ein gentoxisches Potenzial besitzt. Bis zur Vorlage spezifischer Erfahrungen mit diesen Tests wird davon ausgegangen, dass auch hier eine Grenzkonzentration von <10% Testsubstrat anzuwenden ist (Pandard & Römbke 2013).

Tabelle 5: Messparameter und Wirkschwellen für die Methoden der Testbatterie

Kompartiment	Testorganismus	Referenz	Parameter
Eluatunter-suchung	<i>Desmodesmus subspicatus</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	DIN 8692	Wachstum
	<i>Daphnia magna</i>	DIN 6341	Immobilisation
	<i>Lemna minor</i>	DIN 20079	Wachstum
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ISO 13829	Geninduktion
	<i>Daphnia magna</i>	ISO 10706	Reproduktion
Feststoffuntersuchung	<i>Eisenia andrei</i> , <i>E. fetida</i>	DIN 17512-1	Verhalten
	<i>Brassica rapa</i>	DIN 11269-2	Wachstum
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	ISO 18187I	Enzymaktivität
	<i>Folsomia candida</i>	DIN 11267	Reproduktion

7 Ökotoxikologische Charakterisierung im Rahmen einer Risikobewertung von Abfallentsorgungsszenarien

7.1 Allgemein

Der Einsatz biologischer Testmethoden erlaubt eine Bewertung der Umweltgefährlichkeit von Abfällen. Zwar werden die Testverfahren unter Bedingungen durchgeführt, doch ist eine Übertragung der biologischen Effekte im Test auf die belebte Umwelt bei umweltoffenen Verwertungsmaßnahmen möglich. Für eine Betrachtung des Risikos der Abfallverwertung ist es besonders wichtig, dass die Teststrategie an die zu erwartenden Rahmenbedingungen angepasst wird. Ziel der Teststrategie muss es sein, die wesentlichen Expositionspfade zu erfassen und vor allem durch geeignete Elutionsmethoden und biologische Testverfahren auf ihre Umweltwirkung hin zu untersuchen. Diese Vorgehensweise erfordert mehr Kenntnisse und Erfahrung bei der Festlegung der Teststrategie als bei der Klassifikation von Abfällen und kann daher nicht als eine Routineuntersuchung von Abfällen betrachtet werden.

7.2 Teststrategie

Die Komplexität der Teststrategie wird durch die Abfallart und den geplanten Verwertungsweg bestimmt (Abbildung 3). Sollte vor der Risikobewertung eine ökotoxikologische Charakterisierung des Abfalls (siehe Kapitel 6.2) durchgeführt worden sein, so können diese Erkenntnisse in die Festlegung der Teststrategie integriert werden. Besonders wichtig sind die Auswahl eines geeigneten Elutionsverfahrens und die am Untersuchungsziel ausgerichtete Zusammenstellung der Biotestbatterie. Eine Sammlung für die Abfalluntersuchung geeigneter Testverfahren kann Anhang B der DIN 14735 entnommen werden. Der Umfang und die Zusammensetzung der notwendigen Testbatterie orientieren sich an den Leitkomponenten und Eigenschaften des Abfalls. Bei einer Risikobewertung von Abfällen sollten ausreichend differenzierte Verdünnungsreihen durchgeführt werden, da nicht für alle Abfälle eine eindeutige Beziehung zwischen Dosis und Wirkung besteht. Es ist klarzustellen, dass diese Teststrategie nur ein Element der Abfallbewertung ist, auch wenn der Abfall nicht als ökotoxisch eingestuft wird, ist es möglich, dass er die Anforderungen an eine schadlose

Verwertung nicht erfüllt. Bei der grundlegenden Bewertung des zu verwertenden Abfalls kann es in Abhängigkeit der Festlegung der Teststrategie durch den Abfallbesitzer oder die zuständige Behörde zu einer abweichenden Vorgehensweise kommen. Aus diesem Grund wird angeregt, die Erfahrungen und Erkenntnisse über diese umfassenden Untersuchungen in den entsprechenden Gremien (z.B. Länderarbeitsgemeinschaft Abfall) auszutauschen bzw. eine Publikation anzustreben.

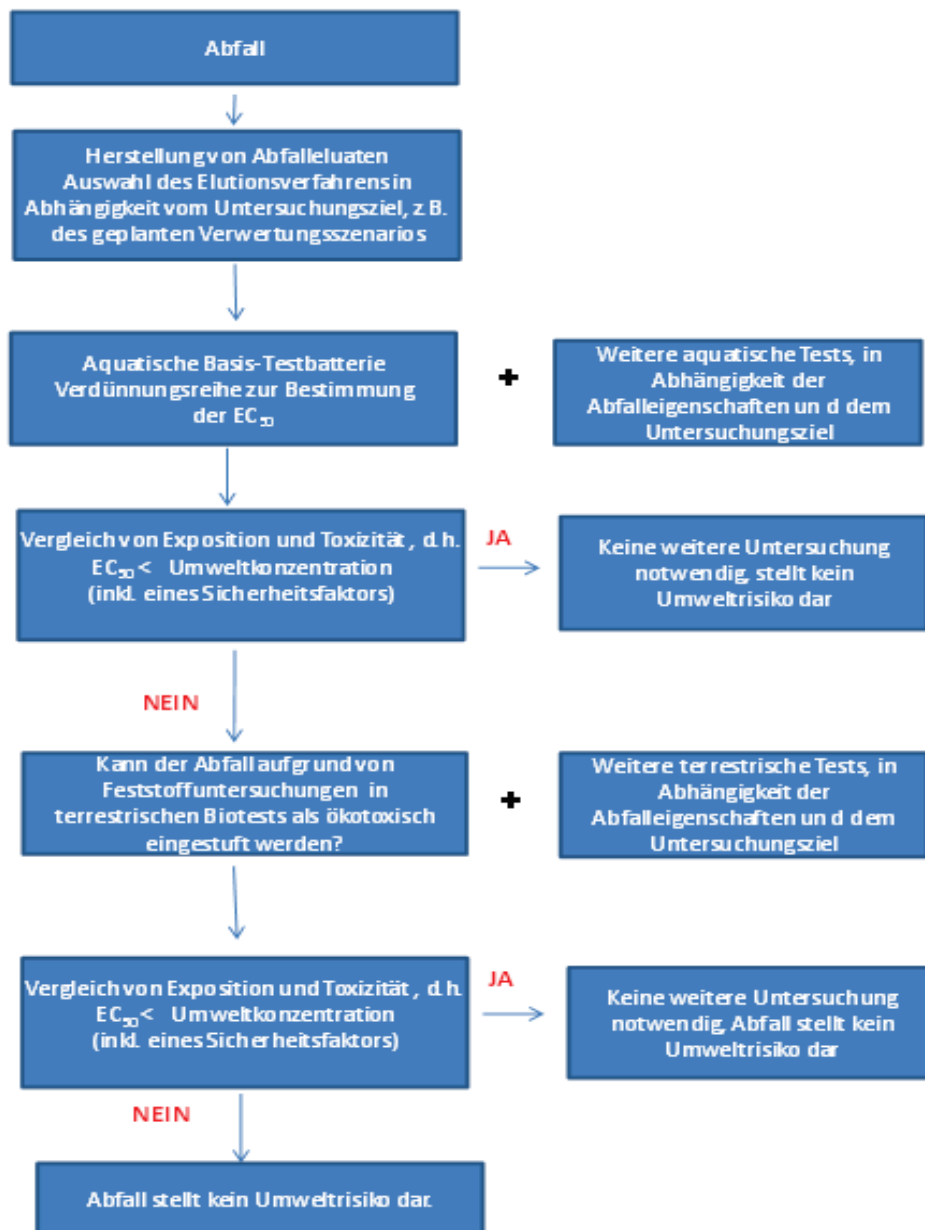


Abb. 3 Strategie für die ökotoxikologische Testung als Teil der Umweltrisikobeurteilung von Abfällen

7.3 Auswahl der Testverfahren

Die Testbatterie für eine Risikobewertung von Abfällen muss sowohl für die Eluat- wie auch die Feststoffuntersuchung Testorganismen aus drei trophischen Ebenen (Destruenten, Konsumenten und Produzenten) umfassen. Dabei müssen die für die Verwertung als relevant identifizierten Belastungspfade abgedeckt werden, d.h. es muss der wassereluierbare Anteil in aquatischen Testverfahren ermittelt werden und die unmittelbare Toxizität des Abfalls in Feststofftests. Es ist besonders wichtig, dass Testmethoden mit langen Expositionszeiten zur Bestimmung chronischer Wirkungen eingesetzt werden. In Tabelle 6 ist eine Liste biologischer Testverfahren aufgeführt, die bereits erfolgreich in der Abfalltestung eingesetzt wurden (chronische Tests aus der Abfallklassifikation bzw. der detaillierteren Charakterisierung (vgl. Kap. 6.1.3 bzw. 6.2.3 sind dabei nicht noch einmal aufgeführt). Der Einsatz weiterer Testverfahren wie z.B. des Fischeitest (OECD 212) für Eluate oder der Raubmilbentest (OECD 226) für Feststoffe ist zwar möglich, doch sollte deren Eignung für Abfälle vorab geklärt werden.

Tabelle 6: Chronische Testverfahren für die Untersuchung von Abfällen

Testmethoden für die Untersuchung von Abfalleluaten	
Beschreibung	Referenz
Wasserbeschaffenheit - <i>Pseudomonas putida</i> Wachstumshemmtest (Pseudomonas-Zellvermehrungshemmtest)	DIN 10712
Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der chronischen toxischen Wirkung nach 48 Stunden gegenüber <i>Brachionus calyciflorus</i>	ISO 20666
Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der chronischen toxischen Wirkung gegenüber <i>Ceriodaphnia dubia</i>	ISO 20665
Testmethoden für die Untersuchung von Abfallproben	
Beschreibung	Referenz
Bodenbeschaffenheit - Wirkung von Schadstoffen auf Regenwürmer (<i>Eisenia fetida</i>) - Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung	DIN 11268-2
Bodenbeschaffenheit - Wirkung von Schadstoffen auf Enchytraeidae (<i>Enchytraeus</i> sp.) - Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung und das Überleben	DIN 16387

7.4 Bewertung der Testergebnisse

Die Ergebnisse der biologischen Untersuchungen müssen im Kontext des Verwertungsszenarios bewertet werden. Eine generell gültige Grenzkonzentration ist dabei nicht verwendbar, da bei umweltoffenen Verwertungen die Höhe der jeweiligen Exposition (und deren Verhältnis zu den gemessenen Wirkungen, ausgedrückt z.B. als EC50-Wert) entscheidend für die Bewertung ist. Darüber hinaus kann es in Abhängigkeit von der Fragestellung wichtig sein, die Erkenntnisse aus der biologischen Wirkungsanalyse auf einen relativ langen Zeitraum zu extrapolieren. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, chronische Effekte bzw. deren Grenzkonzentrationen in Langzeituntersuchungen zu ermitteln.

8 Literaturverzeichnis

8.1 Richtlinien

- DIN 6341 Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der Hemmung der Beweglichkeit von *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Akuter Toxizitäts-Test. Berlin.
- DIN 8692: Wasserbeschaffenheit: Süßwasseralgen-Wachstumshemmtest mit *Desmodesmus subspicatus* und *Pseudokirchneriella subcapitata*. Berlin.
- DIN 10706: Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Langzeit-Toxizität von Stoffen gegenüber *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Berlin.
- DIN 10712: Wasserbeschaffenheit - *Pseudomonas putida* Wachstumshemmtest (Pseudomonas-Zellvermehrungshemmtest). Berlin.
- DIN 11267: Bodenbeschaffenheit - Hemmung der Reproduktion von Collembolen (*Folsomia candida*) durch Bodenschadstoffe. Berlin.
- DIN 11268-1: Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*) – Teil 1: Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität unter Verwendung von künstlichem Bodensubstrat. Berlin.
- DIN 11268-2: Bodenbeschaffenheit - Wirkung von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*) - Teil 2: Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung. Berlin.
- DIN 11269-2: Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der Wirkung von Schadstoffen auf die Bodenflora – Teil 2: Wirkung von Stoffen auf den Auflauf und das Wachstum höherer Pflanzen. Berlin.
- DIN 11348-1/2/3 Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest). Berlin.
- DIN 11350. Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Gentoxizität von Wasser und Abwasser - Verfahren mittels Salmonella/Microsom-Fluktuationstest (Ames-Fluktuationstest). Berlin.
- DIN 12457-2 Charakterisierung von Abfällen - Auslaugung; Übereinstimmungsuntersuchung für die Auslaugung von körnigen Abfällen und Schlämmen - Teil 2: Einstufiges Schüttelverfahren mit einem Flüssigkeits-/Feststoffverhältnis von 10 l/kg und einer Korngröße unter 4 mm (ohne oder mit Korngrößenreduzierung. Berlin.
- DIN 13829: Bestimmung der Gentoxizität von Wasser und Abwasser mit dem umu-Test. Berlin.
- DIN 14735: Charakterisierung von Abfällen - Herstellung von Abfallproben für ökotoxikologische Untersuchungen. Berlin.
- DIN 15442 Feste Sekundärbrennstoffe – Verfahren zur Probenahme. Berlin.
- DIN 16387: Bodenbeschaffenheit - Wirkung von Schadstoffen auf Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) - Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung und das Überleben. Berlin.
- DIN 17512-1: Bodenbeschaffenheit - Vermeidungsprüfung zum Prüfen der Bodenbeschaffenheit und der Auswirkungen von Chemikalien auf das Verhalten - Prüfung mit Regenwürmern (*Eisenia fetida* und *Eisenia andrei*). Berlin.
- DIN 17616. Bodenbeschaffenheit - Anleitung für die Auswahl und Beurteilung von Bioprüfverfahren zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Böden und Bodenmaterialien. Berlin.

- DIN 19528. Elution von Feststoffen - Perkulationsverfahren zur gemeinsamen Untersuchung des Elutionsverhaltens von organischen und anorganischen Stoffen für Materialien mit einer Korngröße bis 32 mm - Grundlegende Charakterisierung mit einem ausführlichen Säulenversuch und Übereinstimmungsuntersuchung mit einem Säulenschnelltest. Berlin.
- DIN 19698-1: Abfalluntersuchung – Probenahme von festen und stichfesten Abfällen – Teil 1 Anleitung für die segmentorientierte Entnahme von Proben aus unbekannten Haufwerken, Entwurf. Berlin.
- DIN 20079: Wasserbeschaffenheit – Bestimmung der toxischen Wirkungen von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser auf Wasserlinsen (*Lemna minor*) – Wachstumshemmtest. Berlin.
- DIN 66165 Teil 1 Partikelgrößenanalyse Siebanalyse Grundlagen. Berlin: Beuth-Verlag April 1987
- [EC] European Commission 1967. Council Directive 67/548/EEC of 27 June 1967 of the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal of European Communities, 196, 16.8.1967, p 1-98.
- [EC] European Commission 2000. Commission Decision of 3 May 2000 replacing Decision 94/3/EC establishing a List of Wastes pursuant to Article 1(A) of Council Directive 75/442/EEC on waste and Council Decision 94/904/EC establishing a list of hazardous waste pursuant to Article 1(4) of Council Directive 91/689/EEC on hazardous waste (notified under Document Number C(2000) 1147).
- [EC] European Commission 2008a. Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives, Official Journal of the European Union L312, 22.11.2008, p 3-30.
- [EC] European Commission 2008b. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006, Official Journal of the European Union L 353, 31.12.2008, p 1-1355.
- ISO 18187 Soil quality – Quality of solid samples – Solid contact test using the dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis*. Geneva.
- ISO 20665: Water quality - Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. Geneva.
- ISO 20666: Water quality - Determination of the chronic toxicity to *Brachionus calyciflorus* in 48 h. Geneva.
- LAGA PN 98, 2004. Richtlinie für das Vorgehen bei physikalischen, chemischen und biologischen Untersuchungen im Zusammenhang mit der Verwertung/ Beseitigung von Abfällen.
- LAGA-Methodensammlung Abfalluntersuchung 2012. Version 2.0, Stand 01. Oktober 2012.
- OECD 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. Guideline for the testing of chemicals. Paris, France.
- OECD 226: Predatory mite (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) reproduction test in soil. Guideline for the testing of chemicals. Paris, France.
- OECD 315: Bioaccumulation in sediment-dwelling benthic oligochaetes. Guideline for the testing of chemicals. Paris, France.
- OECD 317: Bioaccumulation in terrestrial oligochaetes. Guideline for the testing of chemicals. Paris, France.

8.2 Publikationen

- Deutsches Institut für Bautechnik 2008. Merkblatt für die Bewertung der Auswirkungen von Bauprodukten auf Boden und Grundwasser. Berlin.
- Ehrlichmann, H., Dott, W., Eisenträger, A. 2000. Assessment of the Water-Extractable genotoxic potential of soil samples from contaminated sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46: 73-80.
- Gy 1979: Sampling of particulate materials – Theory and practice, Elsevier.
- Gy 1992: Sampling of heterogeneous and dynamic material systems, in *Data Handling in Science and Technology*, Vol 10, Elsevier, Amsterdam.
- Moser, H. 2008. Handlungsempfehlungen zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen. Entwurf, Stand September 2008
- Moser, H., Römbke, J. 2009. Ecotoxicological characterization of waste - Results and experiences of an European ring test. Springer Ltd., New York. 308 pp.
- Pandard P, Devillers J, Charissou AM, Poulsen V, Jourdain MJ, Féraud J-F, Grand C, Bispo A. 2006.: Selecting a Battery of Bioassays for Ecotoxicological Characterization of Wastes. *Science of the Total Environment* 363:114-125.
- Pandard, P., Römbke, J. 2013. Proposal for a "Harmonized" Strategy for the Assessment of the HP 14 Property. *Integ. Envir. Assess. Manag. (IEAM)* In Press.
- Römbke, J., Moser, TH. & Moser, H. 2009. Ecotoxicological characterization of 12 incineration ashes (MWI) using 6 laboratory tests. *Waste Management* 29: 2475-2482.
- Römbke, J., Moser, Th., Neumann-Hensel, H. & Ketelhut, R. 2010a. Identifikation umweltgefährlicher Abfälle in Spiegeleinträgen der AVV. Bericht für das Umweltbundesamt, FKZ 3708 31 300, 124 S.
- Römbke, J., Jänsch, S. Meier, M., Hilbeck, A., Teichmann, H. & Tappeser, B. 2010b. General recommendations for soil ecotoxicological tests suitable for the Environmental Risk Assessment (ERA) of Genetically Modified Plants (GMPs). *IEAM* 6: 287-300.

Anhang A: Sieblinie

Materialien mit einem großen Massenteil an Korngrößen > 4 mm eignen sich für die biologische Testung nur beschränkt, da die meisten biologischen Untersuchungen eine Korngröße von $d_{95} < 4$ mm erfordern. Auf ein Brechen des Materials sollte nach Möglichkeit verzichtet werden, da die Brechung neue Oberflächen erzeugt, die die Ökotoxizität des Materials beeinflussen können.

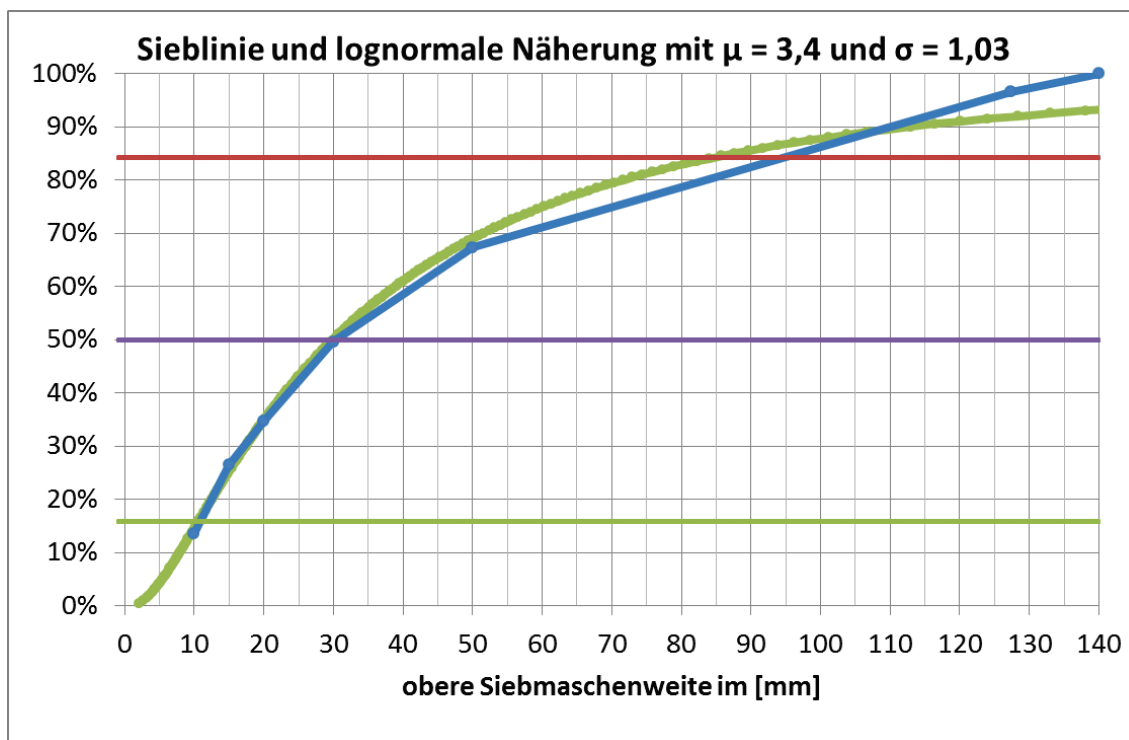
Soll dennoch aus einem Material mit großen Anteilen > 4 mm eine ökotoxikologische Untersuchung durchgeführt werden, so ist es für die Abschätzung der Repräsentativität der Probe sinnvoll, eine überschlägige Sieblinie zu erstellen. Eine volle Siebanalyse nach DIN 66165 ist dafür in der Regel nicht erforderlich. Sie ist auch eher ungeeignet, da es hier im Wesentlichen um Korngrößen > 4 mm geht, während die klassische Siebanalyse Bodenpartikel bis hinunter in den μm -Bereich definiert.

Für die hier erforderlichen Probenmassen von 10 bis zu etwa 50 kg hat sich eine Handsiebung mit Rundlochsieben auf einer Siebfläche von $3 \text{ dm} \times 5 \text{ dm}$ bewährt. Als Siebdurchmesser verwenden wir die Reihe:

4 mm / 5 mm / 10 mm / 15 mm / 20 mm / 30 mm / 50 mm / 100 mm

Um auch des Größtkorn belastbar charakterisieren zu können, achten wir darauf, dass im größten Siebschnitt > 200 Partikel enthalten sind und versuchen, auch eine maximale Korngröße (d_{99}) abzuschätzen.

Mit dieser Vorgehensweise lassen sich beispielhaft folgende Ergebnisse erzielen:





Appendix 2: Recommendations for the Ecotoxicological Characterization of Wastes

Compiled by:

Jörg Römbke, Ralf Ketelhut & Joachim Wuttke

Contact: ECT Oekotoxikologie GmbH

Dr. Jörg Römbke

J-Roembke@ect.de, Tel.: +49 (6145) 956450

Stoffstromdesign (SSD)

Ralf Ketelhut

ketelhut@stoffstromdesign.de, Tel.: +49 (4321) 78 39 211

Federal Environment Agency, Germany

Section III1.5: Municipal Waste Management, Hazardous Waste, Focal Point to the Basel Convention

Dr. Joachim Wuttke

joachim.wuttke@uba.de, Tel.: +49 (340) 2103 3459

26. February 2013

Table of Contents

1	<i>Introduction</i>	56
2	<i>Scope of application</i>	56
3	<i>Legal background</i>	57
4	<i>Scientific background</i>	58
5	<i>Methodology</i>	59
5.1	Terms	59
5.1.1	Effect concentration (EC).....	59
5.1.2	Limit concentration	59
5.1.3	Test design.....	59
5.2	Methodological requirements for the testing of waste.....	60
5.2.1	Sampling and sample preservation	60
5.2.1	Sampling and sample preservation	61
5.2.2	Transport and storage of samples.....	62
5.2.3	Pretreatment of samples	62
5.2.4	Preparation of waste eluates.....	63
5.2.5	Storage of waste eluates	64
5.2.6	pH of waste eluates	64
5.2.7	Control medium	64
6	<i>Test strategies</i>	64
6.1.	Identification of ecotoxicological wastes in mirror entries in the Waste List Ordinance.....	65
6.1.1	General	65
6.1.2	Test strategy	66
6.1.3	Selection of test methods	67
6.1.4	Evaluation of test results	68
6.2	Detailed ecotoxicological characterisation of waste	68
6.2.1	General approach.....	68
6.2.2	Selection of test methods	70
6.2.3	Evaluation of test results	70
7	<i>Ecotoxicological characterisation for assessing the risks of waste management scenarios</i>	71
7.1	General	71

7.2	Test strategy	71
7.3	Selection of test methods	73
7.4	Evaluation of test results	74
8	<i>References</i>	75
8.1	Guidelines	75
8.2	Publications	77
	<i>Annex A: Sieve analysis</i>	78

1 Introduction

This Recommendation is based on the results and experiences gained in an international inter-laboratory ring test on the ecotoxicological characterisation of wastes (Moser & Römbke 2007), the evaluation of analyses of the biological effects of mineral waste, an exchange of experience with CEN TC 292 WG7, and the ecotoxicological screening of a large number of wastes in mirror entries (Römbke et al. 2010a). In addition, numerous standards (e.g. of ISO), technical documents and research reports on the ecotoxicological assessment of complex environmental matrices (waste water, contaminated soil) were taken into account in its preparation, as were, in particular, the recommendations by CEN TC 292 WG 7.

A combination of chemical and biological test methods should be used for the ecotoxicological characterisation of wastes, since a comparison of the results of chemical analyses with existing threshold values is insufficient to derive the hazards posed by waste. Instead, an evaluation of the environmental hazards of waste is possible only by the use of biological test methods, as only these can mirror the effects of all bioavailable contaminants including their potential interactions as well as pollutants in waste which cannot be determined by chemical analysis.

The analysis of available tests of more than 100 waste samples showed that biological test methods produce well repeatable results for heterogeneous waste composites too. Therefore there is reason to assume, that not only effects of single contaminants, but also matrix effects, which are undetectable by chemical analysis, could be detected.

Goal of this recommendation is to support a reliable method base for application-orientated ecotoxicological analysis of wastes, which facilitates the comparability of test results. For this reason this Recommendation focusses on explaining the main outline and giving references to the necessary guidelines instead of going into detail about procedures.

2 Scope of application

This Recommendation contains, firstly, instructions for the selection and use of biological test methods suitable for estimating the ecotoxicological potential of waste and hence, its hazards for the environment, which are based on this criterion. The test strategies it proposes are recommendations and may be supplemented or modified in the light of specific properties of the waste and planned recovery scenarios. Secondly, it summarises standards and methodological experience facilitating an evaluation of the test results. The toxicity criteria indicated, were determined in scientific studies and specifically for the proposed test systems, reflecting the value above which, based on existing experience, a response in a test can be regarded as ecotoxicologically relevant. Further investigations are currently on-going to derive limit concentrations above/below which a waste can be classified as hazardous or non-hazardous.

As well as for the classification of waste, the results of biological analyses can also be used for risk assessment of waste to be recovered. Use of the test methods enables an assessment of potential adverse effects on aquatic and terrestrial ecosystems.

In previous years, as proposed in the first version of this guidance (Moser 2008), extended limit tests have been used for the classification of wastes. Extended limit tests have a shortened and simplified design which means that the waste sample is not tested in a dilution series until no toxicity is observed anymore. Instead, only the limit concentration and those two dilution steps immediately below and above the limit concentration are tested. This shortened assay has the

disadvantage of depending strongly on the limit concentration, which is set in advance and deemed fixed. Additionally, there is no differentiation between a strong or minor divergence of the limit concentration.

Deviating from this proposal, the utilization of a more detailed design is recommended. This design would aim to determine the dilution in which the chosen test parameter (of a given test species) is impaired by 50%. In addition, utilizing an EC50-assay helps harmonizing different law sectors (environmental risk assessment of chemicals, in particular pesticides, follows the same approach) and practices of waste testing in other European countries. France, for example, prefers the EC-assay (Pandard et al. 2006).

3 Legal background

In the European Union, wastes are classified according to the Waste Framework Directive (WFD) 2008/98/EC (EC 2008a). The European Waste List (EWL, Decision 2000/532/EC (EC 2000) and its amendments) is a harmonized list of waste types which groups wastes by source or generation process. In its applicable version the EWL is an EU-wide nomenclature system for. The European Waste List was transposed into German law in 2002 by the Waste List Ordinance (Abfallverzeichnisverordnung, AVV) and comprises 839 waste codes in 20 waste chapters including 405 wastes marked as hazardous and about 200 wastes in so-called “mirror entries”.

Mirror entries consist of pairs of entries of which one waste may be classified as hazardous or non-hazardous according to the type and concentration of the pollutants it contains. Wastes classified as hazardous are marked with an asterisk “*”. The majority of mirror entries refer to the term “hazardous substances” while some describe “hazardous properties” or the specific hazardous waste component (see Table 1).

To differentiate between hazardous and non-hazardous wastes in mirror entries, the European Waste List specifies 15 hazard criteria which are used for assessment and are based on European hazardous-substances legislation (Directive 67/548/EEC (EC 1967)). One of the hazard criteria (HP14 “ecotoxic” – substances and preparations which present or may present immediate or delayed risks for one or more sectors of the environment) describes the ecotoxicological potential or environmental hazards, as an intrinsic property of waste. In the Basel Convention on the Control of Transboundary Movements of Hazardous Wastes and Their Disposal, criterion H 12 (“ecotoxic - substances or wastes which if released present or may present immediate or delayed adverse impacts to the environment by means of bioaccumulation and/or toxic effects upon biotic systems”) likewise requires an assessment of the ecotoxicological potential of waste.

Table 1: Examples of mirror entries from the European Waste List

Example 1	
19 01 11*	Bottom ash and slag containing dangerous substances
19 01 12	Bottom ash and slag other than those mentioned in 19 01 11
Example 2	
10 08 10*	Dross and skimmings that are flammable or emit, upon contact with water, flammable gases in dangerous quantities
10 08 11	Dross and skimmings other than those mentioned in 10 08 10
Example 3	
06 03 11*	Solid salts and solutions containing cyanides
06 03 13*	Solid salts and solutions containing heavy metals
06 03 14	Solid salts and solutions other than those mentioned in 06 03 11 and 06 03 14

4 Scientific background

Biological test methods utilise the capacity of specific organisms to respond to exposure of pollutants under standardised conditions by a change in their vital functions. The sensitivity of biological test organisms to toxic waste constituents may vary significantly from species to species. The combination of different test methods in a so-called test battery must therefore include organisms belonging to different taxonomic groups and representing different trophic levels. The object here is to cover a sensitivity range as broad as possible and at the same time to get an impression of potential impacts on the ecological functions of both aquatic and terrestrial organisms. The test methods should comprise different effect criteria and cover both acute and chronic toxicity as well as genotoxicity. Test methods to be applied in enforcement practice must also meet various additional requirements, regardless of the test subject (chemical, composite, genetically modified organism). They must be standardised, sufficiently sensitive, easy to handle and economically feasible (Roembke et al. 2010b). In addition, it is essential that experience exists for each test system as regards specific requirements in the testing of waste and waste eluates.

The battery of tests proposed in this Recommendation enables a reliable, valid and reproducible determination of hazard criterion HP14 “ecotoxic” and thus allows wastes in mirror entries to be identified as hazardous in terms of that hazard criterion. This determination of intrinsic waste properties is not sufficient to define requirements for a disposal that is environmentally sound and compatible with the public interest or for proper and safe recovery, but instead will often have to be supplemented by further investigations. This may include, for example, the integration of possible exposure scenarios in a risk assessment when utilisation in an open system envisaged or in the permitting of waste treatment plants.

The use of biological test methods allows conclusions to be drawn as to the direct acute and chronic toxicity to the test organisms and, approximately, to biologically similar organisms. They do not, or not fully, cover hazards for the abiotic environmental spheres soil, water or the climate. The environmental hazards of persistent pollutants, which cause damage by accumulating in environmental compartments and food chains, can be determined by physical-chemical methods or suitable bioaccumulation tests (e.g. OECD 315; OECD 317). Waste constituents with global warming potential, on the other hand, can only be identified by chemical analysis.

The assessment of the published work on the ecotoxicological testing of wastes of the last 20 years, showed a continuous increase in publications. Nevertheless, a wide range of wastes and test methods (especially for the creation of eluates) is covered in these publications. The heterogeneity of the published data concerning the ecotoxicity of wastes complicates the comparison and simplification of the obtained results. However, it can be concluded that the current ISO-guidelines are suitable for the ecotoxicological characterization of a multitude of solid and liquid (slurry included) wastes. The results of the ecotoxicological tests differ significantly depending on the characteristics of the evaluated waste, which makes it possible to utilize them to differentiate between ecotoxic and non-ecotoxic wastes.

5 Methodology

This Recommendation is based on standard methods used originally for the testing of soil, waste water or chemicals and subsequently developed further for the ecotoxicological characterisation of wastes. These bioassays as well as supplementary guidance on sample collection and preparation are summarised in CEN 14735. For sample collection and preparation, further standard methods and technical instructions are available (see the compilation of ISO-test methods for the evaluation of contaminated soils or soil eluates (ISO 17616)). Up until today, there is no proposition for the standardization of procedures on the various levels of European and national norms and working instructions (e.g. LAGA PN 98). Some specific features of effects-related testing of waste are pointed out in the following section. This information cannot replace the description of the various methodological steps in the relevant standards.

5.1 Terms

5.1.1 Effect concentration (EC)

The ecotoxicity of waste is determined by biological tests, and expressed as an EC50. It is defined as the concentration of a dilution series in which the measured parameter complies 50% of the control concentration (ISO 11269-2).

5.1.2 Limit concentration

“Limit concentration” describes the EC50-value which determines whether a tested waste has to be classified as “harmful” according to the HP14 criterion. With reservations to the final draft, it is proposed in this guidance that the limit concentration should be defined as the concentration of the potentially harmful substance in waste, at which the EC50 of said substance is smaller than the concentration in a 10% dilution (Pandard & Römbke 2013). This proposal is applicable in solid matter and eluate testing.

5.1.3 Test design

The EC50-value is determined by a “Dose-Response-Design”, which has to consist of no less than five different dilutions. Waste eluates which are tested in aquatic systems are mixed with test-specific dilution water, as opposed to samples of solid waste originating from terrestrial systems which are mixed with the corresponding control medium (e.g. artificial soil, standard soil or quartz sand.) The dilution series to be tested mostly consist of nested geometric sets on the basis of the numbers 2 and 3, although other factors can be set according to the range of the tested chemical (Table 2).

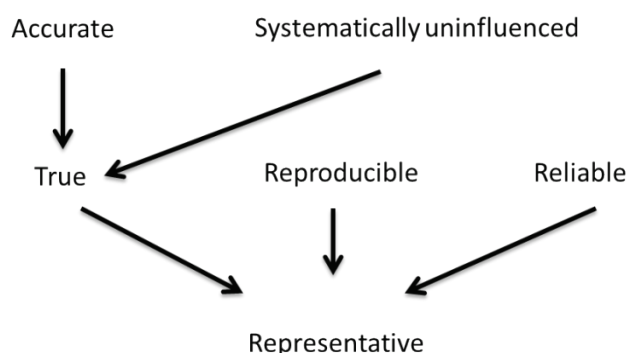
Table 2: Sample calculation for the sample concentration in the assays for the dilution-series

Series A			Series B		
LID-Value	Dilution	Sample concentration in test medium [%]	LID-Value	Dilution	Sample concentration in test medium [%]
2	1:2	50	1,5	1:1,5	66,667
4	1:4	25	3	1:3	33,334
8	1:8	12,5	6	1:6	16,667
16	1:16	6,25	12	1:12	8,334
32	1:32	3,125	24	1:24	4,167
64	1:64	1,562	48	1:48	2,084
etc.	etc.	etc.	etc.	etc.	etc.

5.2 Methodological requirements for the testing of waste

5.2.1 Sampling and sample preservation

Collecting representative samples from heterogeneous composite wastes still poses several difficulties. The same can be said for the chemical analysis, in which the creation of reproducible data for certain parameters; e.g. concentration of heavy metals, is comparatively difficult. The federal Working Group on Waste (LAGA) does not regard the sampling method for solid wastes as representative, but redefines it as a sampling method for the characterization of waste (PN 98, page 5f). Goal of the characterizing sampling method for waste is to collect ascertained data about the material quality, via test results. For the LAGA the representativeness of attributes depends on the following aspects:



The attributes used are defined as follows:

Accurate:	Variance of measurement deviation is below a given limit
Systematically uninfluenced	Free of systemic (scale shifting) errors
True	Accurate and systemically uninfluenced
Reproducible	Repetition creates statistically identical results
Reliable	The risk of misjudgement is smaller than a default value

LAGA reacts to these requirements in the PN 98 by advising to increase the number of samples in order to model parameter-specific variations. This approach was incorporated in DIN 19698. For biological tests this means that all investigations have to be checked concerning their reproducibility as well as their reliability. Assuming that the quality of the test material is comparable it is possible to compile the variance found in various analytical measurements and compare with a given threshold value. Regarding the reliability a value of 95% is striven for.

5.2.1 Sampling and sample preservation

The CEN standard 14735 “Characterization of waste – preparation of waste samples for ecotoxicity tests” refers to an unfinished (work in progress) standard of the CEN/TC 292/WG. It has not yet been concluded. The DIN has submitted the draft standard DIN 19698-1; “Testing of waste – Sampling of solid and set wastes – Part 1: Manual for the segment-oriented collection of samples of unknown heaps.” in October 2012. This draft is based mainly on the LAGA PN 98 “Guideline for the physical, chemical and biological examination of wastes, in reference to its utilization/disposal”. This approach does not coincide with the theoretical background, set in the European standards, e.g. DIN 15442 in CEN/TC 343 “Solid secondary fuels – sampling method”.

In the light of the relevant literature, guidance documents and guidelines (Gy 1979, Gy 1992, LAGA PN 98, DIN 15442, DIN 19698, LAGA 2012) and with regard to a sufficient reliability and justifiable efforts, the following procedure is recommended for the sampling for the ecotoxicological testing of wastes

1. In a laboratory sample the mass above the 20th percentile of the sieve analysis should be represented by more than 20.000 particles.
2. Any sampling should ideally be performed at random points in time across the whole transversal section of the particle mass flow falling from a conveyor belt. In case this is not possible the sampling should be performed from the heap of waste.
3. When taking samples from a heap of waste, it should be secured that no phase separation did occur during the set-up of the heap.
4. Independently from the size of the basic population, 16 individual samples have to be taken.
5. The individual samples should be random samples. In other words: each particle of the basic population should have the same probability to be part of an individual sample.

6. Sampling from a heap of waste could be performed using a wheel loader. The 16 samples taken this way should be combined to a nearly two dimensional flat layer providing a height of 1 – 1.5 dm. Individual samples could be randomly taken from random coordinates of this two-dimensional layer.
7. All individual samples should be combined to one mixed sample, i.e. the laboratory sample.
8. A sample size reduction without a previous reduction in particle size is not allowed.

In addition, it should be noted that waste often undergoes chemical, physical and biological changes after having been sampled. Therefore, potential changes need to be taken into account, and sampling conditions should be such that the impact of such changes on the results of bioassays is minimised. The addition of preservatives (e.g. acids) for the purpose of delaying chemical and biological processes does not conform to the relevant standard.

5.2.2 Transport and storage of samples

The transport of waste samples should be as short as possible. Changes in the properties of the samples should be prevented. The transport period must be considered to be part of the storage period, and a transport period below 48h and/or a low temperature of $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ must be adhered to. The samples should not be stored for longer than two months. Should longer storage be necessary, possible changes to the waste samples during storage have to be determined by accompanying physical, chemical or biological analysis of waste-specific parameters.

5.2.3 Pretreatment of samples

Any reduction in size of the waste particles ends up in producing new surfaces and, thus, in a modification of the ecotoxicological properties of the test material. Therefore, it should be avoided if possible.

For waste material with a $d_{95} > 4 \text{ mm}$ but with a relevant percentage in mass of material $< 4 \text{ mm}$ it is possible to get information on its ecotoxicological properties from the sieving fraction $< 4 \text{ mm}$, taking the mass fraction into account. In the case of testing very heterogeneous materials with low mass fractions $< 4 \text{ mm}$ ecotoxicological testing seems to be inappropriate. However, material broken or grounded to a $d_{95} < 4 \text{ mm}$ can at least be used for a first assessment.

In case the original waste material consists mainly of particles $> 4 \text{ mm}$, a sieve analysis has to be prepared using an appropriate amount of material. It is not necessary that this sieve analysis follows regulations like e.g. DIN 66165 in detail. Since such material contains coarse grain sieving by hand is sufficient to perform a suitable sieve analysis. Regarding sample mass and sieve dimensions it must be secured that in the coarsest fraction (d_{95+}) contains more than 200 particles. An example of such a sieve analysis is shown in Annex A.

If materials with huge coarse grain content should be tested the coarse grain $> 4 \text{ mm}$ must be reduced in size, whereby the material should not be finely ground in any case. Cryogenic treatment may be necessary for this purpose. If the material has to be dried for sieving, the drying temperature may not exceed 40°C , as drying may alter various waste properties.

Non shredable and coarse materials, as well as tall single pieces which do not conform to the overall character of the sample, are to be removed during pre-treatment. Furthermore their visual image has to be recorded photographically. Their number, weight and percentage of total sample weight have to be recorded as well. In general it has to be taken into account that sample preparation and pretreatment, depending on the test or analysis, will narrow the sample and therefore decrease confidence in the results. As the representativeness of the sample in relation to the examined property cannot be known in advance, information about the confidence of tests can only be gained by parallel-investigation. A ripple divider is recommended for sample rejuvenation in the course of sample preparation and pretreatment. As an alternative the method “coning and quartering” can be used (LAGA PN 98).

5.2.4 Preparation of waste eluates

A wide range of methods has been developed to characterise and evaluate leachable waste constituents. Leaching of water-soluble constituents from waste is considered a major mechanism for potential environmental hazards posed by waste. The aim of the leaching procedure, therefore, is to produce an aqueous extract which can be used to determine the ecotoxic properties of water-leachable waste constituents. Any laboratory method can only give an approximate picture of the complexity of leaching processes, so that simplifications need to be made in the test method. Furthermore, certain waste properties may affect the suitability of the leaching method. For example, waste samples that contain organic pollutants require an adaptation of the leaching method.

For the preparation of waste eluates, methods based on national or international standards should be used. DIN 12457-2 describes a suitable method for leaching of waste materials at a liquid to solid ratio of 10 litres of eluent per kilograms of solid. It applies to waste with a particle size below 4 mm with or without size reduction. This leaching method is also a component of CEN 14753 “Characterization of waste – Preparation of waste samples for ecotoxicity tests”.

According to current research projects and validation studies, another suitable leaching method is the production of eluate in a column, as done in the quick column test (DIN 19528). However, no experience exists as yet with the biotesting of such eluate and with possible limit concentrations for waste classification.

Eluates produced in a batch test or column test only represent the short-term water-available components of potential toxic waste constituents. Especially when performing a risk assessment for planned recovery in an open system, methods should be used that reflect the conditions of the recovery scenario. Each relevant route of entry into the environment should be taken into account in this assessment, and changes to the material over time should be evaluated or additional tests performed if necessary. Where test methods are prescribed by relevant secondary legislation, the leaching method should be chosen as appropriate for the intended purpose.

In addition to point 11.2.1 (Leaching Procedure) of CEN 14735, it is recommended to use a partition for the eluate which is between 100g and 200g dry weight in order to reduce the uncertainty of sample size reduction. The sample quantity used should be easily reproducible out of the sample division into halves. Division steps have to be documented, so that the necessary water ratio for a mixture of 1:10 is easily adjustable. If necessary potential

uncertainties caused by sample preparation and pretreatment might be reduced by mixing several parallel conducted eluates (e.g. 4).

Since potential genotoxic waste properties represent a particular risk, a solid-phase extraction can be used to concentrate the eluate in addition to testing the aqueous eluate for genotoxicity (Ehrlichmann et al. 2000).

5.2.5 Storage of waste eluates

The waste eluates must be used in the test as soon as they are produced (recommended maximum storage period: 48 hours; maximum storage period: 72 hours). Waste eluates may not be stabilised by the addition of preservatives. Freezing may cause eluates to undergo irreversible changes and therefore, is permitted only in exceptional cases. If freezing is unavoidable, this has to be documented in the test protocol.

5.2.6 pH of waste eluates

The waste eluates must be tested in the bioassays without pH adjustment, whereby it must be borne in mind that the pH of the test mixture, due to dilution, may differ significantly from that of the waste material to be evaluated. The decisive factors for this are the chosen range of dilutions and the buffering capacity of the waste. If toxic effects are observed at dilutions whose pH does not permit or significantly influences the survival of the test organisms, the ecotoxicity tests may be repeated with adjustment of the pH in conformity with the relevant standards. It is important to note that an acid or alkaline eluate may exhibit an ecotoxic effect due solely to its non-neutral pH and that this may affect the classification of the waste.

5.2.7 Control medium

Ecotoxicity testing of waste requires the use of a dilution medium which does not affect the response of the test organisms and does not interact with the sample. Since the requirements to be met by the dilution medium depend upon the test organisms, suitable dilution substrates are described in the test methods. The same medium must be used for both the control and the dilution series. The production of test mixtures also depends on the waste type to be tested. CEN 14735 summarises procedures for the production of test mixtures.

6 Test strategies

The assessment of wastes is aligned on assessment under hazardous-substances legislation. Waste can thus be classified based on sufficient knowledge of its composition in terms of hazardous substances. Every waste which, based on its (known) composition, is to be classified and labelled in accordance with hazardous-substances law (H1 to H13) is considered hazardous waste.

In addition, if the composition of the waste is unknown or complex, biological test methods may be applied for the following purposes:

- to identify hazardous wastes in mirror entries in the Waste List Ordinance according to the criterion HP14 (Chapter 6.1),
- to carry out a basic ecotoxicological characterisation of wastes (Chapter 6.2),

- to assess the risks of waste recovery measures. (Chapter 6.3).

6.1. Identification of ecotoxicological wastes in mirror entries in the Waste List Ordinance

6.1.1 General

If the concentration levels in the eluate or waste as determined by chemical and physical analysis do not permit classification under hazardous-substances legislation, if insufficient knowledge exists about the composition of the waste, or if the waste constituents have not been classified under hazardous-substances legislation, then tests have to be performed for the hazard criterion HP14. These tests should be conducted in several steps (Fig. 1).

Waste-evaluation begins with the utilization of accessible information, which means that an accumulation method which is in concordance with the CLP regulation (classification, labeling and packaging of substances and mixtures) for acute and chronic parameters in aquatic systems is used (European Regulation EC 1272/2008 (EC 2008b)). If sufficient data for every waste-component is available, waste-evaluation can be executed in this manner which renders ecotoxicological testing unnecessary. In all other cases, the experimental determination of the ecotoxicity is required. An evaluation as “not ecotoxic” does not automatically lead to classification as non-hazardous waste, since all other hazard criteria specified in the Waste List Ordinance must also be evaluated, irrespective of the ecotoxicological assessment.

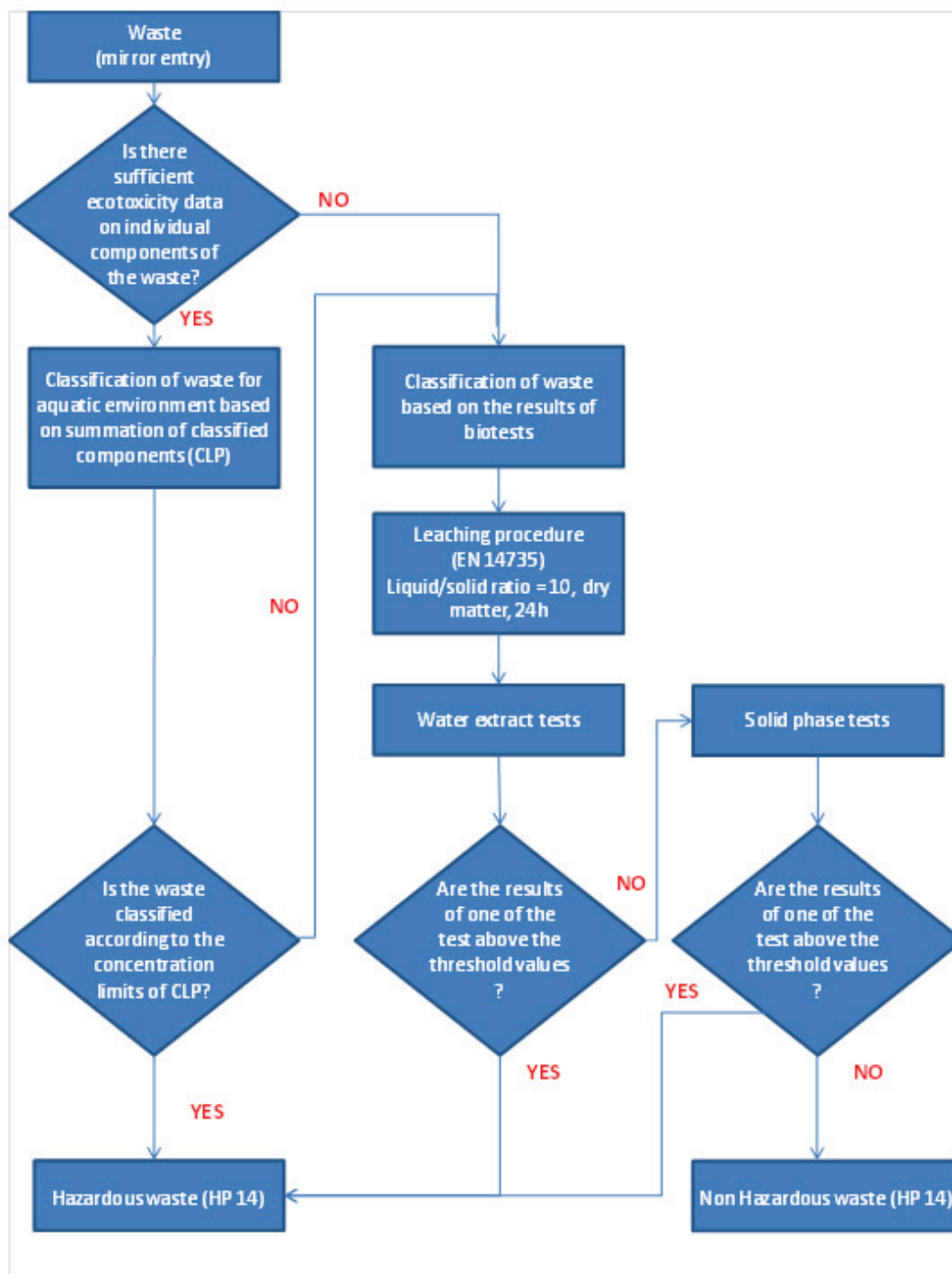


Fig. 1: Flow chart for the waste-classification in accordance with HP14 (Pandard & Römbke 2013)

6.1.2 Test strategy

Practical implementation of ecotoxicological tests is determined by CEN 14735, and starts with the examination of waste eluates (Fig. 1), which are mixed with a control-substrate (reconstituted water). In general, pH-values are not adjusted. Tests can only be repeated if the pH-value of the composite is threatening the survival of the test specimens. However, the result cannot change waste-classification but is mainly used for cause identification. The test results are designated as ECx (=effect concentrations). The waste is classified as dangerous and the tests are discontinued if the EC is below the limit-concentration. If the EC is above the limit

concentration, terrestrial tests are conducted. Waste can only be classified as nonhazardous, if all test-results are below the limit concentration. So far, published data of ecotoxicological waste tests does not show a consistent advantage of aquatic tests in respect of test-sensitivity (Römbke et al. 2009). Therefore, the proposed test strategy encompasses both aquatic and terrestrial tests. Nevertheless, due to practicability reasons it focusses on eluate tests which are less time consuming and expensive.

6.1.3 Selection of test methods

The battery of tests shown in Table 3 is based on the results of a European inter-laboratory comparison for the ecotoxicological characterization of wastes (esp. Pandard et al. 2006, Roembke et al. 2010b) and describes the minimum set of methods to identify potential biological effects of environmentally dangerous waste constituents. The most suitable tests were selected according to the following criteria:

- Eluate- as well as solid tests should be represented (CEN 14735);
- For practicability reasons, the number of tests per compartment was set to three;
- Test species should represent the most important groups (microbes, plants, animals), in order to include several taxonomic and physiological groups as well as trophic levels.
- Fish tests were not included for reasons of animal protection and because of the large quantity of eluate needed.
- Only standardized ISO- and/or CEN- methods are considered.
- Sufficient experience about the execution of waste-evaluation tests has to be available in order to produce robust results;
- Endpoints must be of sufficient sensitivity;
- Furthermore, the selected test battery should be characterized by high practicability and low effort (specifically with reference to short test durations, low demand of equipment, and a high number of laboratories in Europe able to perform these tests).

According to present knowledge, the aquatic and terrestrial tests, summarized in Table 3, are the ones most suitable to fulfil the above-mentioned criteria and have already been used to test wastes. Other, not yet standardized, test-procedures could replace or supplement the existing procedures, if the necessary experience is available.

For the performance of ecotoxicological tests it is assumed that the physicochemical properties of the waste or waste eluate are such as to allow use of the relevant bioassays. Particular properties such as strongly coloured eluate or waste samples with high nutrient content may make it necessary to extend the battery of tests.

Table 3: Test battery for the classification of wastes in mirror entries according to the criterion HP14

Methods for testing waste eluates	
Description and duration of the tests	Reference
Determination of the inhibitory effect on the light emission of <i>Vibrio fischeri</i> (luminescent bacteria test) (0,5 h)	ISO 11348-1/2/3
Fresh water algal growth inhibition test with <i>Desmodesmus subspicatus</i> and <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (72 h)	ISO 8692
Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test (48 h)	ISO 6341
Methods for the testing of solid wastes	
Contact toxicity test using the dehydrogenase activity with <i>Arthrobacter globiformis</i> for contaminated solids (6 h)	ISO 18187
Determination of the effects of pollutants on soil flora - Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of <i>Brassica rapa</i> (14 d)	ISO 11269-2
Testing the quality of soil and effects of chemicals on behavior - Test with earthworms (<i>Eisenia fetida</i> or <i>Eisenia andrej</i>) (48 h)	ISO 17512-1

6.1.4 Evaluation of test results

In order to evaluate the test results, it is determined if the $EC_{50} \leq$ the concentration in a dilution with 10% test substrate (EC_x-approach) (see ISO 17616 (2006)). Therefore, the fixation of a certain dilution as limit-concentration was dropped (Deutsches Institut für Bautechnik 2008). If the EC_{50} is $\leq$ the concentration in a 10% dilution, there is a distinct negative effect on the test organisms.

The assessment of the genotoxic potential of wastes is partially covered by the HP 11 “mutagenic” criterion. However, it cannot be used to evaluate the complete waste-sample but only to differentiate between the potential of the individual substances in the sample. As there can be unknown substances in the sample and interactions between those substances, one of the following tests with the waste eluate should be conducted to determine the genotoxic potential: umu-test (ISO 13829), or Ames test (ISO 11350). This evaluation is performed independently from the other tests (Römbke et al. 2009).

6.2 Detailed ecotoxicological characterisation of waste

6.2.1 General approach

Besides performing tests in order to differentiate between wastes in mirror entries, it may be necessary to subject wastes to a more detailed, basic ecotoxicological characterisation. This more comprehensive testing will be important in particular if waste is classified as hazardous according to HP14 on the basis of solid contents, but the waste holder wishes to demonstrate the absence of ecotoxicological risks (e.g. for wastes containing heavy metals in elementary form).

Basic ecotoxicological characterisation can also be used to assess wastes which cannot clearly be classified as non-hazardous due to their source or composition. The test strategy proposed below should also be used when the testing of wastes in mirror entries is not possible or has led to unclear results due to specific waste properties (e.g. wastes with high nutrient contents or strongly turbid eluates). The ecotoxicity of waste should be evaluated using the ECx-approach, which means the study of dose-effect relationships. Fig. 2 shows the general strategy for the characterization of waste, and explains the gradual advancement which ensures the cost- and time optimized analysis (especially the discontinuation after establishing effects).

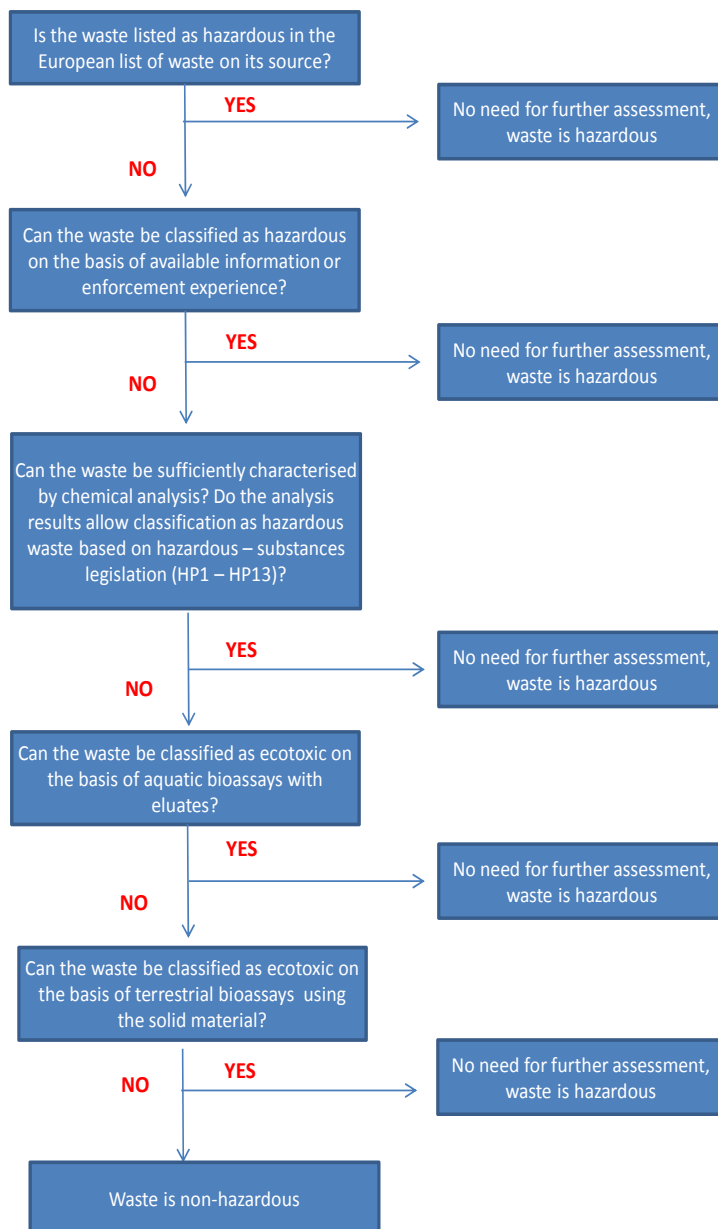


Fig. 2 Test strategy for the identification of hazardous wastes

6.2.2 Selection of test methods

The biological test methods were selected on the basis of the method compilation by CEN TC 292 WG7 and the experience gained in a European inter-laboratory comparison (Moser & Römbke 2009). The proposed test battery comprises methods with terrestrial test organisms for testing of solid waste and methods with aquatic test systems for testing of waste eluates including a method to determine the genotoxicity of the eluate (Table 4). It has to be noted that the acute earthworm test is no longer part of the test battery, due to lacking sensitivity.

Table 4: Battery of tests for the identification of hazardous wastes

Methods for testing of waste eluate	
Description	Reference
Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test	ISO 6341
Fresh water algal growth inhibition test with <i>Desmodesmus subspicatus</i> and <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	ISO 8692
Determination of the toxicity of water constituents and waste water to duckweed (<i>Lemna minor</i>) – Growth inhibition test	ISO 20079
Determination of the genotoxicity of waste and waste water using the umu test	ISO 13829
Water quality – Determination of the long-term toxicity of substances to <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea)	ISO 10706
Methods for testing of waste samples	
Description	Reference
Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour (<i>Eisenia fetida</i> and <i>Eisenia andrei</i>)	ISO 17512-1
Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 2: Effects of chemicals on the growth of <i>Brassica rapa</i>	ISO 11269-2
Toxicity test with <i>Arthrobacter globiformis</i> for contaminated solids	ISO 18187
Effects of pollutants on earthworms (<i>Eisenia fetida</i>) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate	ISO 11268-1
Soil quality – Inhibition of reproduction of Collembola (<i>Folsomia candida</i>) by soil pollutants	ISO 11267

6.2.3 Evaluation of test results

For basic characterisation, the waste sample is tested in a series of dilutions in order to determine the EC50-value (Table 5). The tested waste is classified as hazardous if ecotoxic potential was demonstrated in at least one of the tests performed. This also always applies if the eluate was determined to display genotoxic potential. Until specific information about this test system is available, a limit concentration of $\leq 10\%$ test-substrate is proposed to be used (Pandard & Römbke 2013).

Table 5: Battery of tests for the basic characterization of wastes

Type of test	Test organism	Reference	Parameter
Eluate	<i>Desmodesmus subspicatus</i> , <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	ISO 8692	Growth
	<i>Daphnia magna</i>	ISO 6341	Immobilisation
	<i>Lemna minor</i>	ISO 20079	Growth
	<i>Salmonella typhimurium</i>	ISO 13829	Gene induction
	<i>Daphnia magna</i>	ISO 10706	Reproduction
Solid material	<i>Eisenia andrei</i> , <i>E. fetida</i>	ISO 17512-1	Behaviour
	<i>Brassica rapa</i>	ISO 11269-2	Growth
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	ISO 18187	Enzyme activity
	<i>Folsomia candida</i>	ISO 11267	Reproduction

7 Ecotoxicological characterisation for assessing the risks of waste management scenarios

7.1 General

Biological test methods can be used to assess the environmental hazards of waste. Although the test methods are applied under highly standardised and usually non-field conditions, it is possible to extrapolate biological effects determined in the tests to biota potentially affected by open-system recovery measures. In considering risks associated with waste recovery, it is especially important to adapt the test strategy to the conditions likely to be encountered. The test strategy must seek to cover the main exposure pathways and to determine associated environmental effects by using primarily suitable leaching methods and bioassays. Defining such a test strategy requires more knowledge and experience than is required for the classification of waste and it cannot therefore be regarded as a strategy for the routine testing of waste.

7.2 Test strategy

The complexity of the test strategy depends on the type of waste and the envisaged recovery method (Figure 3). If a basic ecotoxicological characterisation of the waste was performed prior to risk assessment (see Section 6.2), the resulting findings can be integrated into the test strategy. It is particularly important to choose a suitable leaching method and to tailor the series of bioassays to the test objective. A compilation of test methods suitable for the testing of waste can be found in Annex B to ISO 14735. The scope and composition of the requisite test battery is geared to the indicator components and properties of the waste. For a risk assessment of wastes sufficiently differentiated dilution series should be tested since not all wastes exhibit a clear dose-effect relationship. It must be made clear that this test strategy is only one element of such assessment of waste; even waste that is classified as non-ecotoxicological may not meet the requirements for safe recovery.

A deviating approach might be followed by waste holders or the competent authorities when devising a test strategy in the fundamental assessment of waste destined for recovery.

Therefore, it is suggested that experience and findings from such comprehensive testing be exchanged in the relevant bodies (e.g. the Joint Working Group of the Federal States on Waste) and/or a report on this should be prepared.

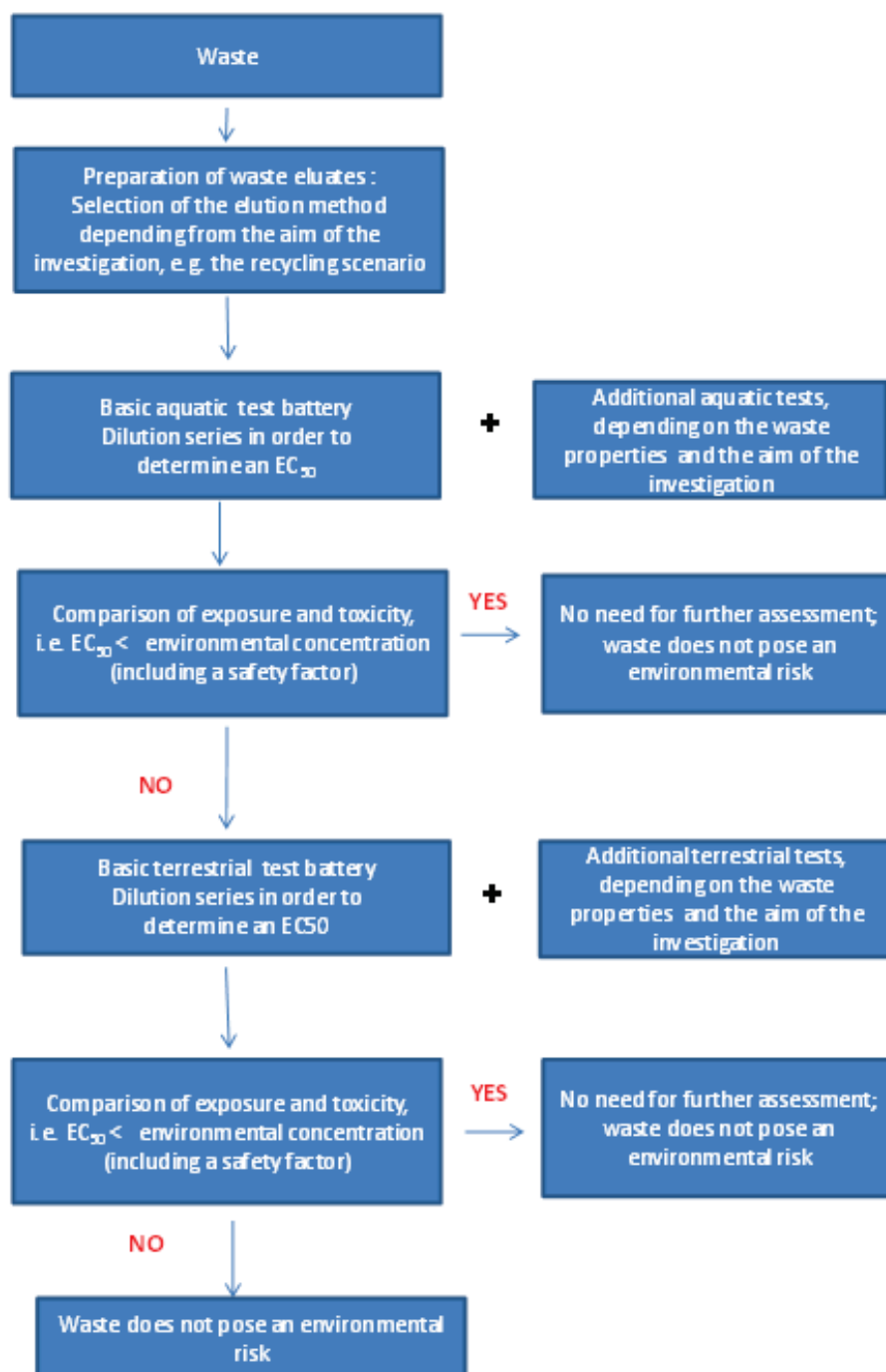


Fig. 3 Test strategy for an ecotoxicological characterisation as part of an environmental risk assessment of wastes

7.3 Selection of test methods

The set of tests for risk assessment of wastes must cover test organisms from three trophic levels (decomposers, consumers and producers), for the testing of both the eluate and the solid material. The tests must cover the exposure pathways identified as relevant for the recovery, i.e. the water-leachable component has to be tested using aquatic test methods and the direct toxicity of the waste has to be determined in tests with the solid material. It is particularly important to use test methods with long exposure periods to determine chronic effects. Table 6 presents a list of biological test methods which have already been used successfully for the testing of waste. (chronic tests, belonging to waste classification and detailed characterization (see Chapters 6.1.3 and 6.2.3) are not listed again). Although additional test methods such as the fish-egg test (OECD 212) for aquatic samples or the test using predatory mites (OECD 226) for solid samples can in principle be used, the suitability of those tests for wastes should be clarified in advance.

Table 6: Compilation of biological test methods for the testing of waste

Methods for testing of waste eluates	
Description	Reference
Determination of the inhibition of the mobility of <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test	ISO 6341
Fresh water algal growth inhibition test with <i>Desmodesmus subspicatus</i> and <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	ISO 8692
Determination of the toxicity of water constituents and waste water to duckweed (<i>Lemna minor</i>) – Growth inhibition test	ISO 20079
Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu test	ISO 13829
Determination of the long-term toxicity of substances to <i>Daphnia magna</i> Straus (Cladocera, Crustacea)	ISO 10706
<i>Pseudomonas putida</i> growth inhibition test	ISO 10712
Determination of the chronic toxicity to <i>Brachionus calyciflorus</i> in 48 h	ISO 20666
Determination of the chronic toxicity to <i>Ceriodaphnia dubia</i>	ISO 20665
Methods for testing of waste samples	
Description	Reference
Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (<i>Eisenia fetida</i> and <i>Eisenia Andrei</i>)	ISO 17512-1
Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants	ISO 11269-2
Contact toxicity test with <i>Arthrobacter globiformis</i> for contaminated solids	ISO 18187
Effects of pollutants on earthworms (<i>Eisenia fetida</i>) – Part 2: Determination of effects on reproduction	ISO 11268-2
Effects of pollutants on earthworms (<i>Eisenia fetida</i>) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate	ISO 11268-1
Inhibition of reproduction of Collembola (<i>Folsomia candida</i>) by soil pollutants	ISO 11267
Effects of pollutants on Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) – Determination of effects on reproduction and survival	ISO 16387

7.4 Evaluation of test results

The results of the bioassays have to be evaluated in the context of the relevant recovery scenario. Here too, the effect thresholds defined in the test methods may be used. A generally valid limit concentration cannot be applied here, since the exposure and its relation to the measured effects, (expressed for example as an EC50) is decisive for the assessment of recovery in an open system. Depending on the problem to be investigated, it may also be important to extrapolate the findings from biological effect analysis to a relatively long period. This underlines the need to determine chronic effects or the associated limit concentrations in long-term studies.

8 References

8.1 Guidelines

- CEN 12457-2: Characterisation of waste - Leaching - Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges - Part 2: One stage batch test at a liquid to solid ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 4 mm (without or with size reduction). Brussels.
- CEN 14735: Characterization of waste – Preparation of waste samples for ecotoxicity tests. Brussels.
- DIN 15442 Feste Sekundärbrennstoffe – Verfahren zur Probenahme. Berlin.
- DIN 19528. Elution von Feststoffen - Perkulationsverfahren zur gemeinsamen Untersuchung des Elutionsverhaltens von organischen und anorganischen Stoffen für Materialien mit einer Korngröße bis 32 mm - Grundlegende Charakterisierung mit einem ausführlichen Säulenversuch und Übereinstimmungsuntersuchung mit einem Säulenschnelltest. Berlin.
- DIN 19698-1: Abfalluntersuchung – Probenahme von festen und stichfesten Abfällen – Teil 1 Anleitung für die segmentorientierte Entnahme von Proben aus unbekannten Haufwerken, Entwurf. Berlin.
- DIN 66165 Teil 1 Partikelgrößenanalyse Siebanalyse Grundlagen. Berlin.
- [EC] European Commission 1967. Council Directive 67/548/EEC of 27 June 1967 of the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. Official Journal of European Communities, 196, 16.8.1967, p 1-98.
- [EC] European Commission 2000. Commission Decision of 3 May 2000 replacing Decision 94/3/EC establishing a List of Wastes pursuant to Article 1(A) of Council Directive 75/442/EEC on waste and Council Decision 94/904/EC establishing a list of hazardous waste pursuant to Article 1(4) of Council Directive 91/689/EEC on hazardous waste (notified under Document Number C (2000) 1147).
- [EC] European Commission 2008a. Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives, Official Journal of the European Union L312, 22.11.2008, p 3-30.
- [EC] European Commission 2008b. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labeling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006, Official Journal of the European Union L 353, 31.12.2008, p 1-1355.
- ISO 6341 Water quality - Determination of the inhibition of mobility of *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. Geneva.
- ISO 8692: Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Desmodesmus subspicatus* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. Geneva.
- ISO 10706: Water quality – Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Geneva.
- ISO 10712: Water quality – *Pseudomonas putida* Growth inhibition test. Geneva.
- ISO 11267: Soil Quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Geneva.
- ISO 11268-1: Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) - Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Geneva.

- ISO 11268-2: Soil Quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction. Geneva.
- ISO 11269-2: Soil quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora. Part II: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants. Geneva.
- ISO 11348-1/2/3: Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). Geneva.
- ISO 11350. Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test). Geneva.
- ISO 13829: Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test. Geneva.
- ISO 16387: Soil Quality - Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.). Determination of effects on reproduction and survival. Geneva.
- ISO 17512-1: Soil Quality - Avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals. Test with Earthworms (*Eisenia fetida/andrei*). Geneva.
- ISO 17616. Soil quality – Guidance on the assessment of tests applied in the field of ecotoxicological characterization of soils and soil materials. Berlin.
- ISO 18187 Soil quality – Quality of solid samples – Solid contact test using the dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis*. Geneva.
- ISO 20079: Water quality – Determination of toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test. Geneva.
- ISO 20665: Water quality – Determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*.. Geneva.
- ISO 20666: Water Quality – Determination of the chronic toxicity to *Brachionus calyciflorus* in 48h. Geneva.
- LAGA PN 98: Richtlinie für das Vorgehen bei physikalischen, chemischen und biologischen Untersuchungen im Zusammenhang mit der Verwertung/ Beseitigung von Abfällen (PN98).
- LAGA-Methodensammlung Abfalluntersuchung (2012), Version 2.0.
- OECD 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. Guideline for the testing of chemicals. Paris, France.
- OECD 226: Predatory mite (*Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*) reproduction test in soil. Guideline for the testing of chemicals. Paris, France.
- OECD 315: Bioaccumulation in sediment-dwelling benthic oligochaetes. Guideline for the testing of chemicals. Paris, France.
- OECD 317: Bioaccumulation in terrestrial oligochaetes. Guideline for the testing of chemicals. Paris, France.

8.2 Publications

- Deutsches Institut für Bautechnik 2008. Merkblatt für die Bewertung der Auswirkungen von Bauprodukten auf Boden und Grundwasser. Berlin.
- Ehrlichmann, H., Dott, W., Eisenträger, A. 2000. Assessment of the Water-Extractable genotoxic potential of soil samples from contaminated sites. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 73-80.
- Gy 1979: Sampling of particulate materials – Theory and practice, Elsevier, Amsterdam.
- Gy 1992: Sampling of heterogeneous and dynamic material systems, in *Data Handling in Science and Technology*, Vol 10, Elsevier, Amsterdam.
- Moser, H. 2008. Handlungsempfehlungen zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen. Entwurf.
- Moser, H., Römbke, J. 2009. Ecotoxicological characterization of waste - Results and experiences of an European ring test. Springer Ltd., New York. 308 pp.
- Pandard P, Devillers J, Charissou AM, Poulsen V, Jourdain MJ, Féraud J-F, Grand C, Bispo A. 2006. Selecting a Battery of Bioassays for Ecotoxicological Characterization of Wastes. *Science of the Total Environment* 363:114-125.
- Pandard, P., Römbke, J. 2013. Proposal for a "Harmonized" Strategy for the Assessment of the HP 14 Property. *Integ. Envir. Assess. Manag. (IEAM)* In press.
- Römbke, J., Moser, TH., Moser, H. 2009. Ecotoxicological characterization of 12 incineration ashes (MWI) using 6 laboratory tests. *Waste Management* 29: 2475-2482.
- Römbke, J., Moser, Th., Neumann-Hensel, H., Ketelhut, R. 2010a. Identifikation umweltgefährlicher Abfälle in Spiegeleinträgen der AVV. Bericht für das Umweltbundesamt, FKZ 3708 31 300, 124 S.
- Römbke, J., Jänsch, S. Meier, M., Hilbeck, A., Teichmann, H., Tappeser, B. 2010b. General recommendations for soil ecotoxicological tests suitable for the Environmental Risk Assessment (ERA) of Genetically Modified Plants (GMPs). *IEAM* 6: 287-300.

Annex A: Sieve analysis

Waste materials containing a huge mass content of particle sizes > 4 mm provide a limited applicability for eco-toxicological testing because most testing procedures require a particle size of $d_{95} < 4$ mm. Normally, particle size reduction like comminution or crushing is avoided during sample preparation due to the risk that freshly fractured surfaces might significantly influence the eco-toxicological properties of the material.

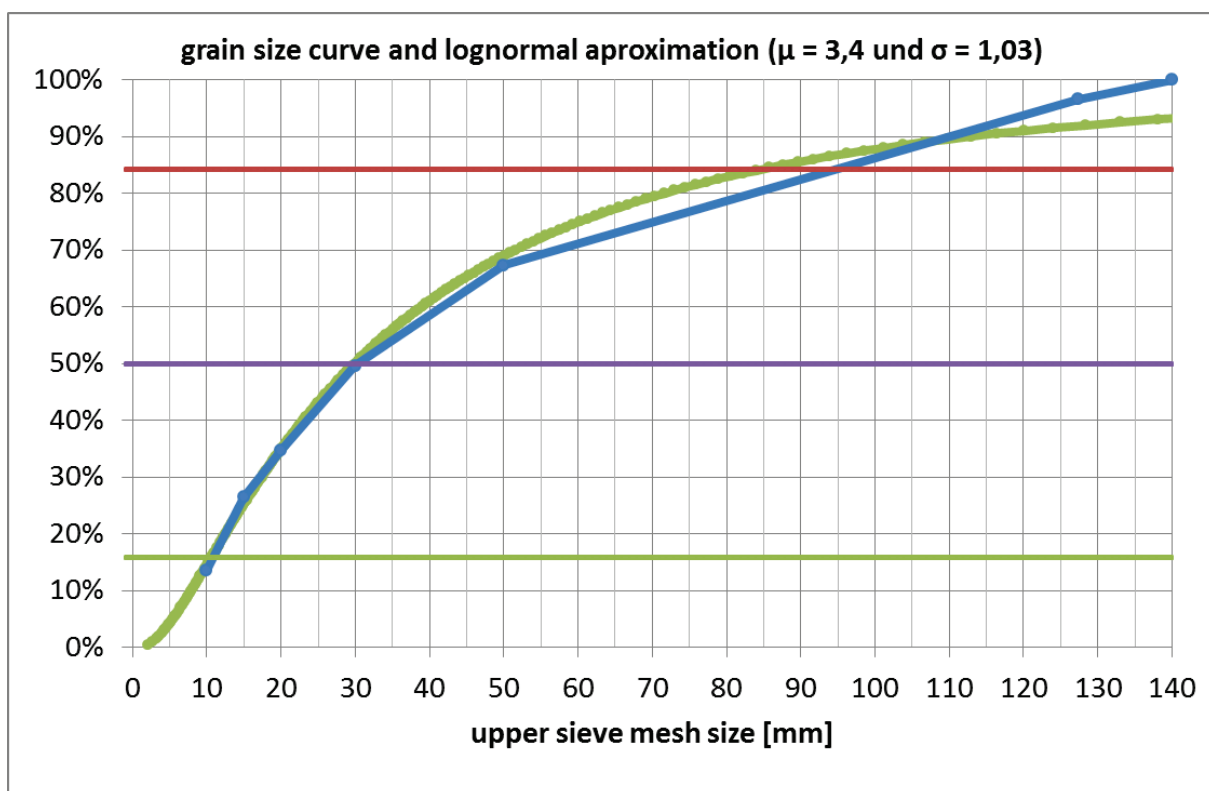
If an eco-toxicological testing for such kind of material is intended it is reasonable to develop a rough sieve analysis of the original material in order to get information on the representativeness of the sample. It is not necessary to conduct a complete sieve analysis according to e.g. DIN 66165 as the main focus is put on larger grain sizes > 4 mm while a classical sieve analysis defines particle sizes down to the μm range.

For the typical sample sizes of 10 to around 50 kg a hand sieving using a sieve area of $3 \text{ dm} * 5 \text{ dm}$ has proven of value. Typically we use the following set of round hole sieves:

4 mm / 5 mm / 10 mm / 15 mm / 20 mm / 30 mm / 50 mm / 100 mm

For a reliable characterization of large particle sizes we ensure that even the largest particle fraction (d_{95+}) contains more than 200 particles.

Using this procedure the following exemplary results are achievable:



Appendix 3: Scientific Position Paper

For the European Commission Ecotoxicological Classification of Wastes

Compiled by:

Jörg Römbke, Ralf Ketelhut & Joachim Wuttke

Contact: ECT Oekotoxikologie GmbH
Dr. Jörg Römbke
J-Roembke@ect.de, Tel.: +49 (6145) 956450

Stoffstromdesign (SSD)
Ralf Ketelhut
ketelhut@stoffstromdesign.de, Tel.: +49 (4321) 78 39 211

Federal Environment Agency, Germany
Section III1.5: Municipal Waste Management, Hazardous Waste, Focal Point to
the Basel Convention
Dr. Joachim Wuttke
joachim.wuttke@uba.de, Tel.: +49 (340) 2103 3459

February 12, 2013

Table of Contents

1.	<i>Brief history: Ecotoxicological testing of wastes.....</i>	<i>81</i>
2.	<i>Current discussion on how to proceed in the area of waste ecotoxicity.....</i>	<i>82</i>
3.	<i>Scientific recommendations concerning the HP14 classification of wastes.....</i>	<i>84</i>
4.	<i>References.....</i>	<i>86</i>

1. Brief history: Ecotoxicological testing of wastes

Since the early 1990s the ecotoxicological characterization of wastes has been studied but the number of studies remains limited to date (e.g. Lambolez et al. 1994; Ortiz et al. 1995). However, the literature covers a wide range of test substrates and test methods, including also different ways of preparing waste eluates (Juvonen et al. 2000; Lapa et al. 2002; Pandard et al. 2006; Wilke et al 2008; Pablos et al 2009). These studies revealed also the heterogeneity in approaches and tests used, making it difficult or impossible to compare between studies. Nevertheless, a key finding of all these studies is the suitability of ecotoxicological tests for waste characterization in general.

In the last decade, an attempt was made to harmonize the strategy for assessing the ecotoxicological hazard of wastes. The CEN standard 14735 (CEN 2005) defines the necessary steps to be performed before carrying out ecotoxicity tests on wastes or waste eluates. This procedure is applicable to a very wide range of waste materials whatever their physical properties are. In addition, CEN 14735 states the need of including test organisms representing the aquatic and terrestrial compartments. Together with recommendations resulting from a EU workshop (Gawlik & Moser 2005), this standard was used as a basis for an European ring test, which involved sixty laboratories from fifteen countries (Moser & Roembke 2009). One outcome of this ring test was a proposal for a battery of three tests with waste eluates and three with solid wastes, which, slightly modified, has been used in several commercial studies (e.g. Roembke et al. 2009).

Reliable ecotoxicological testing is depending on a waste sample which is reflecting the features as representative as possible. Sampling of heterogeneous particulate materials is most probably the major source of error in the measurement of the properties of those kinds of materials (EPA 2003). In principle sampling is nothing but an intelligent mass reduction, the challenge is, to keep the batch composition and characteristics as good as possible (Gy 2004). While the reliable and reproducible definition of the metal contents of heterogeneous waste mixtures still remains to be highly ambitious (QUOVADIS 2007) ecotoxicological testing of comparable laboratory samples shows considerable indications for delivering more reproducible results compared to chemical analysis. This suggests that ecotoxicological testing systems might be able to reproducibly measure integrated matrix effects which are not correlated to the chemical content of single hazardous compounds.

2. Current discussion on how to proceed in the area of waste ecotoxicity

In Europe, the decision whether waste is hazardous or not is based on 15 properties, among them the HP14 property ("ecotoxic": waste which presents or may present immediate or delayed risks for one or more sectors of the environment). The two regulatory texts supporting the classification of waste (i.e. European List of Waste and the Waste Framework Directive) are currently under revision. Some of the current proposals for revising the European Waste List and the Waste Framework Directive (OEKOPOL 2008; EC 2012), tend to focus mainly on the legislation on chemicals and recommend applying the CLP rules for mixtures and the concentration limits related thereto (Regulation (EC) 1272/2008 (EC 2008b)) to classify wastes as ecotoxic. However, it is difficult to implement this approach for complex mixtures of mainly unknown composition, which is a common situation for wastes. In this case, the performance of ecotoxicity tests on waste is generally considered as the most relevant approach because it allows integrating the effects of all contaminants including additive, synergistic and antagonistic effects. In addition, reference data (i.e. EC50, LC50, M-factors) are only available for a limited number of chemicals, which can significantly impede using the summation method described in the CLP regulation (EC 2008b).

Below a strategy for assessing the HP 14 property is briefly presented. It is based on a combination of two approaches: the summation of classified compounds in the waste carried out according to the CLP regulation and the usage of the results of biotests performed on waste eluates and solid wastes. The proposal is based mainly on recommendations of a European ring test performed in 2007, the work carried out in the CEN/TC 292/WG 7 standardization working group and the results of various research projects regarding the ecotoxicological characterization of waste performed mainly in France and Germany. As presented in Figure 1, the assessment of a waste starts with existing information, i.e. the summation method is carried out according to CLP (classification, labelling and packaging of substances and mixtures) regulation for both aquatic acute and chronic endpoints (European regulation EC 1272/2008, (EC 2008b)). It allows classifying a waste if sufficient data on the individual components are available. Indeed, there is no need to perform biological tests, if the decision regarding the waste classification can be based on its composition. In all other cases, the experimental approach described below is mandatory. In fact, a battery of tests (three using waste eluates, and three using solid waste samples, plus, under certain conditions, a genotoxicity test) is recommended for the ecotoxicological classification of wastes.

The experimental approach (see Figure 1) follows a stepwise procedure, which begins with tests performed with waste eluates. The design of the toxicity tests follows a dilution approach, meaning that the waste (eluate or solid) is mixed with a control substrate (e.g. reconstituted water, artificial or reference soil). The results of these tests are preferably expressed as ECx (= effect concentrations) values. If one of the EC values resulting from the eluate tests is below a specific threshold value, the waste is classified as hazardous and the overall procedure is stopped. Otherwise, solid waste tests are carried out. The waste is considered as non-hazardous only if all the results are above the threshold values. Examples are known that using this approach a distinction between hazardous and non-hazardous wastes is possible (Pandard & Römbke 2013). We propose to consider this combined approach when defining the legal requirements for the ecotoxicological classification of wastes.

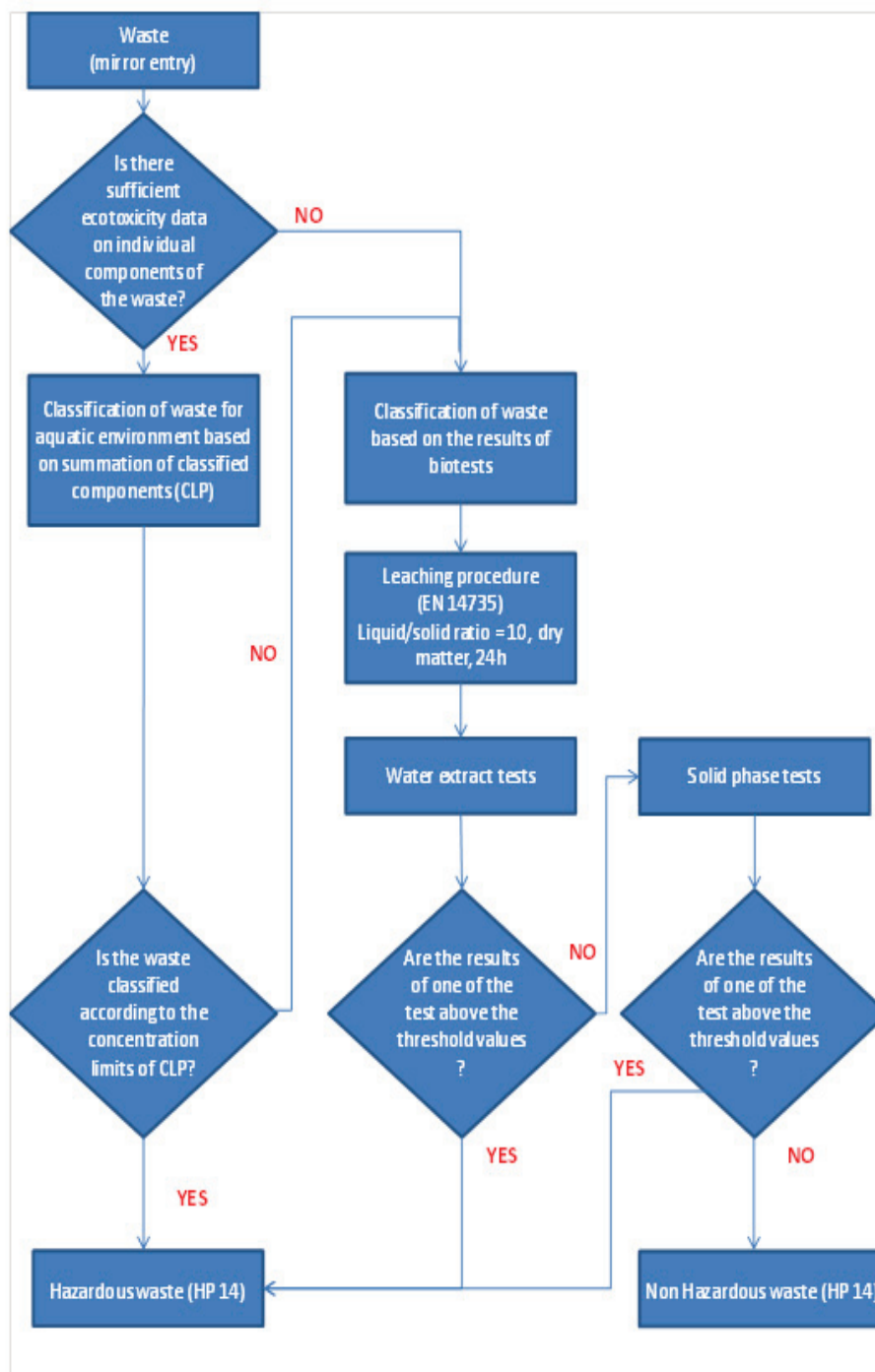


Figure 1: Flowchart for the assessment of the HP 14 property

3. Scientific recommendations concerning the HP14 classification of wastes

The main recommendations can be summarized as follows:

- The general evaluation strategy with its tiered approach as described in the previous chapter has been developed considering formal, scientific, and practicability criteria already successfully used in other legal areas such as chemical hazard assessment.
- Recommendations how to sample, store and treat waste sample have been worked out and are currently being standardized.
- A battery of standardized and validated test methods has successfully been selected, which are scientifically sound, easy and quick to perform but sensitive and usable all over Europe.
- Based on several scientific and commercial studies, proposals for evaluation criteria have already been developed and are ready to use.

Table 1: Battery of tests recommended for future waste testing (Pandard & Roembke 2013)

Test	Endpoints	Duration	Standard
Luminescent bacteria test (<i>Vibrio fischeri</i>)	Inhibition of light emission	30 min	ISO 2007a
Freshwater algal test (<i>Desmodesmus subspicatus</i> or <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	Inhibition of population growth	72 h	ISO 2012a
Acute crustacean test (<i>Daphnia magna</i>)	Inhibition of mobility	48 h	ISO 1996
Bacteria Soil contact test (<i>Arthrobacter globiformis</i>)	Inhibition of enzyme activity	6 h	ISO 2012b
Test with higher plants (<i>Brassica napus</i>)	Inhibition of growth	14 d	ISO 2012c
Short term test with the earthworm <i>Eisenia andrei/fetida</i>	Avoidance behaviour	48 h	ISO 2007b

However, there are still some open issues which should be clarified:

- EU-wide implementation hampered by the fact that so far only few waste classes have been tested (out of 20 just two well and another two acceptable – but for ten classes almost nothing is known;
- Thus, there is uncertainty how an ecotoxicological hazard assessment of wastes can be performed under routine conditions when so many waste types were never tested.
- EU-wide testing project to be announced, e.g. under the umbrella of the LIFE+ program, to be used not only for scientific reasons but mainly for further standardization and validation of methods, including test result evaluation.

In the following, some basic ideas concerning a proposal for LIFE+ are listed, using the Call for 2012 as a basis (the new call for 2013 will be published on February 14, 2013 (deadline for submission: June 25, 2013).

The proposed work would belong to Theme 2 (Environment Policy and Governance); in particular the following subtheme “Natural Resources and Waste”. This subtheme is defined as

follows: *“To develop and implement policies designed to ensure sustainable management of natural resources and wastes, and to improve the environmental performances of products, sustainable production and consumption patterns, waste prevention, recovery and recycling, and to contribute to the effective implementation of the thematic strategy on the prevention and recycling of waste”.*

- ➔ Without doubt, cost-efficient and robust classification of wastes regarding the criterion HP14 would help to reach the goals described in the call.
- ➔ In detail, such a project proposal should include:
 - Coverage of a wide range of wastes with their very differing properties;
 - Improvement of existing guidelines and guidance papers on the sampling, sample preparation and storage of waste samples in order to facilitate handling of these samples while at the same time getting more robust results;
 - Performance of the tests, using the proposed test battery, in order to identify whether they are suitable for all wastes classes (and, in case if not, improve these test guidelines accordingly);
 - Define and evaluate a strategy on how even heterogeneous waste mixtures of larger grain sizes can be properly sampled and prepared for reproducible ecological testing
 - Identify (preferably quantify) the ecological and economic benefits when applying the improved HP14 classification strategy as described in this paper.
- ➔ The results of this work could be used for another LIFE+ theme (“Strategic approaches”), since they would form the basis of an improvement of the knowledge base for environmental policy (here: the European Waste List). Since the classification and testing of the hazardousness of wastes is often done by small and medium enterprises (SME), these would also benefit.

4. References

- CEN (Comité Européen de Normalisation) (2005): Characterization of waste – Preparation of waste samples for ecotoxicity tests. CEN 14735. European Standard, Brussels, Belgium.
- EC (European Commission) (2000): European Waste List 2000/532/EC: Commission Decision of 3 May 2000 replacing Decision 94/3/EC establishing a list of wastes pursuant to Article 1(a) of Council Directive 75/442/EEC on waste and Council Decision 94/904/EC establishing a list of hazardous waste pursuant to Article 1(4) of Council Directive 91/689/EEC on hazardous waste (notified under document number C (2000) 1147).
- [EC] European Commission. Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives, Official Journal of the European Union L312, 22.11.2008, p 3-30.
- [EC] European Commission. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labeling and pack-aging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006, Official Journal of the European Union L 353, 31.12.2008, p 1-1355.
- EPA 2003: Gerlach, Robert, W.; Nocerino, John, M.: Guidance for Obtaining Representative Laboratory Analytical Subsamples from Particulate Laboratory Samples. United States Environmental Protection Agency: EPA/600/R-03/027 November 2003
- Gawlik, B.M. & Moser, H. (2005): Problems around soil and waste III – The H14 criterion and (bio)analytical approaches for ecotoxicological waste characterization. Workshop Proceedings. EUR 22152.
- Gy, P. 1992: Sampling of heterogeneous and dynamic material systems. In: Data Handling in Science and Technology, Vol 10, Verlag: Elsevier, Amsterdam.
- Gy, P. 2004: Sampling of discrete materials – a new introduction to the theory of sampling. I. Qualitative approach. In: Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 74 (2004) 7 – 24 and II. Quantitative approach. In: Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 74 (2004) 25 - 38
- ISO (International Organization for Standardization). (2007a):. Water quality – Determination of the inhibitory effect on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). 11348-3. Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). (2007b): Soil Quality – Avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals. Test with Earthworms (*Eisenia fetida/andrei*). ISO 17512-1. Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). (2012a): Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692. Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). (2012b): Water quality –Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. ISO 6341, Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). (2012c): Soil Quality – Quality of solid samples - Solids contact test using the dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis*. ISO/WD 18187. Geneva, Switzerland.

- ISO (International Organization for Standardization) (2012d): Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part II: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants. ISO 11269-2. Geneva, Switzerland.
- Moser, H. & Römbke, J. (2009): Ecotoxicological characterization of waste - Results and experiences of an European ring test. Springer Ltd., New York. 308 pp.
- Pandard P, Devillers J, Charissou AM, Poulsen V, Jourdain MJ, Férard J-F, Grand C, Bispo A. (2006): Selecting a Battery of Bioassays for Ecotoxicological Characterization of Wastes. Science of the Total Environment 363: 114-125.
- Pandard, P. & Römbke, J. (2013): Proposal for a "Harmonized" Strategy for the Assessment of the HP 14 Property. Integ. Envir. Assess. Manag. (IEAM) Submitted
- Quovadis 2007: Quality Management, Organisation, Validation of Standards, Developments and Inquiries for SRF. Project number: EIE 2003 031 – Grant Agreement EIE/031/S07.38597 Publishable result-oriented report. WP 1 – Co-ordination and Management Deliverable D 1.9, Progressive Number 4. Date: December 2007
- Römbke, J., Moser, Th., Neumann-Hensel, H. & Ketelhut, R. (2010a): Identifikation umweltgefährlicher Abfälle in Spiegeleinträgen der AVV. Bericht für das Umweltbundesamt, FKZ 3708 31 300, 124 S.

Appendix 4: Literature review on the current knowledge of the ecotoxicological testing of waste (including an overview on the current legislation of the classification of waste regarding their ecotoxicity (HP14))

Contact: ECT Oekotoxikologie GmbH
Dr. Jörg Römbke
J-Roembke@ect.de, Tel.: +49 (6145) 956450

Peter Stoldt
1 Burgfriedenstr. 33, 60489 Frankfurt

Federal Environment Agency, Germany

Section III1.5: Municipal Waste Management, Hazardous Waste, Focal Point to the Basel Convention

Dr. Joachim Wuttke
joachim.wuttke@uba.de, Tel.: +49 (340) 2103 3459

February 12, 2013

Abstract

This work examines the current state of knowledge on the ecotoxicological hazard classification of wastes, by means of a literature review. Information on waste types, as well as data from biotests and chemical analysis were quantitatively summarized. In parallel the findings from the published data and observations were summarized. Additionally, the future legal consequences were analyzed, arising due to the introduction of the CLP Regulation and consecutive replacing of the European Dangerous Substances Directive and Dangerous Preparation Directive for the ecotoxicological classification of waste. As a contribution to the discussion on the current revision of the Waste Framework Directive it can be stated that a chemical analysis and knowledge about the origin of a waste sample is not sufficient to conclude its hazardous potential and to classify it as dangerous to the environment. Testing with a battery of different aquatic and terrestrial species and endpoints provide much more accurate and reliable results.

Key words: European waste regulation, test battery, CLP-approach, waste eluates, solid waste

List of Abbreviations

ATP	Adaptation to Technical Progress
CLP-Regulation	Classification, Labeling and Packaging Regulation
DPD	Dangerous Preparation Directive
DSD	Dangerous Substance Directive
EC	European Commission
EC50	Effect Concentration 50 %
ECHA	European Chemicals Agency
EU	European Union
GHS	Globally Harmonized System
H- and P-Statements	Hazard and Precautionary Statements
Kow	Partition coefficient octanol-water
LC50	Lethal Concentration 50 %
LID	Lowest ineffective dilutions
LOW	European List of Wastes
NOEC	No Observed Effect Concentration
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
R- and S-Phrases	Risk and Safety Phrases
REACH-Regulation	Registration, Evaluation and Restriction of Chemicals Regulation
WFD	European Waste Frame Directive
WHG	Wasserhaushaltsgesetz

Table of Contents

Abstract.....	90
1 Introduction.....	93
1.1 Background.....	93
1.2 Aims of this review	94
2 Legal Situation of Waste in Context of Classification Legislations.....	95
2.1 Waste Framework Directive and the List of Waste	95
2.2 CLP Regulation	96
2.2.1 Classification of substances.....	96
2.2.2 Classification of mixtures	99
2.3 Implications of the CLP Regulation to the Waste Management and Future Developments of Legislative Measures.....	101
2.4 ABANDA – A German approach to Classify on Experience and Comparison.....	103
2.5 Current Status of the Discussion and Outlook	104
3 Overview of the Analyzed Literature.....	104
3.1 Types of Publications	104
3.2 Data of the Analyzed Literature.....	105
4 Results of the Literature Survey	105
4.1 Characterisation of the Waste Samples Published	105
4.2 Treatment and Preparation of Test Solutions and Solid Wastes	110
4.3 Analytics	110
4.3.1 Physico-chemical properties	110
4.3.2 Residue analytics	110
4.3.3 Chemical Analysis and the Classification of Waste	111
4.4 Test Protocols.....	112
4.5 Test Organisms	113
4.6 Endpoints and Sensitivity.....	115
4.7 Test Batteries.....	117
4.8 Ecotoxicological Effects of Physicochemical Properties.....	119
4.8.1 Effects Related to Physical Appearance and Origin	119
4.8.2 Effects of pH, Salt and Organic Matter	119
4.9 Heavy Metals and Toxic Effects.....	120

4.10 PAH contamination and Toxic Effects.....	120
5 Conclusion and Recommendations	121
Acknowledgements.....	122
6 References.....	123

1 Introduction

1.1 Background

Waste is produced in the European Union (EU) in a volume of about 3 billion tons per year, „some 90 million tons of it hazardous“ and it is expected, that this amount is increasing from 1995 to 2020 by 45% according to an estimation of the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) (European Commission 2012a). What to do with this huge amount? The most important mass streams after using goods and their declaration as waste are the collection by waste management companies, followed by a) incineration for reasons of volume reduction and/or energy recovery and/or b) disposal of the waste directly or of their incineration residues as landfill at underground and non-underground disposal sites.

Besides disposal, reuse becomes more and more an important factor for this kind of substances: incineration ashes and slags are used in road constructing for example, as well as a constituent in concrete materials. Also sludges from waste water treatment are considered as valuable goods, as they are used as combustion materials in incineration plants, as biosolids in agriculture or, further processed, as constructing material for noise barriers of roads and railways. Another example for reusing waste is demolition material, what is used for road construction or as ingredient for concrete materials after crushing to rubble.

The total tonnage and its material flows and final destinations pose a potential risk to humans and the environment. This implies the importance of a regulatory management of the waste sector. On the level of the European Union regulatory management is achieved by directly binding regulations, or by directives which have to be implemented in national laws of the EU member states. On the level of the European member states the waste management is implemented in country specific legislations. The member states statutory provisions deal with the different aspects of waste, like emissions to air, protection of ground water or even, with regard to the contained substances and inherent properties of the materials, and on the classification and allocation into hazard classes. The biggest challenge of these activities is the heterogeneous physical and chemical properties of waste: the materials can be gaseous, liquid, solid, fine particulate matter or a glass like slags. At the same time it can be organic or inorganic or it can show all, some or only one of the mentioned characteristics.

Independent from its physical appearance, materials can be defined as waste according to the Waste Framework Directive (WFD) (EC 2008a)) as “any substance or object which the holder discards or intends or is required to discard;” or it can be categorized into different substance types or mixtures (monoconstituent or multiconstituent substances, UVCB (“Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials” according to Rasmussen et al. (1999), cited in ECHA’s “Guidance for identification and naming of substances”). The latter types become effective, when a material falls in the scope of the REACH Regulation (EC 2006). Independent whether it is waste or a material under the scope of REACH, rules for classifying and labeling are implemented based on hazardous properties. These are determined using more or less the same rules, but using different categories and hazard classes. A further complication

is based on the fact that waste is usually not a single chemical compound or substance, but a mixture of many of substances.

The distinction between substances and mixtures is an important issue: in order to classify substances, the CLP-Regulation (EC 2008b) foresees hazardous criteria and cut off limits based on intrinsic properties and (eco-) toxicological limit values such as EC50 or LC50, (Effect or Lethal Concentrations 50: Concentration where 50% of a test group shows an defined effect) of the concerned substance.

Classification of mixtures follows other rules. They (still) have to be classified according to the Dangerous Preparation Directive DPD (EC 1999). Under this regime, formulations and mixtures have to be classified primary on arithmetic models, which refer to the hazard categories of the constituent substances and their percentages in a mixture instead to their (eco-) toxicological effect values. From 1 June 2015 mixtures have to be classified according to the CLP-Regulation (EC 2008b). This regulation deviates from the current procedure in so far, as it focus' to the percentage and the substance effect concentrations within a category (for details see below).

In both concepts, matrix associated properties like bioavailability are not regarded and potential interactions and synergistic/antagonistic effects between substances in a mixture are likewise not considered. The presented classifying concepts for mixtures apply principally also to waste, as the WFD refers to the DPD. As one major goal of the WFD is the re-use of substances, the close relationship to the REACH Regulation becomes evident, although waste is explicitly exempted from the scope of REACH: "Waste as defined in Directive 2006/12/EC of the European Parliament and of the Council is not a substance, mixture or article within the meaning of Article 3 of this Regulation." (REACH, Article 2(2); EC 2006). But, when waste becomes a secondary raw material, a new live cycle of the substances and mixtures begins and the definitions and legal requirements of the REACH Regulation become effective – inter alia to classify and label these former wastes according to CLP. This is the case when a substance or mixture is used as material for noise barriers, or as ingredient of concrete materials as mentioned in the examples above.

Due to the close integration between the different legislations for waste, substances and mixtures, a harmonized system, covering definitions, categories and rules for labeling between these legal documents would be helpful. Unfortunately, this is not yet the case. A full approximation is currently not in sight, although by implementing CLP a better coordinated system could be established along with the ongoing revision of the Waste Frame Directive.

1.2 Aims of this review

This paper discusses different aspects of the topic "classification of waste". Unambiguous criteria for the assignment of the current hazard class "HP14 ecotoxic" according to the Waste Frame Directive are still lacking. Therefore a literature analysis should contribute to the knowledge about testing strategies used for the determination of the ecotoxicological properties of waste materials. Such a review could be helpful in developing standardized testing requirements. Therefore, this paper focuses mainly on two issues:

- Which test batteries have been used in ecotoxicological tests with wastes so far, i.e. which species and which endpoints were selected?

and

- Are there correlations between the different types of wastes and their effects on test organisms?

In order to address these issues, a literature review was performed, which covers available ecotoxicological test data (including, if available, residue analysis) on different waste types and landfill leachates. The waste samples studied in the literature as well as the biological and chemical test results found had firstly to be classified into the chapters and subchapters of the European List of Waste (LOW). Secondly, a comparison of results of the analyzed ecotoxic tests with the classification scheme of the CLP-Regulation was performed, in order to estimate, whether this instrument could be an alternative or complementing instrument in estimating the hazardous potential of waste samples. However, firstly a more detailed description of existing European legal documents on waste classification is given.

2 Legal Situation of Waste in Context of Classification Legislations

Waste Framework Directive and the List of Waste

The European Waste Framework Directive (WFD; EC 2008a) is the main legal instrument describing the classification of wastes. The WFD was introduced to harmonize rules and requirements for defining waste types within the European Union:

“Furthermore, it is necessary to maintain the system by which waste and hazardous waste have been classified in accordance with the list of the types of waste as last established by Commission Decision 2000/532/EC (EC 2000), in order to encourage a harmonized classification of waste and ensure the harmonized determination of hazardous waste within the Community.” (Recital 14 of the WFD).

The referred Commission Decision 2000/532/EC (EC 2000) in the recital is the so called List of Waste (LOW), which assigns code numbers to the different waste types. Its 839 entries are divided in 20 chapters and subchapters, primary focussing on the origin of the waste. The hazard potential of the material is addressed in second order only. In principal, three categories of waste types can be distinguished:

- Entries for non-toxic waste by definition: material which is exceptional categorized as non-toxic: Example: “03 01 01 waste bark and cork”.
- Entries for toxic waste by definition: material which is unambiguous hazardous by its constituting material. The toxic potential is reflected by a star.

Example: “03 02 03* organometallic wood preservatives”

- Entries for waste with unclear hazardous potential. For these waste types corresponding so-called mirror entries are introduced. It is on the applicant to decide, whether a waste sample is hazardous or not. The entries for the toxic correspondents are marked with a star. Example: “19 01 11* bottom ash and slag containing dangerous substances” and its combined mirror

entry: “19 01 12 bottom ash and slag other than those mentioned in 19 01 11”.

Together with the allocation of a suitable waste code, the hazard potential of a sample has to be declared by categorizing it to one or more of the 15 hazard categories foreseen in the WFD, which in turn are depending on the inherent properties of the constituent substances. The hazard categories HP 1 to HP 15 are described in Annex III of the WFD and refer to physicochemical hazards, toxic and also ecotoxic hazards (EC 2008a). While for some H numbers sharp criteria are listed, for the ecotoxic label specific toxicity values or limits are lacking: „HP 14 ‘Ecotoxic’: waste which presents or may present immediate or delayed risks for one or more sectors of the environment. “ Further (as notes to the hazard labels):

„1. Attribution of the hazardous properties (...) ‘eco-toxic’ is made on the basis of the criteria laid down by Annex VI, to Council Directive 67/548/EEC of 27 June 1967“[Remark: Council Directive 67/548/EEC (EC 1967) is the so called Dangerous Substance Directive, DSD which is replaced by CLP Regulation. For details see next paragraph.] (WFD, notes to the Hazard class descriptions)

2.1 CLP Regulation

In 2008 the Dangerous Substance Directive (DSD) was replaced by the CLP Regulation (EC 2008b). With the new Regulation a new system for classification and labeling come into force, implementing the so called Globally Harmonized System (GHS) into the European Union. Main differences between these legislations are – besides other hazard symbols – different hazard categories and the procedure itself as explained above.

2.1.1 Classification of substances

The CLP Regulation in principle continues to base the procedure of classification and labeling on a list of harmonized classified substances on the one hand and on the other to harmonized rules. Annex VI of the Regulation gives details about the substances and some substance specific values, which are required for application of the arithmetic procedure, later used for mixtures. In Part 3 (Table 3.1) of the CLP Regulation (EC 2008b) the following details for a harmonized classified substance are given:

- (IUPAC-) name: a chemical substance name, assigned according to the rules of the International Union of Pure and Applied Chemistry.
- EC-, CAS- and (EU-) Index numbers: Numbers referring to different international chemical substance databases.
- Specific concentration factors: Substance specific concentration limits for harmonized classified substances, which are part of a mixture; above of the limit concentration the concerned substance has to be regarded.
- M-factors: for substances with E(L)C50 values below 1 mg/ L a multiplying factor is to be applied in order to reflect the high hazard potential.
- New hazard symbols: Diamond shaped two-colored symbols, replaces the EU hazard symbols.

- H- and P-Statements: Hazard and Precautionary statements according to the GHS have to be applied, replacing the R- and S-phrases ("Risk and Safety phrases").

This Annex VI is erratically amended by the so called ATP (Adaptation to Technical Progress) process, currently released as Commission Regulations. At present the third adaptation is in force, becoming effective as of 1 September 2013.

Hazardous substances which are not covered by harmonized entries in the Annex VI of the CLP Regulation have to be classified according to the requirements of its Annex I. With regard to the aquatic environment the classification is differentiated into acute and long-term (chronic) hazards (all of them to be determined by standard OECD test guidelines). Relevant basic parameters used for the estimation of the aquatic hazards are (part IV):

- Acute aquatic toxicity,
- Chronic aquatic toxicity,
- Potential for, or actual bioaccumulation, and
- Degradation (biotic or abiotic) potential in case of organic chemicals.

Depending on (aquatic) test results with Algae (EC50 (growth rate), 72 h test duration, chronic test), Daphnia (EC50 (Mobility), 48 h, acute test) and Fish (LC50 (death), 96 h, acute test,) the classification of substances is based on a scheme, provided in the following table (CLP Annex I, Table 4.1.0: Classification categories for hazardous to the aquatic environment).

(Source: CLP, Annex I, Table 4.1.0: Classification categories for hazardous to the aquatic environment.)

(a) Acute (short-term) aquatic hazard	
Category Acute 1: (Note 1)	
96 hr LC50 (for fish)	≤ 1 mg/l and/or
48 hr EC50 (for crustacea)	≤ 1 mg/l and/or
72 or 96 hr ErC50 (for algae or other aquatic plants)	≤ 1 mg/l. (Note 2)
(b) Long-term aquatic hazard	
(i) Non-rapidly degradable substances (Note 3) for which there are adequate chronic toxicity data available	
Category Chronic 1: (Note 1)	
Chronic NOEC or EC x (for fish)	≤ 0,1 mg/l and/or
Chronic NOEC or EC x (for crustacea)	≤ 0,1 mg/l and/or
Chronic NOEC or EC x (for algae or other aquatic plants)	≤ 0,1 mg/l
Category Chronic 2:	
Chronic NOEC or ECx (for fish)	> 0,1 to ≤ 1 mg/l and/or
Chronic NOEC or ECx (for crustacea)	> 0,1 to ≤ 1 mg/l and/or
Chronic NOEC or ECx (for algae or other aquatic plants)	> 0,1 to ≤ 1 mg/l
(ii) → Rapidly degradable substances (Note 3) for which there are adequate chronic toxicity data available	
Category Chronic 1: (Note 1)	
Chronic NOEC or ECx (for fish)	≤ 0,01 mg/l and/or

Chronic NOEC or ECx (for crustacea)	≤ 0,01 mg/l and/or
Chronic NOEC or ECx (for algae or other aquatic plants)	≤ 0,01 mg/l
Category Chronic 2:	
Chronic NOEC or ECx (for fish)	> 0,01 to ≤ 0,1 mg/l and/or
Chronic NOEC or ECx (for crustacea)	> 0,01 to ≤ 0,1 mg/l and/or
Chronic NOEC or ECx (for algae or other aquatic plants)	> 0,01 to ≤ 0,1 mg/l
Category Chronic 3:	
Chronic NOEC or ECx (for fish)	> 0,1 to ≤ 1 mg/l and/or
Chronic NOEC or ECx (for crustacea)	> 0,1 to ≤ 1 mg/l and/or
Chronic NOEC or ECx (for algae or other aquatic plants)	> 0,1 to ≤ 1 mg/l
(iii) Substances for which adequate chronic toxicity data are not available	
Category Chronic 1: (Note 1)	
96 hr LC50 (for fish)	< 1 mg/l and/or
48 hr EC50 (for crustacea)	< 1 mg/l and/or
72 or 96 hr ErC50 (for algae or other aquatic plants)	< 1 mg/l (Note 2)
and the substance is not rapidly degradable and/or the experimentally determined BCF ≥ 500 (or, if absent, the log Kow ≥ 4). (Note 3).	
Category Chronic 2:	
96 hr LC50 (for fish)	> 1 to ≤ 10 mg/l and/or
48 hr EC50 (for crustacea)	> 1 to ≤ 10 mg/l and/or
72 or 96 hr ErC50 (for algae or other aquatic plants)	> 1 to ≤ 10 mg/l (Note 2)
and the substance is not rapidly degradable and/or the experimentally determined BCF ≥ 500 (or, if absent, the log Kow ≥ 4). (Note 3).	
Category Chronic 3:	
96 hr LC50 (for fish)	> 10 to ≤ 100 mg/l and/or
48 hr EC50 (for crustacea)	> 10 to ≤ 100 mg/l and/or
72 or 96 hr ErC50 (for algae or other aquatic plants)	> 10 to ≤ 100 mg/l. (Note 2)
and the substance is not rapidly degradable and/or the experimentally determined BCF ≥ 500 (or, if absent, the log Kow ≥ 4). (Note 3).	
'Safety net' classification	
Category Chronic 4:	
Cases when data do not allow classification under the above criteria but there are nevertheless some grounds for concern. This includes, for example, poorly soluble substances for which no acute toxicity is recorded at levels up to the water solubility (note 4), and which are not rapidly degradable in accordance with section 4.1.2.9.5 and have an experimentally determined BCF ≥ 500 (or, if absent, a log Kow ≥ 4), indicating a potential to bioaccumulate, which will be classified in this category unless other scientific evidence exists showing classification to be unnecessary. Such evidence includes chronic toxicity NOECs > water solubility or > 1 mg/l, or other evidence of rapid degradation in the environment than the ones provided by any of the methods listed in section 4.1.2.9.5.	
Note 1:	
When classifying substances as Acute Category 1 and/or Chronic Category 1 it is necessary at the same time to indicate the appropriate M-factor(s) (see Table 4.1.3).	

Note 2:

Classification shall be based on the ErC50 [= EC 50 (growth rate)]. In circumstances where the basis of the EC50 is not specified or no ErC50 is recorded, classification shall be based on the lowest EC50 available.

Note 3:

When no useful data on degradability are available, either experimentally determined or estimated data, the substance should be regarded as not rapidly degradable.

Note 4:

'No acute toxicity' is taken to mean that the L(E)C50 (s) is/are above the water solubility. Also for poorly soluble substances, (water solubility < 1 mg/l), where there is evidence that the acute test does not provide a true measure of the intrinsic toxicity.

Cut-off limits for the classification of a substance are an EC50 of 100 mg/L for the lowest hazardous category "Aquatic Chronic 3", if there are no other potential environmentally hazardous properties, like a high bioaccumulation factor or poor solubility (i.e., where the highest recorded toxicity value is lower than the water solubility). If a substance has EC50 values above 100 mg/L and possesses e.g. a bioaccumulation potential, it has to be classified into Category Aquatic Chronic 4.

2.1.2 Classification of mixtures

The CLP classification of mixtures is based on arithmetic models, which refer to the sum percentage of all substances classified into one of the four hazard classes. When no toxicity data for the mixture as such are available, the following summation methods are used:

Sum of components classified as	Mixture will be classified as:
Acute 1 × M (a) ≥ 25 %	Acute 1
(a) [Remark: For an explanation of M-Factors see next paragraph]	

(Source: CLP, Annex I, Table 4.1.1: Classification of a mixture for acute hazards, based on summation of classified components)

Sum of components classified as	Mixture will be classified as:
Chronic, category 1 × M (a) > 25%	Chronic Category 1
(M × 10 × chronic, category 1) + (chronic, category 2) + chronic, category 3 > 25%	Chronic Category 2
Chronic Category 1 + Chronic Category 2 + Chronic Category 3 + Chronic Category 4 ≥ 25 %	Chronic Category 3
Chronic Category 1 + Chronic Category 2 + Chronic Category 3 + Chronic Category 4 ≥ 25 %	Chronic Category 4
(a) [Remark: For an explanation of M-Factors see next paragraph]	

(Source: CLP, Annex I, Table 4.1.2: Classification of a mixture for chronic (long term) hazards, based on summation of classified components)

In order to take into account the special hazardous potential of substances with effect concentrations below 1 mg/l so called M-Factors are introduced. Article 3 of CLP defines M-Factors as “a multiplying factor. It is applied to the concentration of a substance classified as hazardous to the aquatic environment acute category 1 or chronic category 1, and is used to derive by the summation method the classification of a mixture in which the substance is present;”. Based on intervals of 10, these M-factors are associated in an inversely proportional order, beginning with 1:

Acute toxicity	M factor	Chronic toxicity	M factor	
L(E)C50 value mg/l		NOEC value mg/l	Non-rapidly degradable components	rapidly degradable component
0,1 < L(E)C50 < 1	1	0,01 ≤ NOEC ≤ 0,1	1	-
0,01 < L(E)C50 < 0,1	10	0,001 ≤ NOEC ≤ 0,01	10	1
0,001 < L(E)C50 < 0,01	100	0,0001 ≤ NOEC ≤ 0,001	100	10
0.0001 < L(E)C50 < 0.001	1 000	0,00001 ≤ NOEC ≤ 0,0001	1 000	100
0.00001 < L(E)C50 < 0.0001	10 000	0,000001 ≤ NOEC ≤ 0,00001	10 000	1000
(continue in factor 10 intervals)		(continue in factor 10 intervals)		

(Source: Annex I CLP, table 4.1.3: Multiplying Factors for highly toxic components of mixtures)

When dealing with mixtures which consist of constituents that are not (yet) classified, and when adequate toxicity data are available, the following additive formula is to be applied, in order to estimate the combined toxicity of the constituent substances in the mixture (values from the most sensitive taxon have to be chosen):

$$\sum \frac{C_i}{C(E)L50_m} = \sum_n \frac{C_i}{C(E)L50_i}$$

where:
C_i = concentration of component i (weight percentage);
L(E)C50_i = (mg/l) LC50 or EC50 for component i;
n = number of components;
L(E)C50_m = L(E) C50 of the part of the mixture with test data

(Source: CLP Regulation, Annex I, Part 4)

The most important deviations in classification between the CLP Regulation and the Dangerous Preparation Directive (DPD) are as follows:

- Increase of hazard categories from 5 to 16 (the latter are now more related to existing transport regulations).
- Introduction of categories, instead of single or combined hazardous properties (R-Phrases), which are used in the DPD. Now, under CLP together with the defined hazard categories appropriate H- and S- statements have to be chosen instead of combining R- and S-Phrases.
- With regard to the environment: Introduction of a new class, the category 4 “safety net”.

Finally, it should be noted that the whole CLP approach is completely focusing on the aquatic compartment; e.g. no requirements are listed so far referring to the terrestrial compartment (e.g. soil, or bulk waste samples). However, with the exception of cut-off values (for soil none were defined yet) this approach theoretically can also be used for substances in soil.

2.2 Implications of the CLP Regulation to the Waste Management and Future Developments of Legislative Measures

Currently, the CLP Regulation replaces the outdated DSD and will repeal the DPD completely as of 1 June 2015. With regard to waste some legislative issues should be solved until this date. One of these issues pertains to the connection between the WFD and CLP, as in its current version the CLP Regulation explicitly excludes waste:

“Article 1 (Purpose and Scope)

3. Waste as defined in Directive 2006/12/EC of the European Parliament and of the Council of 5 April 2006 on waste (1) is not a substance, mixture or article within the meaning of Article 2 of this Regulation.” [Remark: Article 2 deals on definitions such as substance and mixture] (EC 2008b).

So far, it is not known how to solve this problem.

Another issue is, that replacing the DPD by the CLP Regulation would open a legal uncertainty, because the WFD's text (still) refers to the DPD but not to CLP. Defining criteria or references from the WFD to other legislations like the mentioned CLP is the main goal in order to secure a legally based classification and labeling scheme of waste materials.

One more uncertainty is associated with the legislative pieces CLP, DSD and DPD: in the current version of the WFD the definition of its hazard class “HP14” leaves some room for interpretation: this classification could either be based on the concentration of contained substances in waste, without regarding bioavailability and matrix, or on the waste material as such, which includes the bioavailability of the constituent substance(s). If the material would be regarded as a substance, then the criteria of the DSD or, although currently not yet foreseen, of the CLP Regulation could be applied. However, if the material would be regarded as a mixture, then the DPD had to be applied.

According to a Consultation on the review of the Hazardous Properties as of 3 May 2012 (EC 2012b) the planned revision of the WFD offers two options with regard to the property HP14. Option 1 is actually mainly an addition establishing harmonization with CLP as far as possible. In Option 2, M will be determined according to the table 4.1.3 of Annex I CLP (mentioned above) for each substance separately (EC 2008b). The presented table follows in principle the scheme provided in the CLP Regulation following the path for chronic hazards and for substances. Another issue relates to the number of hazard classes of the WFD, which in the future shall be extended to 15. These classes will be renamed as “HP 1” to “HP 15” in order to avoid confusion with the H- (=Hazard) Statements of the CLP Regulation). In order to align both legislations, some classification principles of CLP shall be integrated in the WFD (note that differing text in the two options is underlined by the authors):

Definition to be included in Annex III to Directive 2008/98/EC (EC 2008)	
HP14 'Ecotoxic': wastes which present or may present immediate or delayed risks for one or more sectors of the environment.	
Text to be included in Article 2 of Decision 2000/532/EC (EC 2000)	
Option 1	Option 2
When a waste contains a substance classified as ozone depleting and is assigned the hazard statement code(s) H420 according to the rules of Regulation (EC) No. 1272/2008 (CLP) and such individual substance equals or exceeds the concentration limit of 0.1% (v/v), the waste shall be classified as hazardous by HP14. When a waste contains one or more substance classified as aquatic acute and is assigned to the hazard statement code(s) H400 according to the rules of Regulation (EC) No. 1272/2008 (CLP) <u>and the sum substances equals or exceeds the concentration limit of 25% the waste it shall be classified as hazardous by HP14</u> Σ Aquatic Acute 1 > 25 % When a waste contains one or more substance classified as aquatic chronic 1,2 or 3 and is assigned to the hazard statement code(s) H410, H411 or H412 according to the rules of Regulation (EC) No. 1272/2008 (CLP) <u>and the sum of all substances classified aquatic chronic 1 (H410) multiplied by 100 added to the sum of all substances classified aquatic chronic 2 (H411) multiplied by 10 added to the sum of all substances classified aquatic chronic 3 (H412) equals or exceeds the concentration limit of 25% the waste it shall be classified as hazardous by HP14</u> $(100 \times \Sigma \text{ Aquatic Chronic 1}) + (10 \times \Sigma \text{ Aquatic Chronic 2}) + \Sigma \text{ Aquatic Chronic 3} > 25 \%$ a When a waste contains one or more substance classified as aquatic chronic 1, 2, 3 or 4 and is assigned to the hazard statement code(s) H410, H411, H412 or 413 according to the rules of Regulation (EC) No. 1272/2008 (CLP) and the sum of all substances classified aquatic chronic equals or exceeds the concentration limit of 25% the waste it shall be classified as hazardous by HP14 $\Sigma \text{ Aquatic Chronic 1} + \Sigma \text{ Aquatic Chronic 2} + \Sigma \text{ Aquatic Chronic 3} + \Sigma \text{ Aquatic Chronic 4} > 25 \%$	When a waste contains a substance classified as ozone depleting and is assigned the hazard statement code(s) H420 according to the rules of Regulation (EC) No. 1272/2008 (CLP) and such individual substance equals or exceeds the concentration limit of 0.1% (v/v) the waste it shall be classified as hazardous by HP14. When a waste contains one or more substance classified as aquatic acute and is assigned to the hazard statement code(s) H400 according to the rules of Regulation (EC) No. 1272/2008 (CLP) and the sum of all substances multiplied by M equals or exceeds the concentration limit of 25% the waste it shall be classified as hazardous by HP14 $\Sigma \text{ Aquatic Acute } 1 \times M > 25 \%$ When a waste contains one or more substance classified as aquatic chronic 1 or 2 and is assigned to the hazard statement code(s) H410 or H411 according to the rules of Regulation (EC) No. 1272/2008 (CLP) and the sum of all substances classified aquatic chronic 1 (H410) multiplied by 10 multiplied by M added to the sum of all substances classified aquatic chronic 2 (H411) equals or exceeds the concentration limit of 25%, the waste it shall be classified as hazardous by HP14. $(M \times 10 \times \Sigma \text{ Aquatic Chronic 1}) + \Sigma \text{ Aquatic Chronic 2} > 25 \%$

When dealing with mixtures, both options lead in principle to the same classification results. While option 1 uses fix precautionary factors (100 for aquatic chronic 1 and 10 for aquatic chronic 2), option 2 make use of the M-factors in alignment with CLP and the results should reflect the results obtained by applying CLP rules.

When dealing with substances, the CLP Regulation (Annex I Part IV) foresees the following least hazardous categories (underlining performed by the authors):

Category Chronic 3:

EC/L50 for Algae, Crustaceae and fish:

"...> 10 to ≤ 100 mg/L and the substance is not rapidly degradable and/or the experimentally determined BCF ≥ 500 (or, if absent, the log K_{ow} ≥ 4)"

Category Chronic 4 ('Safety net' classification)

Cases when data do not allow classification under the above criteria but there are nevertheless some grounds for concern. This includes, for example, poorly soluble substances for which no acute toxicity is recorded at levels up to the water solubility (note 4), and which are not rapidly degradable in accordance with section 4.1.2.9.5 and have an experimentally determined BCF ≥ 500 (or, if absent, a log K_{ow} ≥ 4), indicating a potential to bioaccumulate, which will be classified in this category unless other scientific evidence exists showing classification to be unnecessary. Such evidence includes chronic toxicity NOECs > water solubility or > 1 mg/l, or other evidence of rapid degradation in the environment than the ones provided by any of the methods listed in section 4.1.2.9.5.

Unfortunately the WFD does not define substances, nor refers the legal text to the definitions of REACH or other legislations and furthermore it does not use the word "substance" in a unique way. Therefore the question remains how to deal with substances declared as waste. A further uncertainty arises, when dealing with multiconstituent substances or UVCB (in the meaning of REACH and its Guidance Documents). In case they would be classified as environmentally hazardous under CLP and the substance(s) would be present in a relevant concentration above 25%, it is not clear, on which chemical compound(s) the classification should be based on. In addition, the presented Option 2 of the proposal for the WFD amendment does not reflect the precautionary categories Aquatic Chronic 4 and 3 for substances of the CLP Regulation. This would lead to the unsatisfying situation, to have incompatible hazard criteria for waste on the one side and for substances on the other side. According to a publication by the EC in October 2011 concerning the legal adaptation of the LOW, such differences are known and accepted within the revising working group:

"Strict alignment with CLP including concentration limits may not in all cases be appropriate for wastes and lead to changes regarding the amount of wastes being classified as hazardous".

2.3 ABANDA - A German approach to Classify on Experience and Comparison

In order to estimate the hazard potential of waste, the German state of North Rhine-Westphalia developed a freely accessible web based tool for those, who are required to estimate and classify the hazard of a waste sample. The tool Abfallanalysendatenbank ("ABANDA") is maintained by the Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV 2012). In this database chemical analytics and ecotoxicological values for waste types are compiled, each type referenced to at least one tested waste sample. The concept behind this software is a worst case scenario, which assumes, that the input of analytical data for chemical elements and which are not further specified, are associated with the highest toxic compound in this database. On the one hand the concept circumvents the issue knowing completely the composition of a certain waste sample what in principle is necessary classifying it properly. On the other hand ABANDA is a tool which predicts the hazard of a waste very roughly. The use of this tool is helpful in order to avoid underestimating the hazard potential of a material, but some properties are not reflected, such as matrix associated effects, bioavailability and synergistic or antagonistic properties of the constituents.

2.4 Current Status of the Discussion and Outlook

As shown above, a proposal about classification based on inherent properties of waste material as such is under discussion, what would combine the ABANDA concept with CLP elements (Pandard & Roembke 2013). Taken the presented methods and proposals together, the classification of waste could be based on the following principles:

- a) Biotesting of a waste sample with single tests or by a set of tests (test battery), ideally taking into account the affected compartments, where the waste shall be dumped
- b) Adaptation of the rules from the CLP-Regulation for classification of substances and mixtures
- c) A combination of the methods mentioned above.

As discussed in detail by Pandard & Römbke (2013), the last approach seems to be the most favorable. While some of the current proposals for revising the European Waste List and the Waste Framework Directive (OEKOPOL 2008; EC 2012a,b), tend to focus only on the legislation on chemicals and recommend to apply the CLP rules for mixtures and the concentration limits related thereto (Regulation (EC) No 1272/2008 (EC 2008b)) for classifying wastes as ecotoxic. Although this regulation excludes wastes from its scope, this approach can be regarded as relevant for mixtures with a limited number of constituents. It seems however more difficult to implement it for complex mixtures of partly known composition, which is a common situation for wastes. In this latter case, the performance of ecotoxicity tests on waste is generally considered as the most relevant approach because it allows integrating the effects of all contaminants including additive, synergistic and antagonistic effects. In addition, reference data (i.e. EC50, LC50, M-factors) are only available for a limited number of chemicals, which can significantly impede the use of the summation method described in the CLP regulation (EC 2008b). However, no further details about the status of the legislative progress are known to the authors.

3 Overview of the Analyzed Literature

3.1 Types of Publications

This review is based on a collection of available literature, published between 1994 and 2012, which comprises diploma and PhD thesis (e.g. Kühne, 2006; Domene, 2007), project works (Koch, 2005; Römbke et al. 2010) as well as publications in national and international journals and sector specific publications (e.g. Römbke & Moser 2007; Weiß, 2000), association information to members and an analysis of an EU-wide ring test (Moser & Roembke 2009). It is based on the collection of the authors as well information compiled by the German Federal Environment Agency (Dessau-Roßlau). The areas covered by the literature are mainly about specific aspects around environmental fate and hazards, chemical analysis and suitability of ecotoxicological tests for waste samples. The publications cover aquatic and terrestrial tests with microbes, plants and invertebrates. However, no actual overview on the status of the HP14 classification is available (Kostka-Rick, 2004; Gawlik & Moser 2006).

Some publications were excluded, for example publications which are based on the same data as other publications, which were already taken into account. In these cases the double publications were verified for additional information, which were not given

already. In summary, 54 publications were analyzed for their relevance to ecotoxicological testing of waste. After excluding some papers for reasons like doubled data sets or with less relevance, 29 publications were chosen for a detailed analysis.

3.2 Data of the Analyzed Literature

One aspect of this work was to prepare an Excel sheet, containing relevant details of the individual documents. Information listed in this spread sheet are about test material origin, sampling, test material preparation, test medium preparation, test methods as well as species and endpoints included and their corresponding resulting values of the biotests. Further, relevant information regarding chemical analytics, especially about heavy metals and PAH, is summarized, together with bibliographic citations and the allocated waste codes of the tested samples. The latter made it necessary to assign one line to each sample, blowing up the table to around 280 lines and, with regard to the different kind of information, to 175 columns. Due to this cumbersome format, the table is not annexed, but can be obtained from the corresponding author on request.

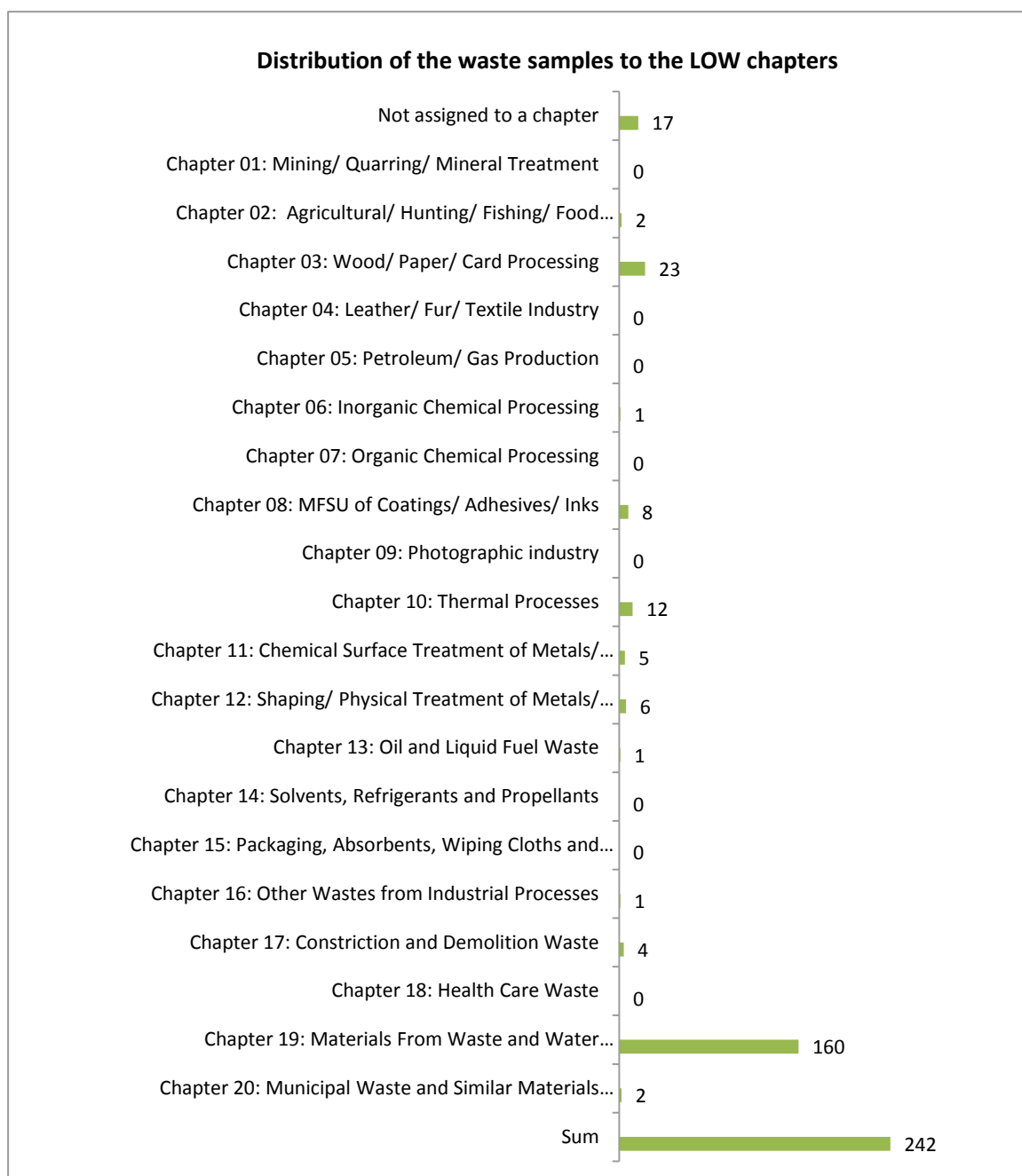
4 Results of the Literature Survey

4.1 Characterisation of the Waste Samples Published

A total of 242 waste samples were referenced in the literature on the ecotoxicological testing of wastes. The test samples found were at first clustered according to the LOW. Used categories for this work are chapters and subchapters (more detailed differentiation than to the level of subchapters was almost never available). Where possible, a complete six digit waste code was given. In cases where the authors of the analyzed literature indicated a specific LOW number to their samples, they were used for the current work. In cases with no LOW-number the descriptions of the samples were used to assign a LOW number. In the following Table the number of test data per LOW number is given.

The distribution pattern of the waste samples in the LOW shows a major peak for chapter 19 ("materials from waste and water treatment") and a much smaller one for chapter 03 ("wood, paper, card processing"). Chapters represented by a small number of test samples or casuistic only are chapter 08 ("wastes from the manufacture, formulation, supply and use of coatings (paints, varnishes and vitreous enamels), adhesives, sealants and printing inks"), chapter 10 ("inorganic wastes from thermal processes"), chapter 12 ("wastes from shaping and surface treatment of metals and plastics") or chapter 16 ("Other wastes from industrial processes"). Other chapters are not at all represented like chapter 4 ("Leather/ Fur/ Textile industry"), chapter 5 ("petroleum/ gas production") or chapter 09 ("photographic industry"). Especially surprising is the fact that out of 20 Chapters eight have not been tested at all and another group of five only one of two times. This very biased distribution pattern is shown in the following figure.

LOW No.	Chapters of the European Waste List (LOW)	Sum
0	Not assigned to a chapter	17
1	Mining/ Quarring/ Mineral Treatment	0
2	Agricultural/ Hunting/ Fishing/ Food Processing	2
3	Wood/ Paper/ Card Processing	23
4	Leather/ Fur/ Textile Industry	0
5	Petroleum/ Gas Production	0
6	Inorganic Chemical Processing	1
7	Organic Chemical Processing	0
8	MFSU of Coatings/ Adhesives/ Inks	8
9	Photographic industry	0
10	Thermal Processes	12
11	Chemical Surface Treatment of Metals/ Plastics	5
12	Shaping/ Physical Treatment of Metals/ Plastics	6
13	Oil and Liquid Fuel Waste	1
14	Solvents, Refrigerants and Propellants	0
15	Packaging, Absorbents, Wiping Cloths and Filters	0
16	Other Wastes from Industrial Processes	1
17	Constriction and Demolition Waste	4
18	Health Care Waste	0
19	Materials From Waste and Water Treatment	160
20	Municipal Waste and Similar Materials From Commerce and Industry	2
		242



In numbers, chapter 19 is represented by 160 (of in total 242) samples. The distribution pattern shows two main peaks for the subchapters 19 01 (15 publications + 76 samples) and 19 07 (7 publications + 52 samples) and three smaller peaks for the subchapters 19 05 (1 publication + 12 samples), 19 06 (2 publications + 8 samples) and 19 08 (5 publications + 10 samples). Subchapter 2 and 10 are represented by 1 sample each.

Samples belonging to subchapter of chapter 19		total
Not assigned to a subchapter	0	0
wastes from incineration or pyrolysis of waste	1	76
wastes from physico/chemical treatments of waste (including dechromatation, decyanidation, neutralisation)	2	1
stabilised/solidified wastes	3	0
vitrified waste and wastes from vitrification	4	0
wastes from aerobic treatment of solid wastes	5	12
wastes from anaerobic treatment of solid wastes	6	8
landfill leachate	7	52
wastes from waste water treatment plants not otherwise specified)	8	10
wastes from the preparation of water intended for human consumption or water for industrial use	9	0
wastes from the preparation of water intended for human consumption or water for industrial use	10	1
wastes from oil regeneration	11	0
wastes from the mechanical treatment of waste (for example sorting, crushing, compacting, pelletising) not otherwise specified	12	0
wastes from soil and groundwater remediation	13	0
	Sum	160

The second biggest chapter is 03 (wood, paper, card processing) with its subchapter 03 01 (Wood processing and the production of panels and furniture) with 1 reference and 3 test samples, subchapter 03 03 (pulp – paper and cardboard production and processing), also represented by 1 reference and 19 test samples (one sample could not be assigned to a subchapter).

Samples belonging to subchapters of chapter 03		total
Not assigned to a subchapter	0	1
wastes from wood processing and the production of panels and furniture	1	3
wastes from wood preservation	2	0
wastes from manufacture of cement, lime and plaster and articles and products made from them	3	19
Sum		23

Similar overviews are given for the subchapters of two other chapters (Nos. 10 and 8), containing 12 and eight samples, respectively.

Samples belonging to subchapters of chapter 10		total
Not assigned to a subchapter	0	0
wastes from power stations and other combustion plants (except 19)	1	6
wastes from the iron and steel industry	2	2
wastes from aluminium thermal metallurgy	3	0
wastes from lead thermal metallurgy	4	0
wastes from zinc thermal metallurgy	5	0
wastes from copper thermal metallurgy	6	0
wastes from the mechanical treatment of waste (for example sorting, crushing, compacting, pelletising) not otherwise specified	7	0
wastes from other non-ferrous thermal metallurgy	8	0
wastes from casting of ferrous pieces	9	0
wastes from casting of non-ferrous pieces	10	2
wastes from manufacture of glass and glass products	11	0
wastes from manufacture of ceramic goods, bricks, tiles and construction products	12	0
wastes from manufacture of cement, lime and plaster and articles and products made from them	13	2
waste from crematoria	14	0
	Sum	12

Samples belonging to subchapters of chapter 08		total
Not assigned to a subchapter	0	0
wastes from MFSU and removal of paint and varnish	1	8
wastes from MFSU of other coatings (including ceramic materials)	2	0
wastes from MFSU of printing inks	3	0
wastes from MFSU of adhesives and sealants (including waterproofing products)	4	0
wastes not otherwise specified in 08	5	0
Sum		8

Other chapters are not represented in relevant numbers. Thus, the distribution of waste test data is extremely biased among the 20 chapters of the LOW. Referring to the experiences made so far with these often very complex mixtures, it is highly unlikely that test results can be extrapolated from one waste class to another one, meaning that further research on the ecotoxicity of wastes belonging to other waste classes than these four is urgently needed.

4.2 Treatment and Preparation of Test Solutions and Solid Wastes

Pre-treatment of the samples, e.g. drying, sieving, milling, or homogenisation is described in the same manner as the test protocols: there are cases where nearly no description is given about the primary treatment of the test samples (e.g. Callén, 1998; Götzl, et al., 1999), while in other cases detailed procedures are presented. However, in many cases pre-treatment could be elicited, when reference was made to test protocols. For the testing of eluates, the procedure of elution itself is probably the most important single factor influencing the results of the biotests. Elution duration, pH, saltiness, agitation, kind of solvent water, ratio solvent to waste, particle size of the sample, temperature, microbial activity of the sample and the conditions of the storage influences the quality of the leachate to a different extent. For solid waste samples, sieving as well as storage conditions are directly influencing exposure and thus the outcome of the testing. Unfortunately, only 16 papers from the 26 using test batteries gave a detailed description how the waste material was prepared for further testing.

Therefore, it is urgently needed to improve performance and documentation in this part of the testing process. Detailed guidance is available (e.g. CEN 2005; Roembke et al. 2010).

4.3 Analytics

4.3.1 Physico-chemical properties

The physico-chemical properties of the waste samples are not regularly measured. Most often the following data are presented in the papers, usually because this kind of information is required by the test guidelines:

- Aquatic (eluate) waste tests: 205 in 22 paper: pH, turbidity, oxygen content
- Terrestrial (bulk) waste tests: 141 in 18 paper: pH, maximum water holding capacity, texture

However, even in case these parameters have been measured this does not mean that the results are published. Therefore, documentation and publication rules have to be improved. Ideally, the extraction method is also described, as the methodology lead to different contents of extracted compounds what was shown by Domene et al. (2008). However, this is only rarely the case.

4.3.2 Residue analytics

Data on chemical analysis of the test samples, test solutions or test soils are lacking in many of the publications. Interpretation how constituent substances influence test results is therefore difficult. However, in some cases (especially for subchapter 19 01 and 19 05) data are available, mainly presented as ion concentrations or as elemental analysis. The following substances / elements were analyzed:

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)		Metals
Naphthalene	Benz[a]anthracene	Arsenic
Acenaphthylene	Chrysene	Cadmium
Acenaphthene	Benzo[k]fluoranthene	Chromium
Fluorene	Benzo[a]pyrene	Copper
Phenanthrene	Dibenz[ah]anthracene	Manganese
Anthracene	Benzo[ghi]perylene	Mercury
Fluoranthene	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	Nickel
Pyrene	Benzo[b]fluoranthene	Lead
		Zinc

In any case, data on residue analysis are rarely found in the literature: most often in the case of heavy metals (in 12 out of 26 papers), but far less for PAH (in 3 out of 26 papers) and only once for plant protection products. The analytical determination of the most probably chemicals in a waste should be a “normal” part of any ecotoxicological study with wastes. Since it is often not known beforehand which chemicals do occur in the sample to be tested, a “standard” list, consisting at least of the most common heavy metals, should be developed. Depending on the origin of the waste further chemicals to be analyzed could be identified.

4.3.3 Chemical Analysis and the Classification of Waste

While it is obvious that contained chemical compounds are related to the toxic potential of a sample, in case of an incineration plant the process type itself contributes to the contained compounds, as shown by Alba et al. (1997). However, in cases where ashes from incineration plants were studied, any information about contained elements is a first hint for a hazard classification (or even an environmental risk assessment). In this context, the procedure of extracting/ leaching a sample in order to prepare a test solution has some importance (Ortiz et al.; 1995).

Both in terms of the analytical efforts and the direct use of the measured data the investigation of heavy metals is relatively easily performed (for classification purposes, it is not decisive which metal salt does occur in a waste – the metal ion is relevant). Unfortunately, the situation is more complicated in the case of organic materials: it is not possible to deduce from ions or elemental analysis to concrete parent substances, but this would be necessary in order to classify a sample according to common standards. This well-known problem makes it difficult to use analytical data directly for regulatory purposes. In addition, as databases used for classification and labeling do normally not cover ions and elements, but compounds.

Therefore, ideally it would be helpful to have a database available with entries for ion toxicity – although it is not to be expected that such a data base can and will be established in the near future. However, the structure for such a database would be already available with the CLP inventory database, hosted by the ECHA. Such enlargement of the CLP database would also be helpful in another regulatory context, the

REACH Regulation. But since its scope excludes substances declared as waste, only materials which are recovered and lose their status as waste, are in the scope of the regulatory requirements of REACH.

For example, this is true for metal scrapes, which are produced by manufacturing processes. The precursor substance of the scrapes is covered by REACH, whereas the metal scrapes are not. If these scrapes are sorted and melted in order to produce new pre-products, the material would be covered by REACH again (but, as a recovered substance, some facilities are granted, especially if the life cycle begins within the same supply chain). In this simple example the recovered substance had probably the same inherent physicochemical properties as the precursor material. In contrast to the example mentioned above, residues from combustion like incineration ashes and slags can by no means be regarded as recovered materials according to the REACH Regulation: these substances did not exist before combustion, and thus they cannot be regarded as recovered substances in *sensu* REACH.

In cases, where such materials shall fulfill a specific function instead of being dumped or deposited as waste, a full registration under REACH would be mandatory and for such a registration, information requirements for the relevant tonnage band of the REACH Regulation had to be fulfilled. Toxicity values have to be generated in order to fulfill these REACH requirements. Thus, it can be expected, that in the future more information about the toxicity of waste materials will be available – filling an ecotoxicologist's wish list database. For some materials, such data is already available in the meantime: as the above mentioned combustion ashes and slags are used as ingredients of concrete materials and some of the combustion materials are registered, some data are available in the REACH Registration and the CLP database (see for example <http://apps.echa.europa.eu/registered/data/dossiers>).

4.4 Test Protocols

Most of the publications refer to international standard protocols from OECD, ISO, DIN, AFNOR etc. However, a few – mainly basic scientific - experiments were described without referring to guidelines (e.g. Domene, 2007; Fuchs et al. 1999; Michniewicz et al. 2000). Deviations to ISO and DIN protocols could not always be evaluated in detail, but descriptions like „according to“, „based on“ etc. were given several times). However, it is assumed that these deviations did not compromise the test results; i.e. these data sets were included in the data sheet.

From 26 papers using a battery of standard ecotoxicological tests, nine of them referred to DIN/ISO guidelines, while five cited OECD guidelines and two used the national AFNOR guidelines (which are often quite similar to those from ISO. This is a surprisingly low number, knowing that many waste tests were performed with quite simple and/or old methods. Even more astonishing is the fact that simple Toxkit protocols have been used in 22 cases despite the fact that these protocols have never been standardised (some of them are currently under investigation by ISO) (Vaajasaari et al., 2000). From the analyzed papers no one cited CEN guidelines which is probably caused by the fact that CEN does not publish test guidelines but guidance papers describing the background of waste testing (e.g. CEN 2005).

4.5 Test Organisms

From an ecological point of view the test species found in the literature can be categorised into producers (algae and higher plants, belonging to a broad spectrum of distinct genera like *Lemna*, *Brassica*, *Avena*, *Pisum* and *Vicia*), herbivorous and predatory consumers (rotifers, crustaceans and fish, but with few terrestrial species like a predatory mite) and to saprophagous destruents (bacteria, earthworms, enchytraeids, springtails). From a systematic point of view, the Regnum Bacteria is represented by 8 species/communities from both the soil and the aquatic compartment. While it is not surprising that the relatively old, cheap and quick Microtox test is most often listed (it uses the luminescent species *Vibrio fischeri*) the low number of tests (just 4) with the whole microbial community was not expected, since these tests (e.g. total soil respiration) are usually easy to perform and well established (e.g. in the context of the risk assessment of contaminated sites). The other species do not play a role in waste testing at all or are very specific (e.g. *S. typhimurium* is used in the ISO test on genotoxicity (ISO 2000)).

Bacteria	Numbers
<i>Arthrobacter globiformis</i>	3
<i>Echerichia coli</i>	1
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	1
<i>Pseudomonas putida</i>	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	3
Soil microorganisms, microflora	4
<i>Vibrio fischeri</i>	15
Total group number	7

In the aquatic compartment, the Regnum Plantae is represented by some green algae (mainly unicellular species) and by one genus of higher plants: *Lemna* (family Araceae). By far the most important and regularly tested species are the green Algae. Despite the fact that both species (*P. subcapitata*, *D. subspicatus*) could be used in the ISO test they reacted differently sensitively in the European ring test (Moser & Römbke 2009).

Aquatic plants	Numbers
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	1
<i>Pseudokirchnerella subcapitata</i>	8
<i>Desmodesmus subspicatus</i> (incl. former name: <i>Scenedesmus</i> sp.)	13
<i>Lemna minor</i>	5
Total species number	4

Terrestrial plants used in the tests belong to the families (genera in brackets) *Amaranthaceae* (*Atriplex*), *Brassicaceae* (*Brassica*, *Raphanus*), *Fabaceae* (*Cicer*, *Pisum*, *Vicia*) and *Poaceae* (*Avena*, *Hordeum*, *Zea*). Most often one species of the main groups

(Monocotyledoneae, Dicotyledoneae) is tested, usually *Avena sativa* (oat) and *Brassica rapa* (turnip), respectively. Therefore, it is surprising that in the waste tests so many different species (in total 16) have been used.

Terrestrial plants	Numbers	Terrestrial plants	Numbers
<i>Artiplex hortensis</i>	1	<i>Lens culinaris</i>	1
<i>Avena sativa</i>	6	<i>Lepidium sativum</i>	3
<i>Brassica oleracea</i>	1	<i>Lupinus sp.</i>	1
<i>Brassica campestris</i>	1	<i>Lycopersicum esculentum</i>	1
<i>Brassica napus</i>	2	<i>Nicotiana tabacum</i>	1
<i>Brassica rapa</i>	4	<i>Raphanus sativus</i>	1
<i>Cicer arietinum</i>	1	<i>Sorgum bicolor</i>	1
<i>Lactuca sativa</i>	3	<i>Vicia faba</i>	1
Total species number	8	Total species number	8

In the Regnum Animalia aquatic test species were selected from only families Daphniidae (Daphnia, Ceriodaphnia) and Thamnocephalidae (Thamnocephalus), both belonging to the Branchiopoda, from Spirostomidae (Spirostomum, a unicellular ciliate protist) and from fish of the family Cyprinidae (Leuciscus, Danio). By far the most important aquatic test species is *Daphnia magna* which has been used in ecotoxicology for several decades. In some countries other Daphnid species are preferred (e.g. *C. dubia* in France). Tests with fish are surely an absolute exception, while the other species listed here used in Toxkit tests. No sediment-dwelling species have been used in waste ecotoxicological testing so far; probably, because it is very difficult (and maybe not really relevant) to simulate an appropriate exposure scenario.

Aquatic animals	Numbers	Aquatic animals	Numbers
<i>Brachionus calyciflorus</i>	2	<i>Leuciscus idus</i>	2
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	3	<i>Spirostomum ambiguum</i>	2
<i>Danio rerio</i>	1	<i>Tetrahymena thermophila</i>	2
<i>Daphnia magna</i>	11	<i>Thamnocephalus platyrus</i>	4
<i>Daphnia pulex</i>	1	Total species number	9

Concerning terrestrial test species, with the exception of one paper covering nematodes (*Caenorhabditis*), only two groups have been tested so far, characterized by different exposure pathways: hard-bodied arthropods and soft-bodied annelids, the latter being much more in contact with the soil pore water (and dissolved chemicals) than the former. Arthropods are represented by three families of Collembola (springtails): Hypogastridae (*Ceratophysella*), Isotomidae (*Folsomia*) and Entomobryidae (*Sinella*), while among annelids Lumbricidae (*Eisenia*, *Lumbricus*) and Enchytraeidae (*Enchytraeus*) were used. Almost all tests were performed with standard species: *F. candida* (Collembola) and *E. fetida*/*E. andrei*.

Terrestrial animals	Numbers	Terrestrial animals	Numbers
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	<i>Enchytraeus crypticus</i>	1
<i>Ceratophysella denticulata</i>	1	<i>Folsomia candida</i>	7
<i>Eisenia andrei</i>	4	<i>Lumbricus rubellus</i>	1
<i>Eisenia fetida</i>	5	<i>Lumbricus terrestris</i>	1
<i>Enchytraeus albidus</i>	1	<i>Sinella coeca</i>	1
Total species number	5	Total species number	5

Summarising the species tested so far, it seems that plants are well represented by different systematic groups, but in the case of animals the taxonomic spectrum is relatively narrow: for example, Insecta (aquatic and terrestrial, especially predators, herbivores and sediment or soil dwellers), sediment dwelling worms (e.g. *Lumbriculus*, *Tubifex*), Mollusca (snails, slugs and bivalves) are underrepresented. For reasons of animal welfare, testing of Vertebrata (in fact including fish, with the possible exception of fish eggs) should not be included. However, extending the list of test species in the context of waste classification is not absolutely necessary since for this kind of testing the use of few standard organisms for reasons of comparability and legal acceptability is more important. When evaluating the usage of wastes in the field (i.e. in case a full environmental risk assessment has to be performed) surely more species, relevant for specific environmental compartments, becomes more important.

Bearing in mind, that a) the sensitivity of a species is dependent on the kind of the contaminant, b) the test media itself contribute to test results and that c) the physicochemical properties of the test sample beyond the constituent composition are responsible for the test results, it is concluded, that a core data set with different species and trophic levels is necessary, in order to determine the ecotoxicological hazard profile of a waste sample.

4.6 Endpoints and Sensitivity

The spectrum of researched endpoints across all analyzed publications is broad and covers basic reactions as well as more complex responses of organisms and, in the case of microbes, even communities. For example, immobilization of *Daphnia* (ISO 2012) represents a common and simple endpoint, whereas plant root morphology (Ferrari et al., 1999), reproduction of *Ceriodaphnia dubia* (Clément et al., 1996; Ferrari et al., 1999) or

Eisenia fetida (Grumieaux et al., 2007), not to mention bioaccumulation (Brasser, 2002) are much more complex.

Bacterial tests, performed on the single species or on the community level, are used for the aquatic and terrestrial compartment. Endpoints measured in these tests are contact toxicity, enzymatic activity, bioluminescence, genotoxicity or respiration rate (Baun et al., 2004; Brackemann et al., 2000; Callén et al., 1998; Deventer & Zipperle, 2004; Kampke-Thiel et al. 1994).

In tests with aquatic Algae, growth is the most commonly used endpoint (Kaneko, 1996; Latif & Zach, 2000; Mala et al., 2000; Moser et al., 2008), while in tests with higher aquatic plants the number of fronds is used (Brackemann et al., 2000; Clément et al., 1996; Koch, 2005; Kühne 2006). Reproduction tests with aquatic plants were not found in the literature, what is not astonishing, since aquatic plant species used for standard aquatic tests reproduce vegetatively (e.g. *Lemna*). Among aquatic consumers, especially Crustacea (e.g. *Thamnocephalus*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*), immobilisation (i.e. mortality) is the endpoint most often used (Clément et al. 1996; Ferrari et al. 1999; Deventer & Zipperle, 2004; ISO 1012b). Ecologically more relevant and usually more sensitive, but more demanding in terms of time and efforts, is the endpoint reproduction, which can be measured in tests with Rotifera (Ferrari et al., 1999) or both *Daphnia* species (Clément et al. 1996, Ferrari et al. 1999). Mortality in fish is described as an endpoint for two species (Brackemann et al., 2000).

In terrestrial plants germination is used as an endpoint for different species (Lors et al., 2010; Fuchs et al., 1997; Martin et al., 2005), but since seeds are well protected against any influences from the outside, it is not very sensitive (Ferrari et al., 1999; Martin et al., 2005). Therefore growth, measured as fresh or dry weight (sometimes combined with length of the main shoot), are the recommended endpoints (Latif et al., 2000; ISO 2012d). More exotic endpoints are root morphology and enzymatic stress responses (Ferrari et al., 1999) or photosynthesis rate and chlorophyll fluorescence (Brasser, 2002).

In tests with terrestrial animals, especially earthworms and enchytraeids, the oldest but also least sensitive endpoint is mortality (Grumieaux et al., 2007; Koch, 2005; Römbke & Moser, 2007), while biomass (= weight loss) (Kobeticová et al., 2009), the avoidance reaction (Baun et al., 2004; Kobeticová et al., 2009) and in particular reproduction are usually much more sensitive. Different reproduction parameters like numbers of cocoons per worm or hatchlings per adult are reported for various invertebrate species (Domène, 2007; Grumieaux et al., 2007). Feeding inhibition as another chronic endpoint has been published for the springtail *Folsomia candida* (Domène et al., 2007).

However, independent from the selected test species and endpoint, in order to assess the hazard potential of a sample, obtained test results are also influenced by abiotic, e.g. physico-chemical parameters of the test substrate: Lors et al. (2010) demonstrated that test results derived with different species and endpoint like germination and growth in *Brassica* sp., mortality in earthworms and reproduction in *Folsomia* differ in various soil types. Also the selected species differ in their sensitivity: Kobeticová et al (2009) compared the ecotoxicity of wastes in avoidance tests with *Enchytraeus albidus*, *E. crypticus* and *Eisenia fetida* and found that *E. fetida* responded more sensitive than *E. albidus* or, especially, *E. crypticus*.

The endpoint bioaccumulation is not an effect endpoint, but mainly an indicator of exposure (or indicating the potential for secondary poisoning of predatory species). It cannot be covered in short term tests or in tests with unicellular species. Thus, bioaccumulation is usually tested in chronic tests with fish in water, lumbriculid worms in sediment, and earthworms or enchytraeids in soil according to OECD guidelines. However, this endpoint has not been used in waste classification so far but may play a role in waste risk assessment.

The analysis of the literature shows that single endpoints or single species tests indeed can give hints of a toxic potential, but necessarily do not represent the actual hazard potential of a waste sample. Therefore, results with a whole test battery, consisting of different endpoints studied in different species are much more promising in order to depict the actual hazard potential of a waste sample. Additionally, knowledge about a core data set of relevant physico-chemical parameters is necessary for a selection of suitable endpoints and species.

4.7 Test Batteries

In order to predict reliably, whether or not a waste material is hazardous or not, an appropriate choice of the test species and endpoints is mandatory as demanded by Isidori et al. (2003), Wilke et al. (2007) or Pablos et al. (2009). As a minimum the eluates and the solid phase of a waste should be tested using aquatic and terrestrial species as well as different, preferably chronic endpoints. Microbes, animal and plants could show different sensitivity to the same waste sample, but even within these groups considerable differences in sensitivity have been observed. This fact is demonstrated by Lors et al. (2010) who showed that the springtail *Folsomia candida* responded more sensitive to PAH soil contamination than other organisms in an avoidance test according to Martinez Aldaya et al. (2006).

Proposals for the composition of a test battery vary widely within the reviewed literature. Therefore, research was performed in order to find out which is the most suitable set of tests for a (certain) waste type. In total, 29 publications were found discussing the selection of tests for the ecotoxicological classification of wastes. Three of them focused on single tests while from the remaining 26, eleven recommended both aquatic and terrestrial tests (the rest (15) did cover just one of the two groups). In almost any case the respective authors recommended species from different trophic level and the usage of different endpoints.

The first paper addressing the identification of the most suitable battery of tests was published by Pandard et al. in 2006. They discussed the suitability of a range of ecotoxicological tests, i.e. four aquatic tests with eluates (i.e. growth inhibition of *Pseudokirchneriella subcapitata* (duration: 3 days), inhibition of mobility of *Daphnia magna* (48 h), inhibition of reproduction of *Ceriodaphnia dubia* (7 days), and inhibition of light emission of *Vibrio fischeri* (30 min)) and two solid phase tests (an emergence and growth inhibition test with *Lactuca sativa* (14 days) and a mortality test with *Eisenia fetida* (14 days)). As a basis for this discussion, about 30 wastes were tested with all the above-mentioned test methods. Based on the comparison of these test results, the following battery was recommended: a solid phase test with *L. sativa* and two eluate tests performed with *V. fischeri* and *C. dubia*. In fact, making a claim for battery testing is not

new, Wundram et al. (1996) emphasized a wide range of tests, comprising some bacterial as well as plant tests in order to estimate the hazardous profile of a sample.

Summarising the recommendations by Pandard et al. (2006) and taking the recommendations of an EU workshop into account (Gawlik & Moser 2006), an international ringtest with 60 laboratories was performed, using a core battery of three aquatic and three terrestrial tests, respectively. In addition, ten further tests were investigated by a smaller number of laboratories, including an eluate test with the endpoint genotoxicity.

Battery of tests used in the EU ringtest (Moser & Römbke 2009):

Test	Endpoints	Duration	Standard
Luminescent bacteria test (<i>Vibrio fischeri</i>)	Inhibition of light emission	30 min	ISO 2007a
Freshwater algal test (<i>Desmodesmus subspicatus</i> or <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	Inhibition of population growth	72 h	ISO 2012a
Acute crustacean test (<i>Daphnia magna</i>) -	Inhibition of mobility	48 h	ISO 1996
Test with higher plants (<i>Avena sativa</i>)	Inhibition of growth	14 d	ISO 2012c
Test with higher plants (<i>Brassica napus</i>)	Inhibition of growth	14 d	ISO 2012c
Acute earthworm test with <i>Eisenia andrei/fetida</i>	Mortality	14 d	ISO 2011

Based on the results of this ringtest, the acute earthworm test was discarded in favour of the earthworm avoidance test because of its very low sensitivity. For the same reason (and in order to cover the same taxonomic and physiological groups as in the case of the eluates test), the plant test with *A. sativa* was replaced by the Bacteria contact test (*A. globiformis*). In fact, this modified battery is also the one which has been included in the newest recommendation for the classification of wastes according to the HP 14 property (Pandard & Roembke 2013).

Battery of tests recommended for waste testing in the future (Pandard & Roembke 2013):

Test	Endpoints	Duration	Standard
Luminescent bacteria test (<i>Vibrio fischeri</i>)	Inhibition of light emission	30 min	ISO 2007a
Freshwater algal test (<i>Desmodesmus subspicatus</i> or <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	Inhibition of population growth	72 h	ISO 2012a
Acute crustacean test (<i>Daphnia magna</i>)	Inhibition of mobility	48 h	ISO 1996
Bacteria Soil contact test (<i>Arthrobacter globiformis</i>)	Inhibition of enzyme activity	6 h	ISO 2012b
Test with higher plants (<i>Brassica napus</i>)	Inhibition of growth	14 d	ISO 2012c
Short term earthworm test with <i>Eisenia andrei/fetida</i>	Avoidance behaviour	48 h	ISO 2007b

4.8 Ecotoxicological Effects of Physicochemical Properties

4.8.1 Effects Related to Physical Appearance and Origin

The measurement of the hazard potential of waste eluates or solid waste samples via ecotoxicological tests is surely influenced by contaminants, but also by several other factors often neglected: In the case of eluates the extraction method itself is of utmost importance, since it determines the physico-chemical properties of the eluates and, thus, also the exposure of the test organisms and, finally, the test results. In addition, the appearance of solid waste samples (e.g. whether there are a fine powder or large granules), can have the same effect on terrestrial test organisms (see, e.g., Brackemann et al. 2000).

The literature analysis does show that test results also depend on the origin of the tested waste samples. Obviously, waste samples from the industrial sites and from private households differ in their chemical composition and also in their toxicity. This is shown by Brasser (2002), who found, that from ten different ashes, slags and filter dust from power plants domestic waste incineration ashes showed the highest concentration of hazardous elements. The age of a material is a further parameter which contributes to test results. It was demonstrated by Grumiaux et al. (2007), that aging of material leads to reduced toxicity effects of the researched materials, an observation found by other authors too (Latif et al.(2002), Croucau (2002), Ferres et al. (1997)). However, the correlation between physical appearance, origin or even chemical composition with toxicity is not a simple one. For example, there was no correlation between the heavy metal content of a dozen ash samples and their aquatic or terrestrial toxicity Römcke et al. (2008). The same conclusion was drawn by Lapa et al. (2002) who tested the eluates of seven comparable bottom ashes from municipal solid waste incineration plants: chemical analysis was not sufficient to evaluate the ecotoxicological potential of a sample, i.e. there was no correlation between the results of the residue analysis and the results of ecotoxicological tests.

4.8.2 Effects of pH, Salt and Organic Matter

Brasser et al. (2002) identified the parameters pH and ion concentration as factors affecting the outcome of a test. Grumiaux et al. (2007) demonstrated with earthworm tests that the salt content of a medium (in combination with the pH) can affect ground dwelling organisms significantly, an observation which is assisted by the results of Triffault-Bouchet et al. (2003) and Schrader (1998), who also found that salt concentration unspecifically mimics the toxicity of pollutants. However, as pH and salt concentrations themselves, are parameters affecting organisms, the leaching time is often correlated to the toxicity of a sample.

In addition, the toxicity of contaminants in an eluate depends not only on its toxic properties but also on the interaction of these contaminants with the test substrate (in this example: soil used for dilution). Adding humic acid-sodium salt, bentonite and montmorillonite reduced the toxicity of a sample significantly. Malas et al. (2000) studied the influence of solidifying lime water to fly ash and blast furnace slag and found that toxicity is altered in some cases positively and in other cases negatively.

Besides lowering the bioavailability of contaminants by added or contained constituents to and of a waste sample, the material itself impacts the outcome of a test (i.e. toxic

effects are masked), as it offers an additionally food source (Croucau et al. 2002). These authors assessed toxic effects of different waste types (ash, metal hydroxide sludge and paper mill) in mixtures with soil on the population development of *Folsomia candida*. They concluded that organic rich material, used as a supplementary diet, could compensate (or masking) toxic effects.

4.9 Heavy Metals and Toxic Effects

Some of the analyzed publications deal with the toxicity of heavy metals (mainly copper, cadmium and mercury). Other metals were rarely studied, like zinc and nickel, which were found to be similar in their effects in daphnids (Seco et al. 2003). Even when analytical data were provided in some publications, correlations between heavy metal content and ecotoxicological effects were not obvious (or were not even studied). The difficulty to estimate the hazard potential of heavy metals is shown by Römbke, et al. (2008), who systematically researched the influence of extraction methods on municipal waste incineration ashes. While they could demonstrate that different elution methods led to different concentrations of metals in the eluates, the NOECs derived from biotests with these eluates did not show a clear correlation between ion concentrations and observed toxic effects. Instead it was concluded that the mercury content in the eluates could play a role in the toxicity of the eluates.

The hypothesis that toxicity depends on the interaction of contaminants was shown by Kaneko (1994). He observed that municipal waste incineration leachate containing cadmium caused a 20 – 30 times higher mortality in a *Daphnia* test than expected when estimating the toxicity based on the cadmium content. The effect on the growth of Algae was about seven times higher than expected. These results were explained by an additive effect between cadmium and the other contaminants in the Algae test, while in the *Daphnia* test an antagonistic effect was observed. This interaction between elements seems not to be restricted to toxic elements, also no-toxic components like potassium or calcium seems to trigger the toxicity of other compounds (Stiernström et al., 2010). A further heavy metal identified as detrimental factor for toxicity in ecotoxicological tests is copper. In a comparison of eluate tests with and without adjusted pH Brackemann (2000) found higher toxic effects at pH 4 than of the eluates without pH adjustment, an observation which is congruent to the findings of Römbke, et al. (2008).

With regard to the long term deposition of the material (landfill), bioaccumulation of heavy metals becomes an important factor, in particular in plants such as *Nicotiana* (Brasser 2002). Waste deposited at landfills is stored there for long periods of time and consists of a complex mixture. Many substances (including their degradation products) can be found in leachates of such sites. Again, when testing these leachates, Baun et al. (2004) found that it is not possible to correlate chemical concentrations with the toxicity of landfill leachates. In fact, the only robust result was that samples with the highest concentration of contaminants were also the most toxic ones. This finding is supported by other authors (Lapa et al. 2002; Clément, 1996; Brackemann, 2000; Schultz et al., 2001; Domene, 2007; Radetzki et al., 2004).

4.10 PAH contamination and Toxic Effects

In the analyzed literature the number of publications dealing with PAH toxicity in waste is limited, despite the fact that this group of chemicals has been studied intensively in

ecotoxicology. The available information indicates that they cause only rarely acute effects but regularly chronic sublethal impacts. A clear correlation between PAH concentration in a waste sample and observed effects could not be demonstrated so far. In an international ring test initiated by UBA and ECT, one of the waste samples tested was a soil contaminated with PAHs. This waste was neither very toxic in plant tests nor in the acute earthworm test (their high adsorption and thus low bioavailability might played a role). The latter observation may not be representative for the hazard potential of PAH, as the endpoint earthworm mortality in general is not sensitive. However, in an avoidance test with *Collembola* significant effects were observed (Lors et al. 2010). However, Callén et al. (1998) pointed out that PAH should not be regarded as a homogenous group. They found effects of PAH on *Vibrio fischeri* to be more correlated to the incineration temperature than to the total amount of PAH. As different compounds are formed at different temperatures, the observed effects can be ascribed to different PAH. Unfortunately, the authors do indicate whether these substances are 2, 3, 4 or more ring systems. On the other hand, Lors et al. (2010) described a clear correlation between the concentration of three ring PAH and the toxicity in springtails (reproduction and avoidance), earthworms (mortality) and *Lactuca* (germination and growths).

In the general literature PAH are treated as substances of high concern. Their presence is often strongly related to effects on many life cycle stages in a lot of species. Consequently, the negative impact of this substance group is considered in substance-related legislation by distinct measurements and limit values.

5 Conclusion and Recommendations

The main question right now is: How will the ecotoxicological properties of waste be determined in future legal regulations? According to recent discussions within the European Union, current proposals for revising the European Waste List and the Waste Framework Directive tend to focus only on the legislation on chemicals and recommend applying the CLP rules for mixtures and the concentration limits related thereto for classifying wastes as ecotoxic. However, it seems to be very difficult to implement it for complex mixtures of partly known composition, which is a common situation for wastes. In our view, the performance of ecotoxicity tests on waste is the most relevant approach because it allows integrating the effects of all contaminants including additive, synergistic and antagonistic effects.

With regard to the special conditions of waste, preferably the concentration, distribution and environmental fate of the substances contained in the waste, should be known. However, in (almost) all cases the chemical mixture of a waste sample is so complex that it is impossible to have this information quantitatively. Therefore, the performance of aquatic and terrestrial ecotoxicological tests is the appropriate approach for the hazard classification of wastes. When doing so, it is common sense, to choose species for ecotoxicological tests differing in their ecology, taxonomy, morphology and exposure. In addition, it is necessary to cover acute as well as chronic endpoints.

In accordance with existing legislation covering ecotoxicological hazard assessment (e.g. REACH, CLP, Plant Protection Products and Biocidal Products Regulation) Algae as primary producers and primary consumers like daphnids should surely be tested. According to the analyzed literature, Bacteria should also be covered. In principle, the

same organism groups should be studied in the terrestrial part of the test battery. Thus, a plant (primary producer), saprophagous organisms such as earthworms and a Bacterium are proposed here too. In case of concern, a genotoxicity test should also be considered using waste eluate.

Acknowledgements

This review was supported by the German Federal Environment Agency (Umweltbundesamt, Dessau-Roßlau). We thank in particular Dr. H. Moser, who provided her tremendous background knowledge on all aspects of waste ecotoxicology.

6 References

- Alba, N.; Gasso, S.; Lacorte, T.; Baldasano, J.M. (1997): Characterization of Municipal Solid Waste Incineration Residues from Facilities with Different Air Pollution Control Systems. *Journal of the Air&Waste Management Association* 47: 1170-1179.
- Baun, A., Ledin, A., Reitzel, L.A., Bjerg, P.L., Christensen, T.H. (2004): Xenobiotic organic compounds in leachates from ten Danish MSW landfills - chemical analysis and toxicity tests. *Water Research* 38: 3845-3858
- Brackemann, H., Hagendorf, U., Hahn, J., Vogel, U. (2000): Untersuchung von Abfällen mit biologischen Testverfahren zur Bewertung der Wassergefährdung. Teil 1: Experimentelle Ergebnisse. *UWSF - Z Umweltchem Ökotox* 12: 5-12.
- Brasser, T., Bahadir, M., Schramm, K.-W. (2002): Erprobung und Anpassung ökotoxikologischer Methoden zur UTD-relevanten Abfall-Eluate. Abschlußbericht der GRS im Auftrag des BMBF
- Callén, M., Marannón, E., Mastral, A., Murillo, R., Salgado, P., Sastre, H. (1998): Ecotoxicological assessment of ashes and particulate matter from fluidized bed combustion of coal. *Ecotoxicology Environmental Safety* 41: 59-61.
- CEN (Comité Européen de Normalisation) (2005): Characterization of waste – Preparation of waste samples for ecotoxicity tests. EN 14735. European Standard, Brussels, Belgium.
- Clément, B., Persoone, G., Janssen, C., Le Dû-Delepierre, A. (1996): Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. *Chemosphere* 33: 2303-2320.
- Croucau, Y.; Gisclard, C.; Perotti, P. (2002): The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) in bioassays of waste. *Applied Soil Ecology* 19: 65-70.
- Deventer, K., Zipperle, J. (2004): Ökotoxikologische Charakterisierung von Abfall - Verfahrensentwicklung für die Festlegung des Gefährlichkeitskriteriums "ökotoxisch (H14)". Baden Württemberg, Ökologische Umweltbeobachtung 2: 123 p.
- Domene, X. (2007): Methodologies using soil organisms for the ecotoxicological assessment of organic wastes. Ph.D. Thesis, University of Barcelona, Spain. 217 S.
- Domene, X.; Natal-da-Luz, T.; Alcaniz, J.M.; Andrés, P.; Sousa, J.P. (2007): Feeding inhibition in the soil collembolan *Folsomia candida* as an endpoint for the estimation of organic waste ecotoxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 1538-1544.
- Domene, X.; Alcaniz, J.M.; Andrés, P. (2008): Comparison of solid-phase and eluate assays to gauge the ecotoxicological risk of organic wastes on soil organisms. *Environmental Pollution* 151: 549-558.
- EC (European Commission) (1967): Council Directive 67/548/EEC of 27 June 1967 of the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. *Official Journal of European Communities*, 196, 16.8.1967, p 1-98.
- EC (European Commission) (1999): Directive 1999/45/EC of the European Parliament and of the Council of 31 May 1999 concerning the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the classification, packaging and labelling of dangerous preparations, *Official Journal of the European Communities*, L 200, 30.7.1999, p 1-68.

- EC (European Commission) (2000): Commission Decision 2000/532/EC of 3 May 2000 replacing Decision 94/3/EC establishing a list of wastes pursuant to Article 1(A) of Council Directive 75/442/EEC on waste and Council Decision 94/904/EC establishing a list of hazardous waste pursuant to Article 1(4) of Council Directive 91/689/EEC on hazardous waste (notified under Document Number C(2000) 1147).
- EC (European Commission) (2006): Regulation No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No. 793/93 and Commission Regulation (EC) No. 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Regulations 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC.
- EC (European Commission) (2008a): Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives. Official Journal of the European Union L312, 22.11.2008, p 3-30.
- EC (European Commission) (2008b): Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. Official Journal of the European Union L 353, 31.12.2008, p 1-1355.
- EC (European Commission) (2012a): <http://ec.europa.eu/environment/waste/index.htm>.
- EC (European Commission) (2012b):
http://ec.europa.eu/environment/waste/framework/pdf/Technical_proposal_tc.pdf
- Ferrari, B., Radetski, C.M., Veber, A.-M., Ferard, J.-F. (1999): Ecotoxicological assessment of solid wastes: a combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1195-1202.
- Ferres, M., Helfer, A., Ehrig, H.-J. (1997): Anwendbarkeit biologischer Testverfahren bei der Beurteilung von mechanisch-biologisch vorbehandelten Siedlungsabfällen. *Entsorgungspraxis* 12/97: 54-64.
- Fuchs, B.; Track, C.; Lang, S.; Gimmler, H. (1997): Salt effects of processed municipal solid waste incinerator bottom ash on vegetation and underground water. *Vereinigung für Angewandte Botanik* 71: 154- 163.
- Gawlik, B.M.; Moser, H. (2006): Workshop Proceedings, Problems around soil and waste III - The H-14 criterion and (bio)analytical approaches for ecotoxicological waste characterization. 179 p.
- Götzl, A.; Malissa, H.; Riepe, W. (1999): A rapid toxicological test method with Luminous bacteria for laboratory and on-site assessment of wastes and contaminated soils. *Field Analytical Chemistry and Technology* 3: 329-337.
- Grumiaux, F., Demuyne, S., Schikorski, D., Lemièvre, S., Vandenbulcke, F., Leprêtre, A. (2007): Effect of fluidized bed combustion ashes used in metal polluted soil remediation on life history traits of the oligochaeta *Eisenia Andrei*. *European J. Soil Biology* 43: 256-260.
- Höss, S., Jänsch, S., Moser, T., Junker, T., Römbke, J. (2009): Assessing the toxicity of contaminated soils using the nematode *Caenorhabditis elegans* as test organism. *Ecotox. Envir. Safety* 72: 1811-1818.

- Isidori, M.; Lavorgna, M.; Nardelli, A.; Parrella, A (2003): Toxicity identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: a multispecies approach. *Chemosphere* 52: 85-94.
- ISO (International Organization for Standardization) (2000): Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test. ISO 13829. Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). (2007a):. Water quality – Determination of the inhibitory effect on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test). 11348-3. Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). (2007b): Soil Quality – Avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals. Test with Earthworms (*Eisenia fetida/andrei*). ISO 17512-1. Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). (2012a): Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692. Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). (2012b): Water quality –Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. ISO 6341, Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization). (2012c): Soil Quality – Quality of solid samples - Solids contact test using the dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis*. ISO/WD 18187. Geneva, Switzerland.
- ISO (International Organization for Standardization) (2012d): Soil quality – Determination of the effects of pollutants on soil flora – Part II: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants. ISO 11269-2. Geneva, Switzerland.
- Kampke-Thiel, K., Freitag, D., Kettrup, A., Bahadir, M. (1994): Ecotoxicological assessment of inorganic waste disposal in salt mines part I: tests with aquatic organisms. *Fresenius Envir. Bull.* 3: 113-118.
- Kaneko, H. (1996): Evaluation of municipal waste incinerator fly ash toxicity and the role of cadmium by two aquatic toxicity tests. *Waste Management* 16: 555- 559.
- Kobeticová, K.; Hofman, J.; Holoubek, I. (2009): Ecotoxicity of wastes in avoidance tests with *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Waste Management* 30: 558-564.
- Kostka-Rick, R. (2004): Ökotoxikologische Charakterisierung von Abfall – Literaturstudie. LfU Karlsruhe, Ökologische Umweltbeobachtung 3: 1-108.
- Koch, K. (2005): Untersuchung von Verfahren zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen. Projektarbeit, Technical University Berlin, Germany. 80 p.
- Kühne, T. (2006): Ökotoxikologische Bewertung von Abfällen. Diploma thesis, Technical University Berlin, Germany. 120 p.
- LANUV (2012): Abfallanalysendatenbank ABANDA Nordrhein-Westfalen. http://www.nrw-luawebapps.de/abanda/script/luadb_portal.php?application=abanda&runmode=aida&initform=MK_Auswertemenue
- Lapa, N.; Barbosa, R.; Morais, J.; Mendes, B.; Méhu, J.; Santos Oliveria, J.F. (2002): Ecotoxicological assessment of leachates from MSWI bottom ashes. *Waste Management* 22: 583-593.

- Latif, M.; Zach, A. (2000): Toxicity studies of treated residual wastes in Austria using different types of conventional assays and cost-effective microbiotests. In: *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Persoone, G. et al. (eds.). Kulwer Academic/Plenum Publishers, New York: 367-382.
- Lors, Chr.; Ponge, J.-F.; Aldaya, M.M; Damidot, D. (2010): Comparison of solid-phase bioassays and ecoscores to evaluate the toxicity of contaminated soils. *Environmental Pollution* 158: 2640-2647.
- Mala, J., Marsalkova, E.; Rovnanikova, P. (2000): Toxicity testing of solidified waste leachates with microbiotests. In: *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Persoone, G. et al. (eds.). Kulwer Academic/Plenum Publishers, New York: 385-390.
- Martin, J.; Gohlke, O.; Tabaries, F.; Praud, A., Yanagisawa, Y.; Takuma, M. (2005): Defining 'inert' - A technological solution to minimize ecotoxicity. *Waste Management World* 9-10/05: 70-73.
- Martínez Aldaya, M., Lors, C., Salmon, S., Ponge, J.P. (2006): Avoidance bio-assays may help to test the ecological significance of soil pollution. *Environmental Pollution* 140: 173-180.
- Michniewicz, M.; Nalecz-Jawecki, G.; Stufka-Olczyk, J. (2000): Comparison of chemical composition and toxicity of wastewaters from pulp industry. In: *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Persoone, G. et al. (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 401-411.
- Moser, H.; Römbke, J.; Donnevert, G.; Becker, R. (2008): Ecotoxicological characterization of waste: Results and experiences from a European ring test. In: *Proceedings of the 1st International Conference on Hazardous Waste Management*. Gidarakos, E., Cossu, R. & Stegmann, R. (eds.) Technical University, Chania, Crete. Pp. 389-390 (CD: Chapter P08, p 1-8).
- Moser, H., Römbke, J. (2009): Ecotoxicological characterisation of waste - Results and experiences of an European ring test. Springer Ltd., New York. 308 pp.
- OEKOPOL (2008): Review of The European List of Waste, Final Report, 532 pp., available from <http://ec.europa.eu/environment/waste/framework/list.htm>.
- Ortiz, M.I.; Ibanez, R.; Andrés, A.; Irabien, A. (1995): Ecotoxicological characterisation of metal finishing wastes. *Fresenius Envir Bull* 4: 189-194.
- Pablos, M.V.; Fernández, C.; del Mar Babín, M.; Navas, J.M.; Carbonell, G.; Martini, F.; García-Hortigüela, P.; Tarazona, J.V. (2009): Use of a novel battery of bioassays for the biological characterisation of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1594-1600.
- Pandard; Jam Deviller, J.; Charissou, A.-M.; Poulsen, V.; Jourdain, M.-J.; Férard, J.-F.; Grand C.; Bispo, A. (2006): Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of the Total Environment* 363: 114-125.
- Pandard, P., Römbke, J. (2013): Proposal for a "Harmonized" Strategy for the Assessment of the HP 14 Property. *Integ. Envir. Assess. Manag. (IEAM)*. In press.
- Radetski, C.M.; Ferrari, B.; Cotellet, S.; Masfaraud, J.-F.; Ferard, J.F. (2004): Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Science of the Total Environment* 333: 209-216.
- Rasmussen, K., Pettau, D. Vollmer, G., Davis J.B. (1999): Compilation of EINECS: Descriptions and definitions used for UVCB substances. *Tox. Env. Chem.* 69: 403-416.

- Römbke, J., Moser, H. (2007): Ökotoxikologische Charakterisierung von Aschen aus Müllverbrennungsanlagen. VGB PowerTech 12/2007: 62-68.
- Römbke, J., Moser, Th., Neumann-Hensel, H., Ketelhut, R. (2010): Identifikation umweltgefährlicher Abfälle in Spiegeleinträgen der AVV. Bericht für das Umweltbundesamt, FKZ 3708 31 300, 124 p.
- Schrader, G. (1998): Erprobung mikrobiologischer und zoologischer (Öko-) Toxizitätstests für UTD-relevante Abfalleluate. Dissertation, TU Braunschweig. 1-150.
- Schultz, E.; Vaajasaari, K.; Joutti, A.; Ahtiainen, J. (2002): Toxicity of industrial wastes and waste leaching test eluates containing organic compounds. *Ecotoxicology Environmental Safety* 52: 248-255.
- Seco, J.I.; Fernández-Pereira, C.; Vale, J. (2003): A study of the leachate toxicity of metal-containing solid wastes using *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 339-350.
- Stiernström, S.; Hemström, K.; Wik, O.; Carlsson, G.; Bengtsson, B.-E.; Breitholtz, M. (2010): An ecotoxicological approach for hazard identification of energy ash. *Waste Management* 31: 342-352.
- Triffault-Bouchet, G.; Clément, B.; Blake, G. (2003): Ecotoxicological assessment of pollutant flux released from MSWI bottom ashes reused in road construction - An approach based on single-species tests and a 2-L microcosm assay. In *Aquatic Ecosystem + Management society: Scaling from local to global perspectives*. 1-21.
- Vaajasaari, K.; Ahtiainen, J.; Nakari, T.; Dahlbo, H. (2000): Hazard assessment of industrial waste leachability: chemical characterization and biotesting by routine effluent tests. In: *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring*. Persoone, G. et al. (eds.). Kulwer Academic/Plenum Publishers, New York: 413-423.
- Weiß (2000): Vergleichende Gegenüberstellung der Elutionsbefunde mit den toxikologischen Daten von fünf Steinkohleflugaschen VGB e.V. (Hygiene-Institut des Ruhrgebiets, Gelsenkirchen). 11 p.
- Wilke, B.-M.; Riepert, F.; Koch, C., Kühne, T. (2007): Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 283-293.
- Wundram, M; Bahadir, M. (1999): Ecotoxicological test systems for prediction of environmental behaviour of toxic compounds in underground disposals. *Fresenius Envir. Bull.* 8: 280-287.

Appendix 5: Statistische Auswertung der ökotoxikologischen Tests nach HP14

Stoffstromdesign, Ralf Ketelhut

Sortierkontor

Haart 224

24539 Neumünster

26. Februar 2013

Table of Contents

1	<i>Zusammenfassung</i>	131
2	<i>Einleitung, Hintergrund und Vorgehensweise</i>	135
2.1	Untersuchte Tests und Herkunft der ausgewerteten Daten.....	136
2.2	Probenahme und Probenvorbehandlung	136
2.3	Abbildung von Messwerten	137
2.4	Bedeutung der Probenaufbereitung.....	138
2.5	Aussagesichere Messung.....	139
3	<i>Daphnientest</i>	144
3.1	Ergebnisse	144
3.2	Beurteilung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung.....	145
3.3	Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen.....	147
4	<i>Algentest</i>	149
4.1	Ergebnisse	149
4.2	Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung.....	151
4.3	Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen.....	152
5	<i>Bakterienkontakttest</i>	153
5.1	Ergebnisse	153
5.2	Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung.....	155
5.3	Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen.....	157
6	<i>Pflanzenwachstumstest</i>	158
6.1	Ergebnisse	158
6.2	Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung.....	160
6.3	Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen.....	161
7	<i>Regenwurmfluchttest</i>	163
7.1	Ergebnisse	163
7.2	Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung.....	163
7.3	Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen.....	164
8	<i>Schlussfolgerungen und Empfehlungen</i>	166
9	<i>Literatur</i>	167

1 Zusammenfassung

Im Rahmen der Weiterentwicklung der UBA-Handlungsempfehlung zur ökotoxikologischen Charakterisierung von Abfällen sind Primärdaten ökotoxikologischen Untersuchungen von Abfallgemischen aus dem Zeitraum 2008 bis 2011 einer vergleichenden Evaluation unterzogen worden. Im Einzelnen sind folgende **Untersuchungen** betrachtet worden:

Tabelle 1: Im Rahmen der Untersuchung überprüfte Testsysteme und Untersuchungen

Test	Zahl der untersuchten Abfallproben	Zahl der vorliegenden Einzeltests
Daphnientest ISO 6341 (1996)	113	433
Algentest ISO 8692 (2004a)	92	264
Bakterien-Kontakttest ISO/CD 10871 (2008)	55	1.196
Pflanzenwachstumtest ISO 11269-2 (2004)	57	1.920
Regenwurmfluchttest ISO 17512-1 (2007)	44	431

Die Untersuchung beinhaltete die statistische Evaluation sämtlicher verfügbarer Primärdaten der durchgeführten Kontrollanalysen wie auch der Messproben, wie auch die vergleichende Prüfung und Auswertung der in den Testsystemen angewandten Verfahren zur Messung und Ergebnisdarstellung ökotoxikologischer Untersuchungen.

Auch für Abfallproben zur ökotoxikologischen Untersuchung gilt, dass die Qualität und Aussagekraft des Messergebnisses maßgeblich von der Repräsentativität der Probe auf dem Weg von der Grundgesamtheit zur Analysenprobe abhängt. Um Beurteilungen von Abfällen gegenüber einem Grenzwert vorzunehmen, kann der Vertrauensbereich eines Messwertes zuweilen von höherer Bedeutung sein als der Messwert selbst, denn die Varianz des Messwertes bestimmt seine Aussagesicherheit. Messwerte werden idealer Weise in Form von Verteilungen für Wahrscheinlichkeitsdichte und Summenhäufigkeit dargestellt. Beide visualisieren den Vertrauensbereich und damit nicht nur die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Wert zu messen (Dichte) sondern auch die Aussagesicherheit gegenüber einem beliebigen Wert auf der x-Achse.

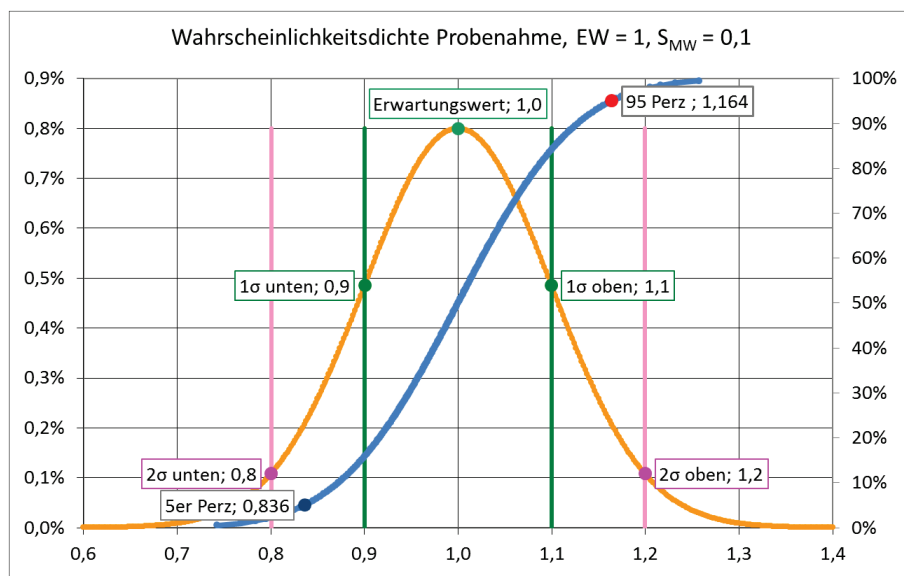


Abbildung 3: Abbildung eines normalverteilten Messwertes als Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung (gelb) und Summenhäufigkeitsverteilung (blau)

Das wesentliche Ziel ökotoxikologischer Untersuchungen ist es, aufzuzeigen, dass mit Prüfmedien versetzte Proben ein gegenüber Kontrollproben signifikant abweichendes Wirkungsspektrum aufweisen. Daher werden Wirkschwellen definiert, bei deren Überschreitung die eingesetzte Prüfkonzentration als wirksam bezeichnet wird. Leider wird dabei bis dato in der Regel mit Mittelwerten gearbeitet, ohne deren Vertrauensbereiche anzugeben. Eine Beurteilung gegenüber Grenzwerten unter Angabe der Aussagesicherheit ist damit nicht möglich. Dabei bietet die Ökotoxikologie mit ihren routinemäßig durchgeführten Mehrfachuntersuchungen ideale Voraussetzungen für eine statistische Absicherung und damit einen methodischen Vorteil gegenüber chemisch-analytischen Untersuchungen, bei denen im Normalfall nicht mehrfach analysiert wird.

Ziel des Vorhabens war es daher, die Aussagesicherheit ökologischer Untersuchungen zu definieren und die Primärdaten sämtlicher verfügbaren Untersuchungen nochmals ex post zu evaluieren. Unabhängig von der Art der Test und den normativen Vorgaben zu Wirkschwellen und Auswertungsprozedur wurde dabei der Bezug zu einer einheitlichen Definition von signifikanter Wirkung hergestellt, die auf zwei Basisanforderungen zurückgeht:

Die Wirkschwelle (WS) definiert sich aus den Werten der im Originalversuch eingesetzten Kontrollproben. Diese ist definiert als Mittelwert der Kontrollen minus drei Standardabweichungen des Mittelwertes

$$WS = K - 3 \cdot \sigma_K$$

Eine Prüfprobe wird dann als signifikant (einseitig 95%) wirksam betrachtet, wenn der mittlere Messwert (MWM) die Wirkschwelle um 2 Standardabweichungen des Messprobenmittelwertes überschreitet.

$$M - 2 \cdot \sigma_M > K - 3 \cdot \sigma_K$$

Mit Punkt 1 wird sichergestellt, dass 99,8% aller Mittelwerte aus Kontrolluntersuchungen oberhalb der Wirkschwelle liegen. Punkt 2 sorgt dafür, dass die Aussagesicherheit für die Überschreitung der Wirkschwelle bei > 95% liegt.

Im Rahmen der Qualitätssicherung ist ergänzend sicherzustellen, dass die Kontrollproben den Validierungskriterien genügen und $\sigma_M < 1$ ist um die Repräsentativität der Probe zu verifizieren.

Für einzelne Tests ergeben sich auf der Basis der auf die Varianzanalyse gestützten Auswertung Abweichungen von der normgerechten Auswertung, da diese die Varianzen der Messwerte unberücksichtigt lässt. Beispielhaft werden hier zwei Fälle vorgestellt.

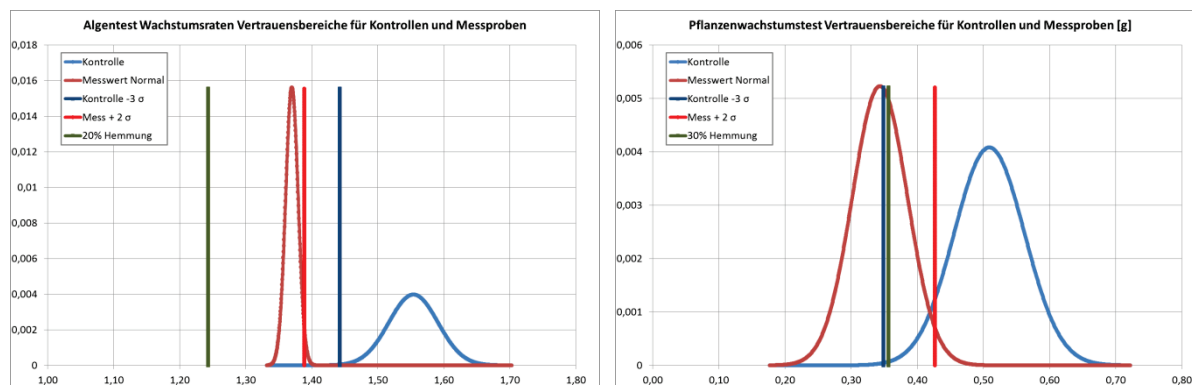


Abbildung 4: Veränderte Beurteilungen im Algentest sowie im Pflanzenwachstumstest, beispielhaft

Im Algentest zeigen die Kontrolluntersuchungen im Mittel eine Wachstumsrate von 1,55. Der Variationskoeffizient (CV) liegt bei 0,04, so dass die Wirkschwelle als dreifache Standardabweichung der Kontrollproben nach unten bei einem Wert von 1,44 liegt. Die gesetzte Wirkschwelle von 20% Hemmung gegenüber dem Mittelwert liegt mit etwa 1,24 deutlich niedriger. Sämtliche Messwerte liegen gut reproduzierbar im Bereich zwischen 1,33 und 1,40 und damit zwar deutlich oberhalb der gesetzten Wirkschwelle, aber dennoch aussagesicher außerhalb des Bereiches der Kontrollproben. Hier liegt eine statistische signifikante Wirkung vor, obwohl die Wirkschwelle von 20% vom Mittelwert nicht überschritten wird.

Im Pflanzenwachstumstest handelt es sich um einen Versuch mit nur vier Replikaten. Das Pflanzengewicht der Kontrolluntersuchungen ist mit 0,51 g relativ gering, der CV des Mittelwertes liegt bei 0,1. Die aus der Varianzanalyse ermittelte Wirkschwelle fällt nahezu mit der auf 30% festgesetzten Wirkschwelle zusammen. Der Mittelwert der Messreihe liegt mit 0,34 g zwar unterhalb beider Wirkschwellen, aber der Variationskoeffizient der Messreihe ist mit 0,12 zu groß, um eine Aussagesicherheit von 95% für die Wirkung zu gewährleisten.

Die statistischen Auswertungen haben gezeigt, dass die bislang definierten Wirkschwellen der biologischen Testverfahren angepasst werden müssen, um vor dem Hintergrund der Varianzen von Kontroll- und Messprobenuntersuchungen aussagesichere Befunde in Bezug auf Über- bzw. Unterschreitung von Wirkschwellen zu erhalten.

Nachfolgende Übersicht stellt testbezogen die Rahmendaten der Evaluation zusammen. Da die Probenahme aus heterogenen Abfallgemischen stets mit Unsicherheiten hinsichtlich einer repräsentativen Abbildung der Grundgesamtheit durch die Untersuchungsprobe verbunden ist, wurde als additives Kriterium für alle Tests die Dosis-Wirkungs-Beziehung in den Verdünnungsreihen als Indikator für die Repräsentativität der Analysenproben evaluiert. Auf die Darstellung nicht auswertbarer Befunde wie zum Beispiel 100% Wirkung in jeder Verdünnung wurde dabei verzichtet.

Tabelle 2: Übersicht über veränderte Beurteilungen bei statistisch abgesicherter Evaluation und Nachweis von Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Verdünnungsreihen

Test	Zahl der untersuchten Abfallproben	Zahl der vorliegenden Einzeltests	Anteil veränderter Beurteilungen	Dosis-Wirkungs-Beziehung positiv	Dosis-Wirkungs-Beziehung negativ
Daphnie	113	433	32,7%	39%	9%
Algen	92	264	22,8%	62%	13%
Bakterien	55	1.196	50,9%	67%	15%
Pflanzen	57	1.920	12,3%	75%	9%
Regenwurm	44	431	47,7%	77%	20%

Basierend auf der statistischen Evaluation der ökotoxikologischen Untersuchungen wird empfohlen, die Untersuchungen auf die Ermittlung einer nachweislich mit 95% Aussagesicherheit wirksamen, effektiven Konzentration (ECx) umzustellen.

2 Einleitung, Hintergrund und Vorgehensweise

Die Qualität und Aussagekraft von Abfalluntersuchungsergebnissen hängt auf dem Weg vom Feld- bis hin zum Prüfprobenmaterial maßgeblich vom Erhalt der Merkmals-Zusammensetzung der Fest-stoffe im Hinblick auf die zu untersuchenden Parameter ab. Die zu untersuchenden Merkmale müssen in ihrer qualitativen und quantitativen Zusammensetzung über alle erforderlichen Bearbeitungsschritte von der Feldprobe über die Laborprobe bis hin zum Analysenmaterial (DIN 2009) möglichst gut, sprich repräsentativ, abgebildet werden können. Systematische wie auch unvermeidbare zufällige Fehler bei der Probenahme sowie auf dem Weg der Probe bis hin zur Analyse führen zu Informationsdiskriminierungen und damit möglicherweise zu „falschen“ Analyseergebnissen mit erheblichen Konsequenzen für die Stoffbeurteilung, da sowohl falsch zu niedrig als auch falsch zu hoch gemessen werden kann. Dies ist dann besonders relevant, wenn im Rahmen einer Beurteilung eine Beurteilung der ermittelten Analysenwerte gegenüber einem vorgegebenen „Grenzwert“ erfolgen soll.

Trotz erheblicher Fortschritte beim Verständnis der theoretischen Hintergründe bei der Probenahme und Probenaufbereitung heterogener Stoffsysteme (vgl. z.B. LAGA 2004, DIN 2009, Brands 1983, Büll 2006, DIN EN 2011, EPA 2003, European Commission 2004, Flamme 2009, Furtmann 2003; Gy 2004, LfUG 1998, Rasemann 2005, Rotter 2003, Skutan 2009, TAUW 2005) liegt bis dato noch kein verallgemeinerndes Modell vor, das es ermöglicht, belastbare Vorhersagen über die Aussagesicherheit von Abfalluntersuchungen zu treffen. In der Regel kann die Aussagesicherheit von Einzeluntersuchungen nur ex post zum Beispiel durch eine Mehrfachprobenahme und parallele Untersuchung in Testreihen zur Reproduzierbarkeit von Analysen ermittelt werden. Dies gilt sowohl für physikalisch-chemische als auch für biologische Untersuchungsmethoden.

Ökotoxikologische Untersuchungen werden stets als Mehrfachuntersuchungen durchgeführt. Sie sind ebenfalls auf eine repräsentative Laborprobe angewiesen. Dennoch scheinen aus den Mehrfachuntersuchungen ökotoxikologischer Untersuchungen „Matrizeffekte“ ablesbar zu sein, die wertvolle Informationen über die Abfallqualität liefern können.

Ziel des Vorhabens ist es, die Aussagesicherheit ökotoxikologischer Untersuchungen zu definieren und zu ermitteln, ob die Reproduzierbarkeit ökotoxikologischer Untersuchungen einen methodischen Vorteil im Vergleich zu physikalisch-chemischen Analysen bietet, z.B. bei der Charakterisierung von Schwermetallgehalten in heterogenen Abfallgemischen.

Es erscheint daher sinnvoll, die vorliegenden Untersuchungen zur ökotoxikologischen Untersuchung von Abfällen einer vergleichenden Querevaluation zu unterziehen, um aus dem Vergleich Erkenntnisse über die Validität, aber auch Schwachstellen des Untersuchungsdesigns oder auch der Evaluationsmethoden zu erkennen. Die Evaluation soll dabei auf der Basis statistischer Anforderungen erfolgen.

2.1 Untersuchte Tests und Herkunft der ausgewerteten Daten

Im Einzelnen sind Untersuchungen folgender Testsysteme evaluiert worden:

Tabelle 2: Im Rahmen der Untersuchung überprüfte Testsysteme und Untersuchungen

Test	Zahl der unter suchten Abfallproben	Zahl der vorliegenden Einzeltests
Daphnientest ISO 6341 (1996)	113	433
Algentest ISO 8692 (2004a)	92	264
Bakterien-Kontakttest ISO/CD 10871 (2008)	55	1.196
Pflanzenwachstumstest ISO 11269-2 (2004)	57	1.920
Regenwurmfluchttest ISO 17512-1 (2007)	44	431

Die für die statistische Auswertung geeigneten Messdaten sind folgende Untersuchungen herangezogen worden:

- die Ergebnisse des vom UBA organisierten EU-Ringversuchs. Dabei wurden drei Abfallproben in 149 Daphnientests, 106 Algentests, 25 Bakterienkontakttests, 107 Pflanzentests (2 Arten) und 12 Regenwurmfluchttests untersucht.
- des abgeschlossenen Testprogramms „UBA 25“. In diesem Vorhaben wurden 24 verschiedene Abfälle jeweils einmal im Daphnien-, Algen-, Bakterienkontakt-, Pflanzenwachstums- und Regenwurmfluchttest eingesetzt.
- weitgehend anonymisierte Daten aus Industrievorhaben der letzten zwei Jahre (durchgeführt von den Auftragnehmern). Die Differenz zwischen der Zahl der bisher aufgeführten Tests und den aktuell ausgewerteten Studien stammt aus einer Vielzahl von Auftragsstudien, wobei pro Projekt zwischen einem und ca. 30 Abfällen untersucht wurden. Diese Daten liegen den Auftragnehmern nur in kodierter Form vor. Publiziert davon wurde nur eine Studie mit 12 Hausmüllverbrennungsrückständen (Römbke et al. 2009). Getestet wurde dabei mit einer Batterie bestehend aus dem Daphnien-, Algen-, Pflanzenwachstums- (2 Arten) und dem Regenwurmfluchttest.

Bei der ökotoxikologischen Untersuchung werden verschiedene Verdünnungsstufen durchgetestet, um die Ökotoxizität eines Testmediums im Vergleich zu anderen einordnen zu können. Für die statistische Validierung der Prüfsysteme ist das Testmedium selbst wie auch die Verdünnungsstufe nicht relevant. Von Bedeutung ist lediglich die Reaktion des Testsystems.

2.2 Probenahme und Probenvorbehandlung

Die DIN EN 14735 Charakterisierung von Abfällen – Herstellung von Abfallproben für die ökotoxikologische Untersuchung beschränkt sich in Bezug auf die Probenvorbehandlung sowie die Probenvorbereitung auf die Aussage, dass das Probenmaterial sowohl für die Elution als auch für die terrestrischen Tests eine Körnung von $d_{95} < 4 \text{ mm}$ aufweisen soll¹. Sofern Material $> 4 \text{ mm}$ im Umfang von mehr als 5 Gew% anfällt, soll dieses mit

¹ vgl. DIN EN 2005, Seite 9, vgl. auch Moser 2008 Seite 9

geeigneten Gerätschaften zerkleinert werden. Eine Feinvermahlung soll in jedem Fall vermieden werden. Nicht zerkleinerbare Materialien wie zum Beispiel metallische Teile sollen separiert, verwogen und protokolliert werden. Sofern eine Trocknung des Materials notwendig wird, soll die Temperatur 40°C nicht überschreiten.

Eine weitergehende Beschreibung, in welcher Art aus dem Laborprobenmaterial eine Analysenprobe gewonnen werden soll, liegt in der Regel nicht vor. Es ist daher davon auszugehen, dass die für die jeweilige ökotoxikologische Untersuchung erforderliche Analysenprobenmasse ohne weitergehende Vorbehandlung direkt aus dem Laborprobenmaterial gewonnen wird.

Eine vollständige Probenaufbereitung mit sorgfältig abgestimmtem Vorgehen aus Zerkleinerung und Probenverjüngung zur Erzeugung repräsentativer Analysenproben wird weder im Rahmen der EN 14735 noch im Rahmen der DIN 19747 gefordert und findet daher in der Regel nicht statt.

2.3 Abbildung von Messwerten

Für die Abbildung von Messwerten inklusive ihrer Aussagesicherheit wird auf die Darstellung im Rahmen von Wahrscheinlichkeitsverteilungen zurückgegriffen. Werteverteilungen können als Wahrscheinlichkeitsdichten oder als Summenhäufigkeitsverteilungen dargestellt werden. Eine Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung liefert entsprechend der Auflösung des eingesetzten Messverfahrens die Wahrscheinlichkeit, den auf der x-Achse angegebenen Wert zu messen. Die korrespondierende Summenhäufigkeitsverteilung ist das Integral der Wahrscheinlichkeitsdichte. Während aus der Dichteverteilung die Wahrscheinlichkeit für das Unter- bzw. Überschreiten eines x-Wertes nur aus dem Flächenvergleich abgeleitet werden kann, ist aus Summenhäufigkeitsverteilung direkt ablesbar, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein x-Wert über- oder aber unterschritten wird. Die nachfolgende Abbildung liefert ein Beispiel für einen normalverteilten Messwert von 1 und bei einem Variationskoeffizienten von 0,1.

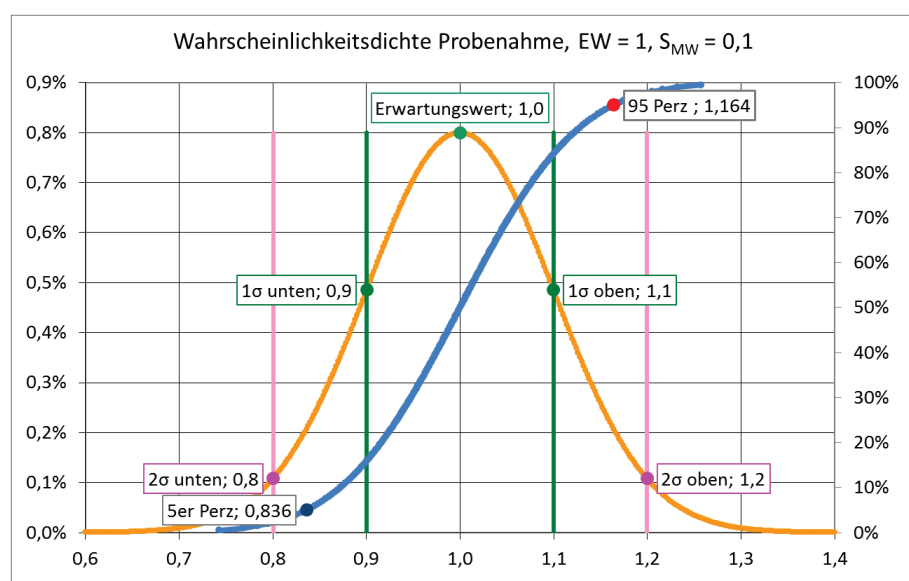


Abbildung 3: Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung (gelb) und Summenhäufigkeitsverteilung (blau) für einen normalverteilten Messwert von 1 bei einem CV von 0,1. Werte für die y-Achse der Summenhäufigkeitsverteilung auf der rechten Seite

Für einen normalverteilten Messwert ergibt sich der Vertrauensbereich symmetrisch um den Erwartungswert. Im Rahmen der einfachen Standardabweichung (1σ) um den Erwartungswert liegen 68,3% aller möglichen Werte. Die zweifache Standardabweichung (2σ) umfasst 95,4% aller möglichen Werte bzw. 95,4% der Fläche unter der orangenen Kurve. Auf der Summenhäufigkeitskurve sind das 5er-Perzentil sowie das 95er-Perzentil hervorgehoben. Sie markieren einseitige Vertrauensbereiche. Das heißt, dass in obiger Verteilung 5% aller Werte kleiner sind als 0,836. Im Umkehrschluss heißt dies, dass 95% aller Werte größer sind als 0,836. Für das 95er-Perzentil gilt entsprechend, dass 95% aller Werte kleiner sind als 1,164 bzw. 5% aller Werte größer als 1,164.

Liegen für gesuchte Parameter mehrere Messwerte vor, so können aus den Daten Näherungsverteilungen gewonnen werden, die Angaben zur Aussagesicherheit ermöglichen.

2.4 Bedeutung der Probenaufbereitung

Die nachfolgend dargestellten Zusammenhänge beziehen sich auf Merkmale, die sich auf einen Massenanteil in der Probe beziehen. Es ist nicht bekannt, ob die Zusammenhänge auch für ökotoxikologische Wirksamkeiten Gültigkeit besitzen.

Die bislang eingeführten Probenahmerichtlinien² haben zum Ziel, die zu charakterisierende Grundgesamtheit möglichst gut in die Laborprobe abzubilden. In der Laborprobe mit ihrer definierten Masse und ihrer definierten Zusammensetzung liegen sämtliche zu definierende Parameter eindeutig fest, die entsprechenden Merkmalsgehalte stellen Schätzwerte für die Gehalte in der Grundgesamtheit dar. Die nachfolgende Abbildung soll veranschaulichen, was das im Einzelnen bedeutet:

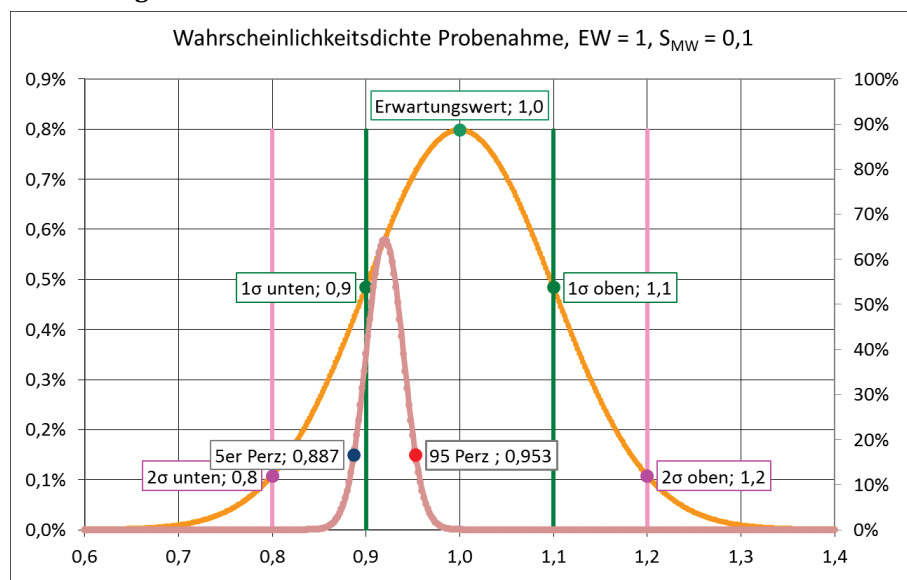


Abbildung 4: Merkmalsverteilungen in Grundgesamtheit und Laborprobe

Ein Merkmal habe in einer Grundgesamtheit den „wahren Wert“ 1. Die durch die Mengenreduktion von der Grundgesamtheit auf die Laborprobe bedingte Unsicherheit habe einen $CV = 0,1$. Der Merkmalsgehalt der Laborprobe liegt dann zufällig auf irgendeinem Punkt der Wahrscheinlichkeitsdichte. In der Abbildung haben wir den Wert

² Z.B. die PN 98 DIN 2004 oder auch die DIN EN 15442 DIN EN 2001

0,92 angenommen. Dies sei der wahre Wert der Laborprobe für das Merkmal. Jede noch so sorgfältige Analyse kann in der Laborprobe nur den Wert von 0,92 messen. In der Regel wird der Analysenwert in einem gewissen Bereich um den wahren Wert herum liegen. Für die Abbildung ist ein CV von 0,02 angenommen worden.

Die Entnahme einer Teilprobe aus der Laborprobe ohne vorherige Zerkleinerung stellt eine erneute Probenahme dar, die wiederum eine Aussageunsicherheit gegenüber dem „wahren Merkmalsgehalt“ der Laborprobe erzeugt. Wenn die Laborprobe ohne vorherige Zerkleinerung auf ein Viertel der Ursprungsmenge eingeengt wird, dann ist davon auszugehen, dass sich der Variationskoeffizient in der eingeengten Probe gegenüber dem CV der Laborprobe verdoppelt. Die Auswirkungen des Vorgehens zeigt Abbildung 5.

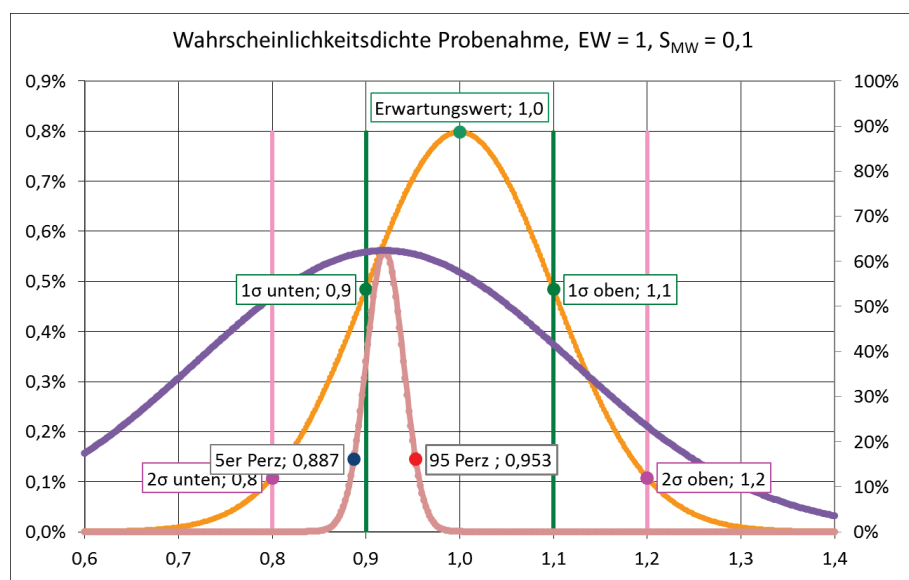


Abbildung 5: Wahrscheinlichkeitsdichte eines Merkmals in einer auf ein Viertel der Ursprungsmenge heruntergeteilten Laborprobe

Wird die Laborprobe ohne Zerkleinerung der enthaltenen Partikel eingeengt, erhöht sich die Streuung gegenüber der Laborprobe. Die zufällige Lage des Wertes der Laborprobe (hier 0,92) gegenüber dem wahren Wert der Grundgesamtheit (hier 1) bestimmt, ob der wahre Wert der Grundgesamtheit eher überschätzt oder aber wie hier unterschätzt wird.

Die in der eingeengten Laborprobe gemessenen Merkmalsgehalte entsprechen dann unter Umständen nicht mehr dem Merkmalsgehalt in der Grundgesamtheit. Die einzige Möglichkeit, den durch die erneute Teilung erzeugten zufälligen Fehler zu kontrollieren und damit einem möglichen Messfehler entgegenzuwirken, ist, die Werte von mehreren Teilproben zu ermitteln, um so auf den Merkmalsgehalt in der Laborprobe zurückschließen zu können. Wie der Merkmalsgehalt der Laborprobe in Relation zum wahren Wert des Merkmalsgehaltes in der Grundgesamtheit gelegen hat, bleibt allerdings stets unbekannt. Dies kann nur durch eine Werteverteilung aus parallel untersuchten, äquivalenten Laborproben aufgeklärt werden.

2.5 Aussagesichere Messung

Ein wesentlicher Aspekt ökotoxikologischer Untersuchungen ist es, zu untersuchen, ob Abfallproben in Verdünnungsreihen ein gegenüber Kontrollproben signifikant abweichende biologische Wirksamkeit aufweisen. Daher werden Wirkschwellen definiert, bei deren Überschreitung angenommen wird, dass die eingesetzte Prüfkonzentration eine

eindeutige und von der biologischen Schwankung der Testorganismen in den Kontrollansätzen abgrenzbare Wirkung vorliegt.

Die im Rahmen der Etablierung von Biotests für die ökologische Charakterisierung von Abfällen definierten Wirkschwellen liegen bei 10% (Daphnientest), 20% (Algentest), 30% (Pflanzenwachstumstest und Bakterienkontakttest) oder auch 40% (Regenwurmfluchttest).

Vor dem Hintergrund der Aussagesicherheit von ökotoxikologischen Untersuchungen stellt sich die Frage, wie die Varianz von Messwerten bzw. ein Vertrauensbereich für die Messergebnisse in die Betrachtungen integriert werden kann.

Die Integration ist dann einfach, wenn die gefunden Messwerte sich in Bezug auf den Erwartungswert deutlich unterscheiden und zudem in Messreihen reproduzierbar bestätigt werden. Die folgende Abbildung zeigt die Wahrscheinlichkeitsdichteverteilungen von Kontrolle (EW = 1, CVMW = 0,05) und Messwert (EW = 0,3, CVMW = 0,05).

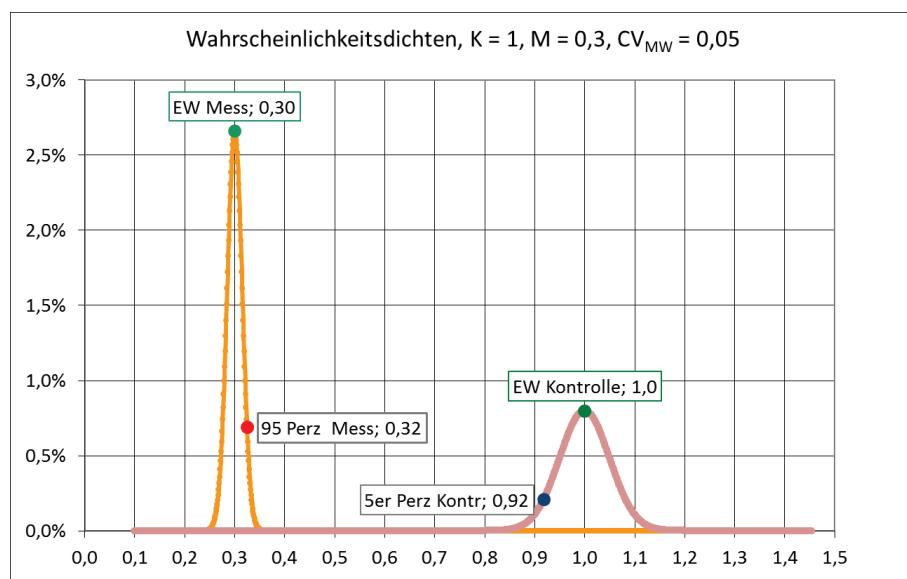


Abbildung 6: Wahrscheinlichkeitsdichten von Kontrolle (EW = 1) und Messreihe (EW = 0,3) für $CV = 0,05$

Auch unter Berücksichtigung der Vertrauensbereiche sind die Bereiche von Messwert und Kontrolluntersuchung klar getrennt. 95% aller Messwerte sind $< 0,32$, während 95% aller Kontrolluntersuchungen $> 0,92$ sind. Weniger eindeutig ist es, wenn die Bereiche von Messwerten und Kontrolluntersuchungen eine gewisse Überlappung zeigen. Für einen Messwert von 0,7 gegenüber einer Kontrolle von EW = 1 zeigt sich die Situation für den Nachweis einer 20%igen Hemmung wie folgt:

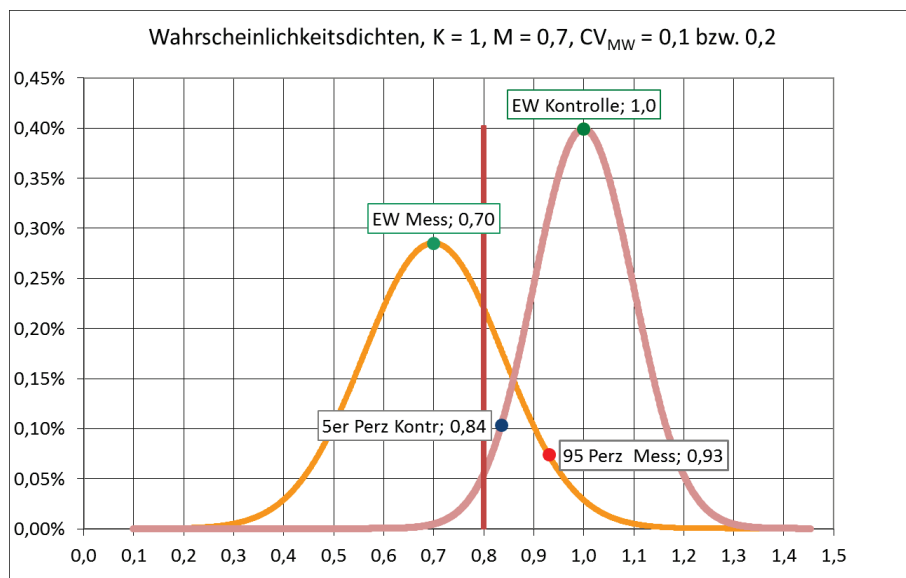


Abbildung 7: Wahrscheinlichkeitsdichten von Kontrolle (EW = 1, CV = 0,1) und Messreihe (EW = 0,7, CV = 0,2)

Hier zeigt sich eine deutliche Überlappung der Wahrscheinlichkeitsdichten. Obwohl der Mittelwert der Messreihe nur 70% des Mittelwertes der Kontrolluntersuchungen ausmacht, können einzelne Messwerte offensichtlich höher liegen als einzelne Kontrollwerte.

Die Evaluation der Aussagesicherheit zeigt Folgendes:

Die angenommene Wirkschwelle von 20% führt auf einen Grenzwert von 0,8. Da die Kontrolluntersuchungen selbst einen CV von 0,1 aufweisen, liegt der Grenzwert exakt auf dem Wert der zweifachen Standardabweichung nach unten. Das heißt, dass 2,3% aller Kontrollmessungen geringere Werte zeigen werden als 0,8.

Für den Messwert ergibt sich, dass trotz des Mittelwertes von 0,7 aufgrund des CV von 0,14 insgesamt 23,8% aller Werte größer sind als 0,8. Mithin beträgt die Aussagesicherheit für die Unterschreitung des Grenzwertes von 0,8 lediglich 76,2%.

Betrachtet man die Messungen für Kontrollen und Messwerte als zwei unabhängige Zufallseignisse mit den durch die Wahrscheinlichkeitsverteilungen vorgegebenen Ereignishorizonten, dann lässt sich eine Ergebnisverteilung für den Quotienten Messwert/Kontrollwert mit einem Zufallszahllexperiment aus zwei Mal 10.000 Zufallszahlen ermitteln. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt:

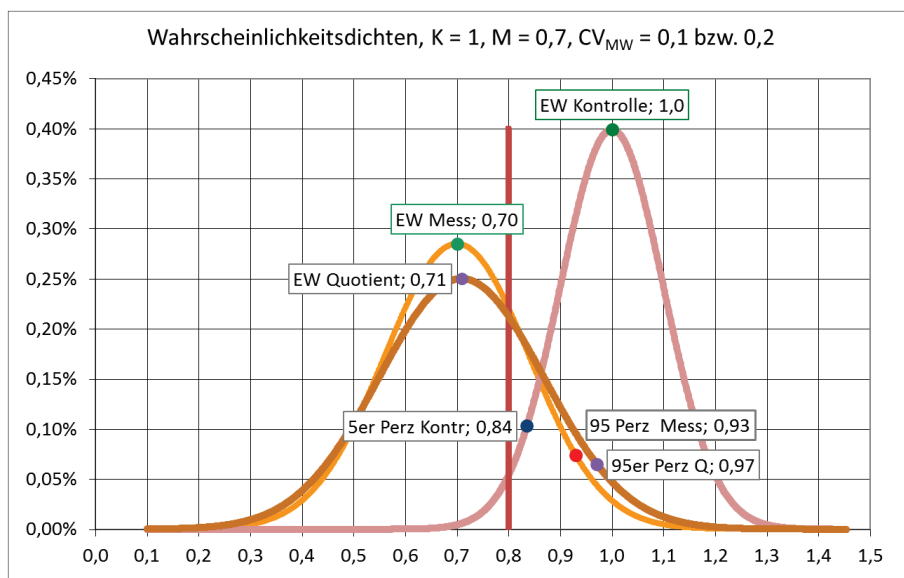


Abbildung 8: Wahrscheinlichkeitsdichten von Kontrolle (EW = 1, CV = 0,1) und Messreihe (EW = 0,7, CV = 0,2) und Zufallszahlenexperiment für den Quotienten Messwert/Kontrolle

Im Ergebnis zeigt sich der Erwartungswert gegenüber der Messverteilung leicht erhöht und auch das einseitige 95er-Perzentil liegt ein wenig weiter rechts. Die Aussagesicherheit gegenüber der 80%-Marke sinkt auf 71,6%. Das wird erklärbar, wenn man sich das Zufallszahlenexperiment als Abbild der realen Verhältnisse gedanklich veranschaulicht:

- Eine Zufallszahl aus dem Intervall $[0 \dots 1]$ ist mit einer Wahrscheinlichkeit von je 50% entweder kleiner oder aber größer als 0,5
- Für die Kette von zwei Zufallszahlen für Messwert M und Kontrollwert K ergeben sich damit 4 mögliche Ausgänge pro Experiment:
 - a) $M < 0,5; K < 0,5:$ $p = 25\%$; Erwartungswert für den Quotienten: 0,64
 - b) $M > 0,5; K < 0,5:$ $p = 25\%$; Erwartungswert für den Quotienten: 0,89
 - c) $M < 0,5; K > 0,5:$ $p = 25\%$; Erwartungswert für den Quotienten: 0,55
 - d) $M > 0,5; K > 0,5:$ $p = 25\%$; Erwartungswert für den Quotienten: 0,75

Während sich die Ergebnisse für a und d quasi aufheben (Summe der EW = 1,39), kann Ausgang c den Ausgang d nicht kompensieren (Summe der EW = 1,44), so dass der Gesamtwert sich erhöht. Die Veränderungen beim Variationskoeffizienten genügen einer quadratischen Additionsregel.

Um der Anforderung einer 95% aussagesicheren Messung zu genügen, schlagen wir folgende Maßnahmen für die Messwertbeurteilung vor:

1. Die Wirkschwelle (WS) sollte grundsätzlich $3 \sigma_K$ niedriger liegen als der Erwartungswert der Kontrolluntersuchungen.
2. Der wirksame Messwert (MW) sollte die Wirkschwelle um $2 \sigma_M$ überschritten haben

Bei den Standardabweichungen handelt es sich um die Standardabweichungen der Mittelwerte. Mit der Maßnahme 1 wird sichergestellt, dass 99,8% aller Mittelwerte aus Kontrolluntersuchungen oberhalb der Wirkschwelle liegen. Mittelwerte aus

Kontrolluntersuchungen unterhalb der Wirkschwelle sind damit ausgesprochen selten. Maßnahme 2 sorgt dafür, dass die Aussagesicherheit für die Überschreitung der Wirkschwelle bei >95% liegt. .

Für das diskutierte Beispiel ergeben sich aus der Umsetzung der Maßnahmen folgende Konsequenzen:

$$K = 1; CV_K = 0,1; \sigma_K = 0,1$$

$$\Rightarrow WS = K - 3\sigma_K = 1 - 0,3 = 0,7$$

Die aussagesichere Überschreitung der Wirkschwelle (WS) ist dann gegeben, wenn für den als wirksam geltenden Messwert M_W gilt:

$$CV_M = 0,2; \sigma_M = 0,2 \cdot M_W$$

$$M_W = WS - 2\sigma_M = 0,7 - 0,4 \cdot M_W$$

$$1,4 \cdot M_W = 0,7 \Rightarrow M_W = 0,5$$

Grafisch zeigt sich dann folgende Bild:

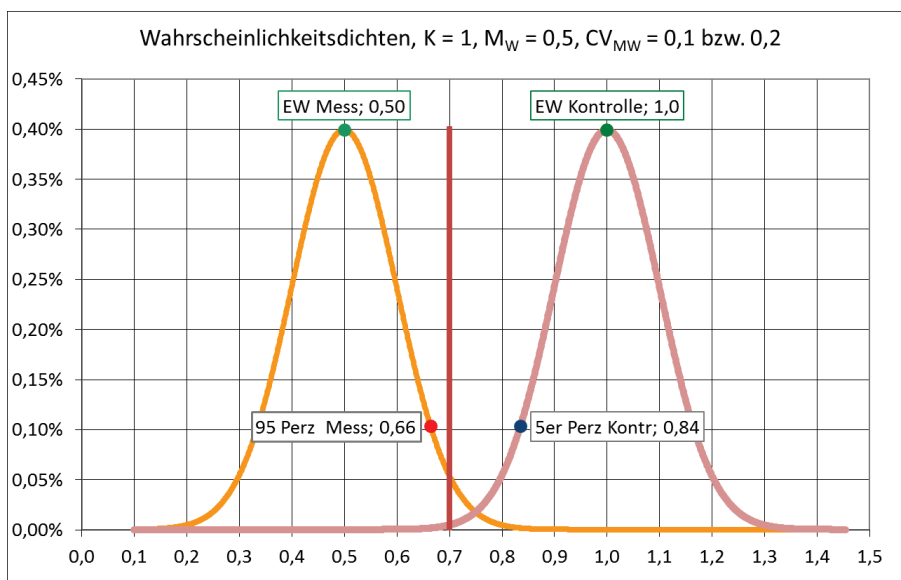


Abbildung 9: Wahrscheinlichkeitsdichten für Kontrollen und Messreihe unter Anwendung der Anforderungen $WS = K - 3 \cdot \sigma_K$ und $M_W = WS - 2 \cdot \sigma_M$

Das Zufallszahllexperiment dokumentiert die Wirksamkeit der getroffenen Maßnahmen:

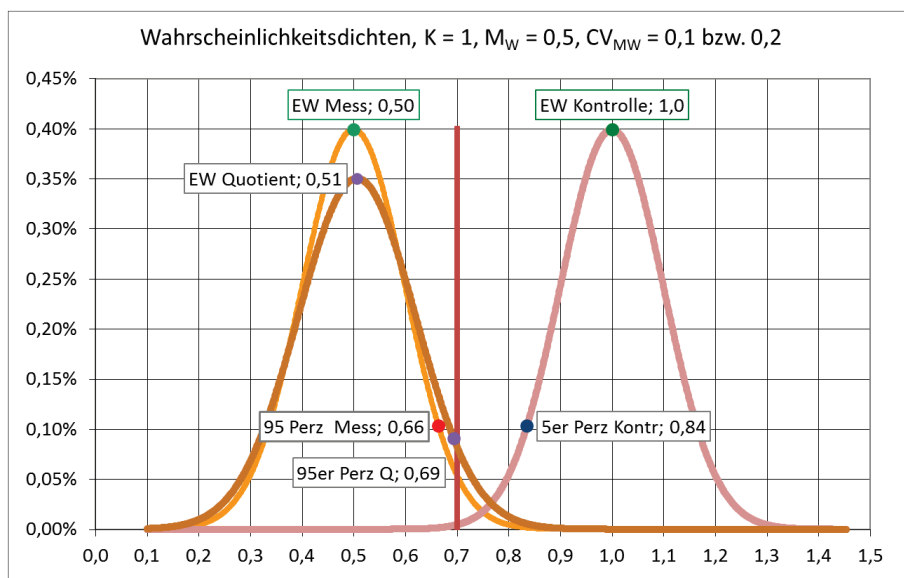


Abbildung 10: Wahrscheinlichkeitsdichten von Kontrolle (EW = 1, CV = 0,1) und Messreihe (EW = 0,5, CV = 0,2) und Zufallszahlenexperiment für den Quotienten Messwert/Kontrolle unter den Anforderungen $WS = K - 3 \cdot \sigma_K$ und $MW = WS - 2 \cdot \sigma_M$

Unter Rückgriff auf die Beurteilungsregeln ergeben sich klar strukturierte Verteilungen. Das Zufallszahlenexperiment zeigt zudem auf, dass in der Tat 95% aller Ergebnisse unterhalb der geforderten Wirkschwelle liegen.

Damit ist unter den genannten Anforderungen eine aussagesichere Messung realisiert. Allerdings ergibt sich der als wirksam geltende Messwert (MW) nicht direkt aus der Wirkschwelle sondern bedarf der Berücksichtigung der Standardabweichung der Messwerte.

In dargestellten Fall ergibt sich MW zu 50% des Kontrollwertes.

3 Daphnientest

Der Daphnientest wird nach ISO-Richtlinie 6341 aus dem Jahre 1996 bzw. einer modifizierten Version aus dem Jahre 2010 durchgeführt. In diesem Test werden pro Verdünnungsstufe vier Replikate mit jeweils 5 Tieren pro Replikat eingesetzt (ISO 1996). Seit 2010 ist auch die Testung von nur zwei Replikaten mit jeweils 10 Tieren möglich. Der Test wird mit einem Eluat, das mit 100 g Probenmaterial (entnommen als Teilprobe der Laborprobe) und einem Liter destilliertem Wasser hergestellt wurde, durchgeführt.

3.1 Ergebnisse

Die ISO-Richtlinie wurde in 2010 dahingehend verändert, dass nur noch zwei Ansätze à 5 Daphnien parallel untersucht werden. Insgesamt liegen 433 Tests für 113 verschiedene Materialien vor. 85 Untersuchungen (75%) sind mit 20er-Set von Daphnien durchgeführt worden. Aus 28 Untersuchungen (25%) liegen Ergebnisse für 10er-Sets von Daphnien vor. Mit dem neuen Ansatz, 10er-Sets von Daphnien einzusetzen, entfällt auf jede Daphnie 10% Wirkpotential, d.h. mit der zweiten immobilen Daphnie ist die Wirkschwelle von 10% überschritten.

Als Validitätskriterium wird die Immobilität in der Kontrolle verwendet. Ist die Immobilität innerhalb der Kontrolle $< 10\%$, so wird das angewandte Testsystem für valide befunden und der Test verwendet.

In den ausgewerteten Untersuchungen wurden nachfolgende Wirkungen gemessen:

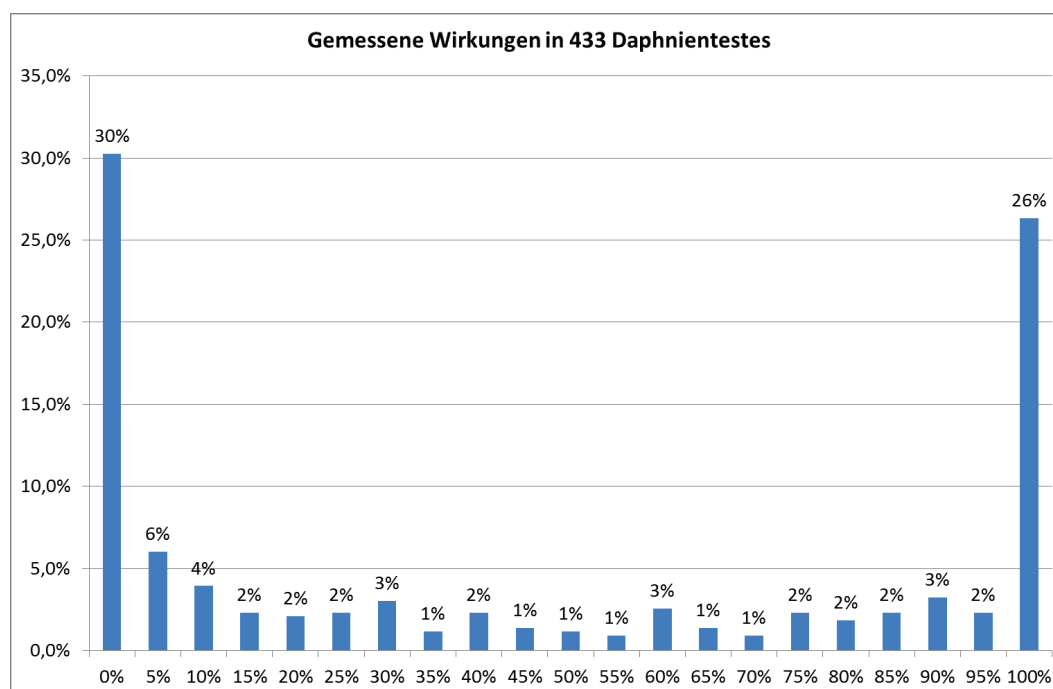


Abbildung 11: Histogramm gemessener Wirkungen in 433 Daphnientests

Die Übersicht zeigt, dass in mehr als der Hälfte aller Untersuchungen entweder keine oder aber eine vollständige Wirkung (100%) gemessen worden ist. In 6% aller Untersuchungen wird eine leichte Wirkung von 10% Immobilität gemessen. Alle anderen Wirkwerte werden jeweils in weniger als 5% der Fälle gemessen. Damit zeigt der Daphnientest in der Übersicht eine recht gute Selektivität. Allerdings erscheint die Zuordnung von Wirkungsmessungen im mittleren Bereich weniger eindeutig.

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde als nicht darstellbar gewertet, wenn eine geringere Konzentration eine erhöhte Wirkung ergibt. Gleiche Wirkungen unterschiedlicher Konzentrationen sind nicht negativ bewertet worden. Die Gesamtübersicht zeigt, dass in 11 von 113 Untersuchungen (9,7%) eine Dosis-Wirkungs-Beziehung nicht darstellbar ist. In 90% der durchgeführten Untersuchungen ist eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennbar bzw. nicht widerlegt.

3.2 Beurteilung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung

Der unbeeinflusste Daphnientest ist unter statistischen Gesichtspunkten als „dichotomes System“ (Münzwurf mit zwei möglichen Ereignisausgängen) mit einer Einzelwahrscheinlichkeit von $p = X\%$ für die „natürliche Immobilität“ zu interpretieren. Derartige Systeme können als Bernoulli-Kette aufgefasst und mit einer Binomialverteilung beschrieben werden. Allerdings muss dafür die „natürliche Immobilität“ in einer hinreichenden Anzahl von Kontrolluntersuchungen valide bestimmt werden.

Da Versuchsergebnisse, bei denen in der Kontrolluntersuchung 10% oder mehr der Daphnien immobil sind, nicht verwendet worden sind, lassen sich aus den vorliegenden Versuchsdaten keine sicheren Angaben zur „natürlichen Immobilität“ ableiten. Darüber hinaus ist nicht bekannt, inwieweit eine identische Kontrolluntersuchung zur Validierung parallel angesetzter Versuchsreihen eingesetzt worden ist. Die vorliegenden

Informationen deuten darauf hin, dass die natürliche Immobilität in der Größenordnung von ca. 2% liegt.

Für ein Untersuchungs-Set von Daphnien lässt sich die Wahrscheinlichkeit, eine immobile Daphnie in einer Kontrolluntersuchung aufzufinden als Funktion der natürlichen Immobilität darstellen. Es ergeben sich folgende Verläufe:

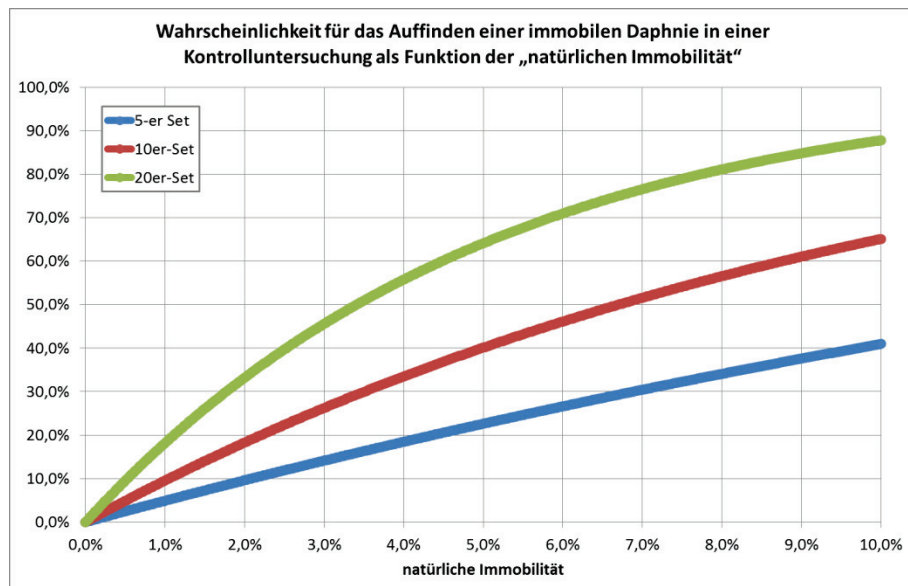


Abbildung 12: Wahrscheinlichkeit für das Auffinden einer immobilen Daphnie in einem Versuchsset einer Kontrolluntersuchung als Funktion der „natürlichen Immobilität“

Die Abbildung verdeutlicht, dass in einem 5er-Set von Daphnien bereits bei einer natürlichen Immobilität von 1% jedes zwanzigste Versuchsset verworfen werden muss. Für Sets von 10 bzw. 20 Organismen sind die Risiken entsprechend höher.

Für eine angenommene natürliche Immobilität von 2% ergibt sich aus der Binomialverteilung für ein 20er-Set von Daphnien folgende Standardabweichung für die natürliche Immobilität σ_{NI} :

$$\sigma_{NI} = \sqrt{n \cdot p \cdot (1-p)} = 0,626$$

Der Erwartungswert für die Zahl mobiler Daphnien unter Berücksichtigung der angenommenen natürlichen Immobilität liegt bei $EW = 20 \cdot 0,98 = 19,6$.

Für die Wirkschwelle ergibt sich aus der Anforderung $WS = EW - 3 \cdot \sigma_{NI} = 17,7$.

Insofern scheint das Validierungskriterium (10% immobile Daphnien in der Kontrolle) korrekt gesetzt. Die Wirkschwelle erscheint mit 10% bzw. 2 Daphnien sehr eng gesetzt, zumal die Streuung der Messproben dabei noch nicht berücksichtigt ist. Für das 10er-Set ergibt sich mit $EW = 9,8$ sowie $\sigma_{NI} = 0,44$ eine Wirkschwelle von 8,5.

Es erscheint daher sinnvoll, die Wirkschwelle mindestens auf einen Wert von 20% zu erhöhen. Um eine klare Unterscheidung von natürlicher Immobilität und Wirkung des Testmediums zu erreichen empfiehlt es sich angesichts der unbekannten natürlichen Immobilität sogar, die Wirkschwelle noch ein wenig höher anzusetzen.

Setzt man die für die natürliche Immobilität vorsichtig den recht hohen Wert von 5% an und fordert, dass eine im Mittel über viele Versuchsreihen 80%ige Wirkung sicher

gemessen werden kann, dann ergeben sich aus der Binomialverteilung nachfolgend dargestellte Summenhäufigkeiten für immobile Daphnien in einem 5er-Versuchsset:

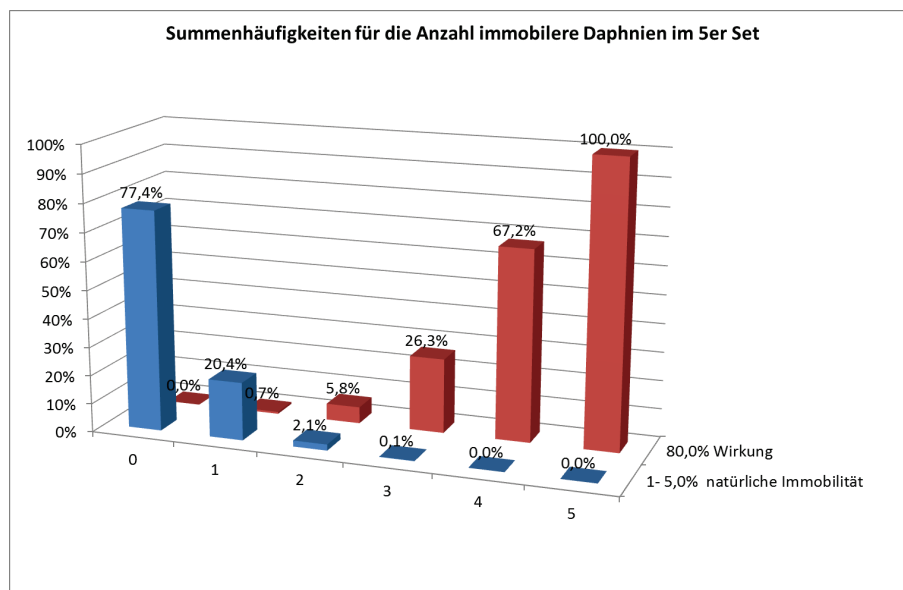


Abbildung 13: Summenhäufigkeiten für die Anzahl immobiler Daphnien bei 5% natürlicher Immobilität und 80%iger Wirkung des Testmediums

Für die hoch angenommene natürliche Immobilität von 5% liegt die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden von 2 oder mehr immobilen Daphnien in einer Kontrolluntersuchung bei 2,1%. Findet man 4 oder mehr immobile Daphnien, so ist auch bei einer hoch angenommenen 5%igen natürlichen Immobilität mit einer Wahrscheinlichkeit von > 99,9% sichergestellt, dass die Immobilität auf die Wirkung des Testmediums zurückgeht.

Da der Validitätstest eine natürliche Immobilität von bis zu 10% zulässt wird vorgeschlagen die versuchsspezifische Wirkschwelle wie folgt zu berechnen:

$$WS = \frac{EW_k + 3 \cdot \sigma_k}{Anzahl_k} = \frac{0 + 3 \cdot \sqrt{n \cdot 0,1 \cdot 0,9}}{n} = \frac{0,9}{\sqrt{n}}$$

Für das 20er Set ergibt sich die Wirkschwelle zu 20,1%. Die Verkleinerung auf das 10er Set bewirkt die Notwendigkeit der Erhöhung der Wirkschwelle auf 28,5%.

3.3 Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen

Wird ein Test erst dann als positiv bewertet, wenn die versuchsspezifische Wirkschwelle auch unter Berücksichtigung der Varianz der vier Parallelmessungen aussagesicher überschritten ist, ergeben sich gegenüber dem ursprünglichen Testdesign abweichende Werte.

Die veränderte Beurteilung soll hier kurz an einem Beispiel visualisiert werden. Gearbeitet wurde mit einem 20er-Set. Nach Versuchsende sind insgesamt 8 Daphnien immobil, die Verteilung auf die vier 5er Sets ist (5/2/1/0).

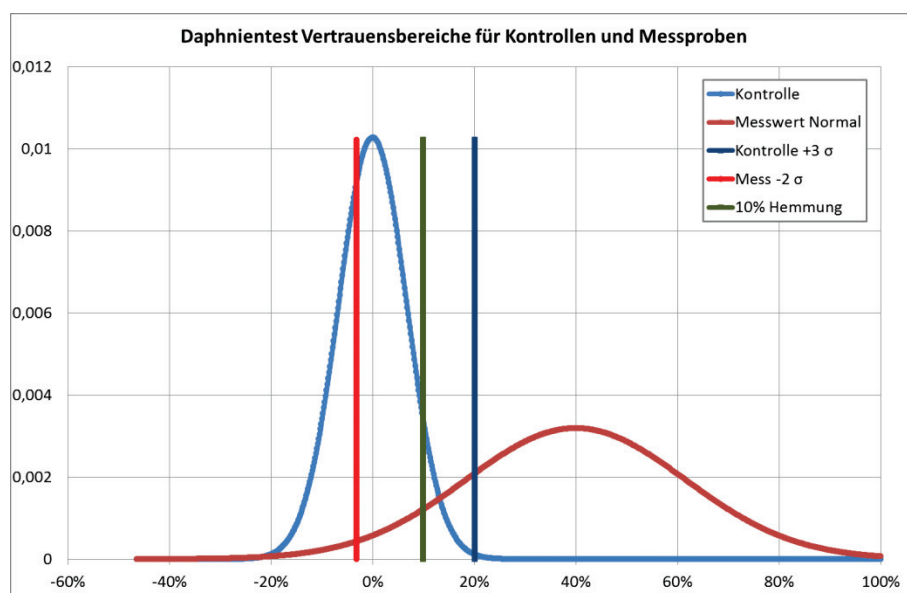


Abbildung 14: Veränderte Beurteilung im Daphnientest, beispielhaft

Der Erwartungswert für die Kontrollverteilung ist gleich Null. Die Wirkschwelle liegt wie oben dargestellt basierend auf einer maximal 10%igen natürlichen Immobilität im 20er-Set bei 20,1% und damit doppelt so hoch wie die festgelegte Wirkschwelle von 10%.

Die Messdaten der vier Sets sind uneinheitlich, daher weist der ermittelte Wert von 40% eine große Streuung auf. Der Zahlenwert für σ_M liegt bei 21,6% ($CV = 0,54$). Die zweifache Standardabweichung des Messwertes nach unten liegt daher bei -3,2%. Folglich ist der Mittelwert der Messung zwar größer als die Wirkschwelle, die Aussagesicherheit der Untersuchung ist jedoch zu gering, um mit 95%iger Aussagesicherheit die Überschreitung festzustellen. Folglich kann in diesem Test keine signifikante Wirkung gemessen werden.

Um die veränderte Beurteilung über alle evaluierten Versuche zu visualisieren, werden die Ergebnisse der vorliegenden 113 Untersuchungen in beiden Beurteilungsvarianten dargestellt. Die 113 Tests sind auf der x-Achse angeordnet. Auf der y-Achse findet sich die Konzentration des eingesetzten Abfalls im eluierten Material.

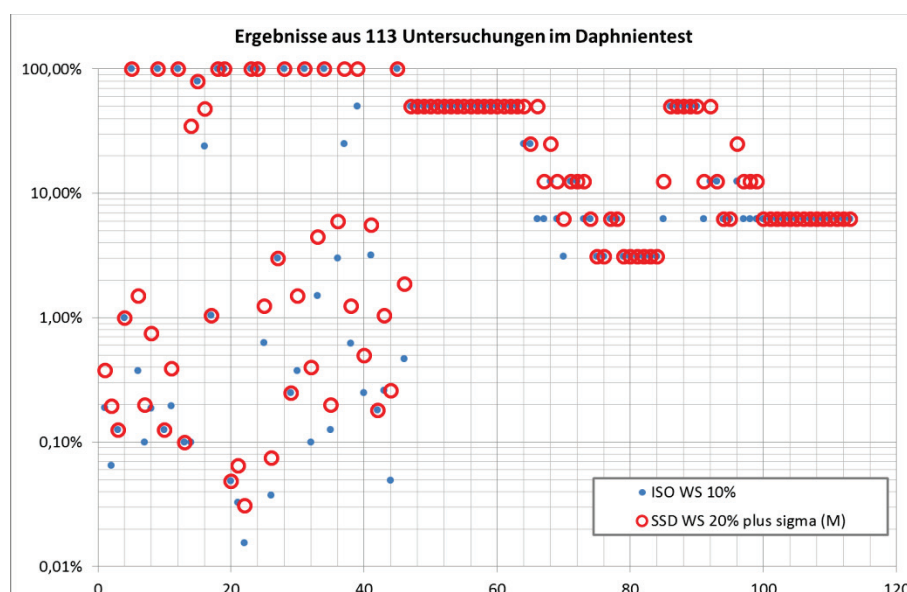


Abbildung 15: Übersicht Daphnientest Ergebnisse gemäß ISO 6341 und Auswirkungen bei veränderter Beurteilung

Die Übersicht zeigt, dass die veränderte Beurteilung die Wirkkonzentrationen in 37 Fällen (32,7%) erhöht werden. In 76 Fällen (67,3%) bleibt die Wirkkonzentration gleich.

Die Auflösung der Messeinrichtung bis in niedrige Konzentrationsbereiche hinein bleibt auch bei veränderter Beurteilung insgesamt gut erhalten.

44 von 113 (38,9%) Untersuchungen zeigen eine identifizierbare Dosis-Wirkungs-Beziehung. In 10 Untersuchungen (8,8%) wird die Dosis-Wirkungsbeziehung von den Messergebnissen widerlegt. Bei insgesamt 59 Untersuchungen (52,2%) ließ das eindeutig positive bzw. negative Ergebnis keine Erkennung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung zu.

4 Algentest

Der Algentest wird nach ISO 8692 aus dem Jahre 2004 durchgeführt. Der Test wird mit einem Eluat, das mit 100 g Probenmaterial (entnommen als Teilprobe der Laborprobe) und einem Liter destilliertem Wasser hergestellt wurde, durchgeführt. In diesem Test werden pro Verdünnungsstufe drei Replikate mit dem zu testenden Eluat sowie sechs Replikate als Kontrollen (d.h. nur mit Wachstumsmedium und Inokulum) eingesetzt (ISO 2012).

4.1 Ergebnisse

Bei der Querevaluation wurden zunächst die Biomassefaktoren aus den vorliegenden 284 Kontrolluntersuchungen angesehen und diese in einer Verteilung abgebildet.

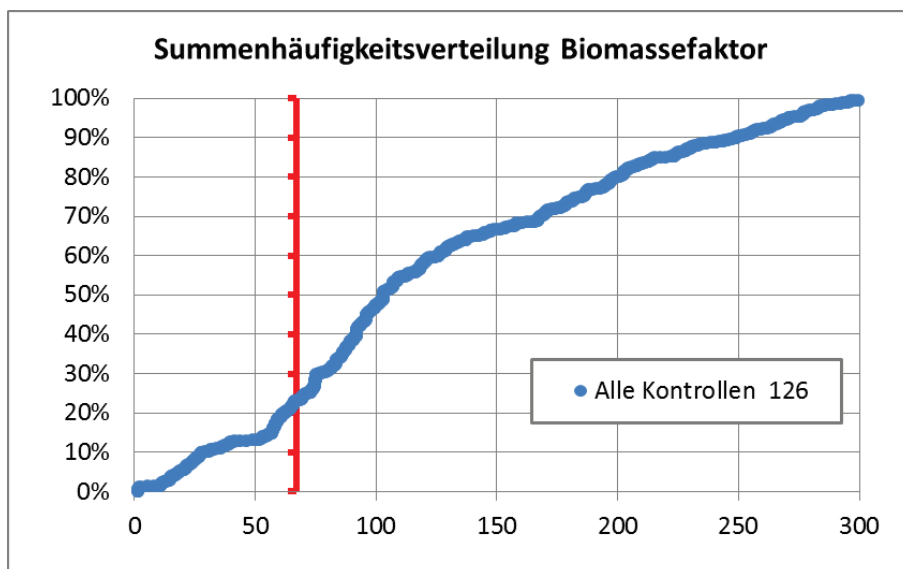


Abbildung 16: Verteilung Biomassefaktoren in 284 Kontrolluntersuchungen

Die Abbildung verdeutlicht, dass in mehr als 20% der vorliegenden Kontrolluntersuchungen der vorgegebene Biomassefaktor von 67 unterschritten worden ist. In insgesamt 27 der ausgewerteten 92 Untersuchungen (29,3%) ist dieser Fall aufgetreten. Im Mittel wird ein Biomassefaktor von 126 erreicht.

Diese Verteilung spiegelt sich auch in den resultierenden Wachstumsraten wider. Die korrelierende Wachstumsrate von 1,4 wird in mehr als 20% der Untersuchungen unterschritten.

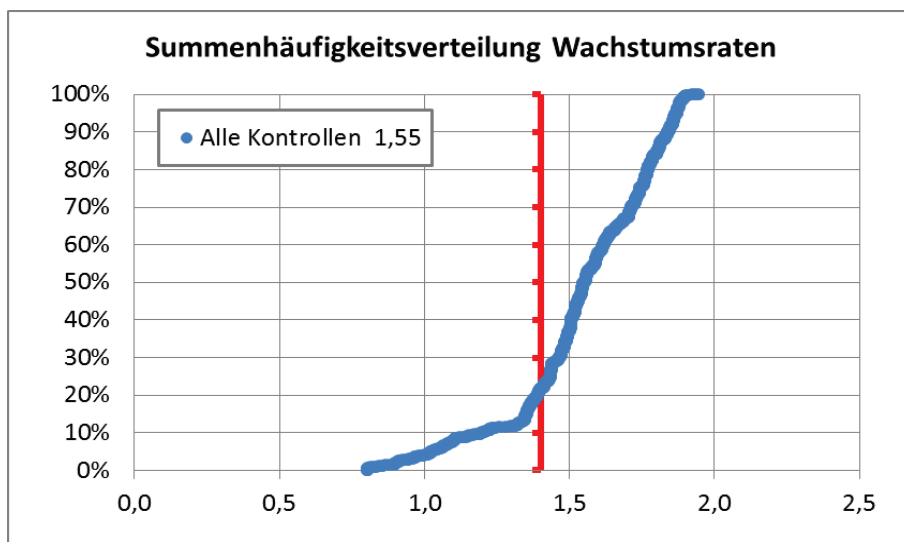


Abbildung 17: Verteilung Wachstumsraten in 284 Kontrolluntersuchungen

Da es sich bei den Wachstumsraten um Logarithmen handelt, liegen die Werte enger zusammen. Die Mittelwertbildung bei den Kontrolluntersuchungen führt demnach dazu, dass auch weniger wachstumsfähige Algen für die Versuche eingesetzt werden. Die Detailuntersuchung des Variationskoeffizienten für den Biomassefaktor zeigt auf, dass der CV der Kontrolluntersuchungen im Mittel bei etwa 15% liegt. Im Rahmen der zweifachen Standardabweichung muss bei einer Kontrolluntersuchung mit einem CV von bis zu 50% gerechnet werden. Die Nutzung des Mittelwertes aus 6 Untersuchungen verringert den CV um einen Faktor von $1/\sqrt{6}$, es muss aber im Rahmen der zweifachen Standardabweichung immer noch mit einem CV von 21% gerechnet werden. Dies bedeutet, dass die biologische Schwankung des Systems im Rahmen der zweifachen Standardabweichung bei etwa 20% liegt. Wird die Wirkschwelle ebenfalls auf 20% festgelegt, kann es passieren, dass biologische Schwankung und Wirkung nicht klar unterscheidbar sind.

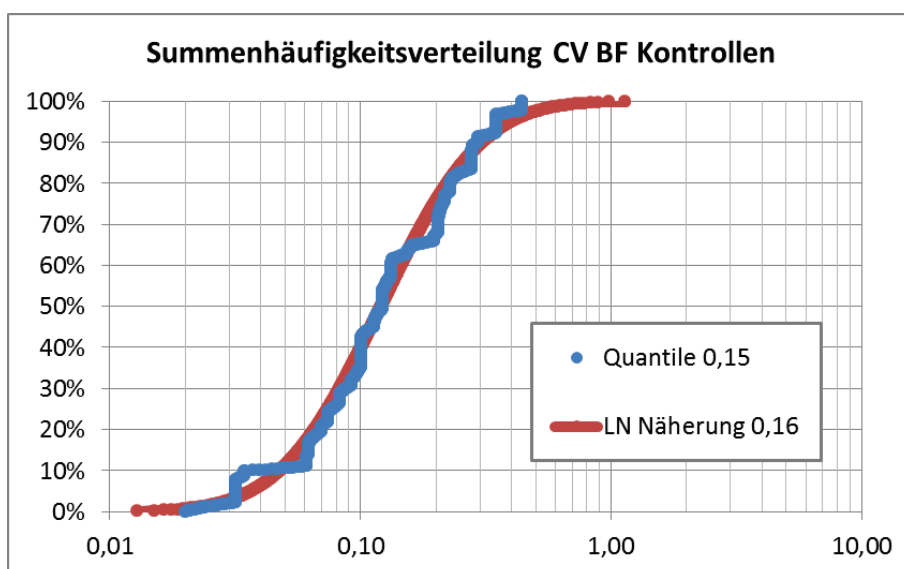


Abbildung 18: Verteilung CV der Biomassefaktoren in 92 Kontrolluntersuchungen

Die Detailbetrachtung der Variationskoeffizienten in den Messproben offenbart, dass in den Messproben nochmals deutlich höhere Unsicherheiten auftreten.

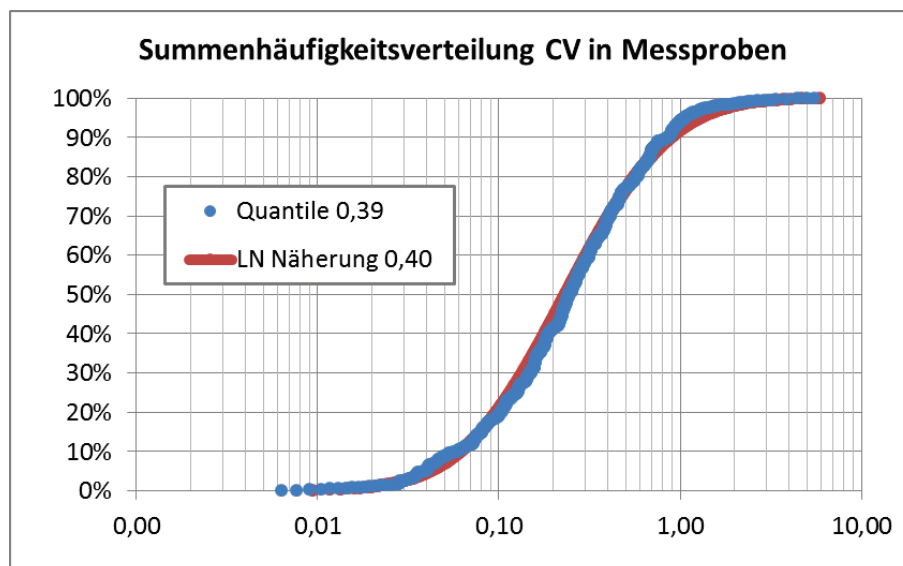


Abbildung 19: Verteilung CV der Biomassefaktoren in 264 Messproben

In den Messproben liegt der mittlere CV bei knapp 40%. Im Rahmen der zweifachen Standardabweichung werden Werte bis zu 189% des Messwertes erreicht, die auch für den Mittelwert aus drei Messungen nicht unter 100% fallen. Das bedeutet, dass der Vertrauensbereich der Messergebnisse sehr groß und die Aussagesicherheit der erzielten Ergebnisse gering ist.

Als Hintergrund für die beobachtete Messunsicherheit kommen zwei Aspekte in Frage:

- a) Die Varianz der Messproben (verschiedene Eluate oder Unterschiede)
- b) Die Varianz des Messsystems

Es kann nicht abschließend aufgeklärt werden, ob die Unsicherheiten aus der Probe oder aus dem Messsystem kommen. Insgesamt ergeben sich aber Unsicherheiten in der Interpretation der Ergebnisse des Algentests.

4.2 Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung

In Einzelfällen kann es dazu kommen, dass die Werte der Nullmessungen der Proben geringer ausfallen als die Kontrollmessung ohne Algenbesatz, so dass sich ein negativer Basiswert ergibt. In derartigen Fällen wird der Bezugswert auf „1“ gesetzt. Ist der Wert > 0 aber < 1 , so dient er als Bezugsgröße. Diese kleine Schwäche des Verfahrens erzeugt Messungenauigkeiten, die jedoch in der Regel ohne große Auswirkungen bleiben, da nach 72 Stunden im Normalfall weit höhere Messwerte erreicht werden.

Messtechnisch problematischer ist der Umgang mit den Messwerten und Validierungskriterien:

- Der Biomassefaktor von 67 muss lediglich für den Mittelwert der sechs Kontrollreplikate eingehalten werden. Wenn in einzelnen Kontrollen der Biomassefaktor unterschritten wird, so wird dies hingenommen. Die Streuung in den Kontrollproben wird nicht ermittelt.
- Bei den Wachstumsraten handelt es sich um Logarithmen. Durch das Logarithmieren der Biomassefaktoren sinken die Werte. Ein Variationskoeffizient

der Logarithmen von 5% lässt für die Biomassefaktoren einen CV von > 20% zu. Dies liegt im Bereich der Wirkschwelle!

- Auch bei der Messung der Untersuchungsproben bleiben die Streuungen der drei Parallelansätze unberücksichtigt. Es wird ausschließlich mit dem Mittelwert gearbeitet. Das suggeriert eine Messgenauigkeit, die das System nicht immer bietet.

Für die Gewinnung belastbarer Messergebnisse schlagen wir als qualitätssichernde Maßnahme vor, auch hier die oben entwickelten Varianzkriterien anzuwenden.

1. Wirkschwelle $WS < MW_{\text{Kontrollen}} - 3 \cdot \sigma_K$
2. Der Messwert sollte die Wirkschwelle um $2 \cdot \sigma_M$ überschreiten.

Die Querevaluation zeigt, dass ein Biomassefaktor von 67 nicht zwingend erforderlich ist, solange das Varianzkriterium erfüllt ist. Aus den 92 Untersuchungen ergibt über die Varianzen der Kontrolluntersuchungen eine mittlere Wirkschwelle von 19,2% bei einer Standardabweichung von 13,9% (CV = 0,73).

4.3 Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen

Die varianzanalytisch veränderte Beurteilung der Testergebnisse wird an einem ausgewählten Beispiel erläutert.

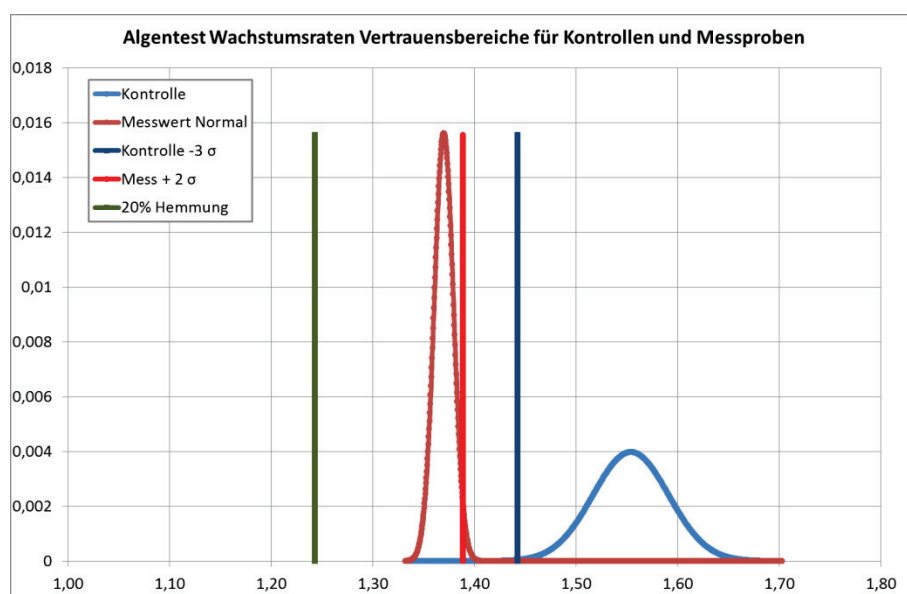


Abbildung 20: Veränderte Beurteilung im Algentest, beispielhaft.

Die Kontrolluntersuchungen zeigen im Mittel eine Wachstumsrate von 1,55. Der CV liegt bei 0,04 so dass die Wirkschwelle als dreifache Standardabweichung der Kontrollproben nach unten bei einem Wert von 1,44 liegt. Die gesetzte Wirkschwelle von 20% Hemmung gegenüber dem Mittelwert liegt bei etwa 1,24. Sämtliche Messwerte liegen gut reproduzierbar im Bereich zwischen 1,33 und 1,4 und damit zwar deutlich oberhalb der gesetzten Wirkschwelle, aber dennoch aussagesicher außerhalb des Bereiches der Kontrollproben. Hier liegt eine statistisch signifikante Wirkung vor, obwohl die Wirkschwelle von 20% vom Mittelwert nicht überschritten wird.

Die Veränderung der Auswertungsmodalitäten hat auf die vorliegenden Tests folgende Auswirkungen.

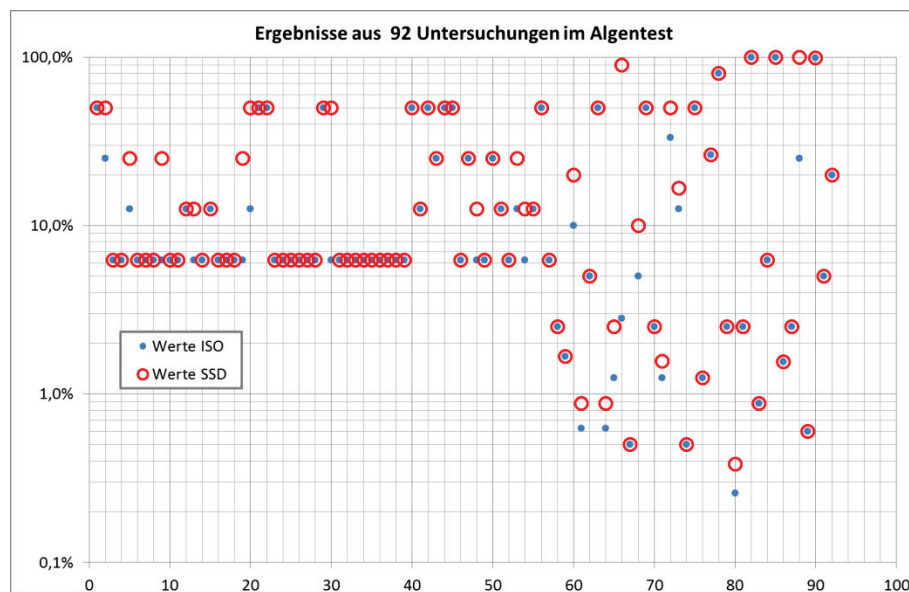


Abbildung 215: Übersicht Algentest Ergebnisse gemäß ISO 8692 und Auswirkungen bei veränderter Auswertung über Varianzanalysen

In 21 von 92 Untersuchungen (22,8%) verändert die Varianzanalyse das Ergebnis. In 77,2% der Untersuchungen bleibt das Ergebnis erhalten.

Eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung ist in 62% der Untersuchungen erkennbar. In 12 Untersuchungen (13%) gibt es deutliche Widersprüche gegen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung. Aus 23 Untersuchungen (25%) bleibt die Dosis-Wirkungs-Beziehung uneindeutig.

5 Bakterienkontakttest

Der Bakterienkontakttest wurde erst als ISO/CD 10871 aus dem Jahre 2008 beschrieben, liegt aber jetzt in einer modifizierten Form als ISO 18187 (2012) vor. Der Test ist relativ neu, war aber bereits Bestandteil der HMVA Testreihe im Jahre 2007 sowie im UBA-Ringtest 2008. Er ist darüber hinaus in den UBA Handlungsempfehlungen von 2008 enthalten. Der Test wird mit jeweils vier 24-Mikrotiterplatten (d.h. vier Replikaten) pro Verdünnungsstufe durchgeführt.

Die im Test verwendete Einsatzmenge ist mit nur 0,6 g in fertiger Mischung mit Quarzsand sehr gering. Darüber hinaus wird das Material nochmals auf eine Korngröße < 2 mm gebrochen. Aufgrund der sehr geringen Einsatzmenge bestehen Bedenken, inwieweit die Analysenprobe den Abfall repräsentativ abbilden kann.

5.1 Ergebnisse

Für die Auswertung liegen insgesamt Daten über 55 unterschiedliche Abfälle vor, die in verschiedenen Konzentrationen untersucht worden sind. Im Rahmen dieser Untersuchungen sind insgesamt 243 Kontrolluntersuchungen durchgeführt worden. Werden die 243 Kontrolluntersuchungen in einer Summenhäufigkeitsverteilung abgebildet, so wird deutlich, dass es in etwa 10% der Kontrolluntersuchungen zu einer

Unterschreitung des Validitätskriteriums (einer um den Faktor 5 erhöhten Fluoreszenz nach 60 Minuten) kommt.

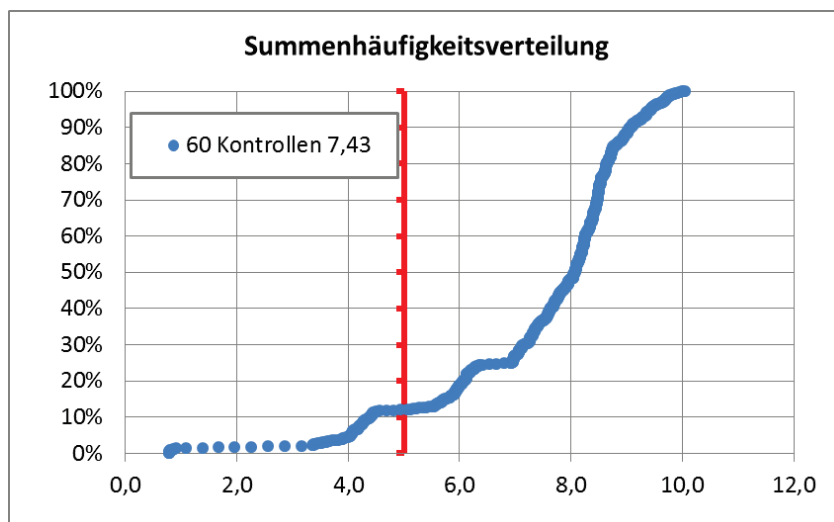


Abbildung 22: Summenhäufigkeitsverteilung aller 243 Kontrolluntersuchungen im Bakterienkontakttest

Die optische Struktur der Verteilung deutet darauf hin, dass Unterverteilungen identifizierbar sind. Die Bereiche und die dazugehörigen Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

Faktor Fluoreszenz (t60/t0)	Anzahl Werte	Anteil [%]	EW Fluoreszenz	CV des EW
$F < 3$	5	2,1%	1,1	0,82
$3 < F < 5$	24	9,9%	4,1	0,08
$5 < F < 6,9$	31	12,8%	5,9	0,09
$F > 6,9$	183	75,3%	8,3	0,09
mit: Anteil [%] Anteil der vorliegenden Kontrolluntersuchungen EW Fluoreszenz Erwartungswert für den Faktor der Fluoreszenzerhöhung CV des EW Variationskoeffizient des Erwartungswertes für den Teilbereich				

Die Detailanalyse zeigt, dass insgesamt 12% der vorliegenden Kontrolluntersuchungen das Validitätskriterium nicht erfüllen. Oberhalb des Kriteriums lassen sich zwei Bereiche unterscheiden: Ein Bereich hat einen Erwartungswert von 5,9, ein anderer einen Erwartungswert von 8,3. Dieser Unterschied in der Fluoreszenz kann ggf. auf verschiedene Gruppen von Bakterien zurückzuführen sein. Dies kann nicht abschließend geklärt werden.

Aus den Messproben liegen insgesamt 1.196 Messergebnisse zum Zeitpunkt $t = 60$ Minuten vor. Vergleicht man die Summenhäufigkeitsverteilung dieser Messergebnisse mit der Verteilung der Kontrollanalysen, so lassen sich daraus folgende Schlussfolgerungen ziehen:

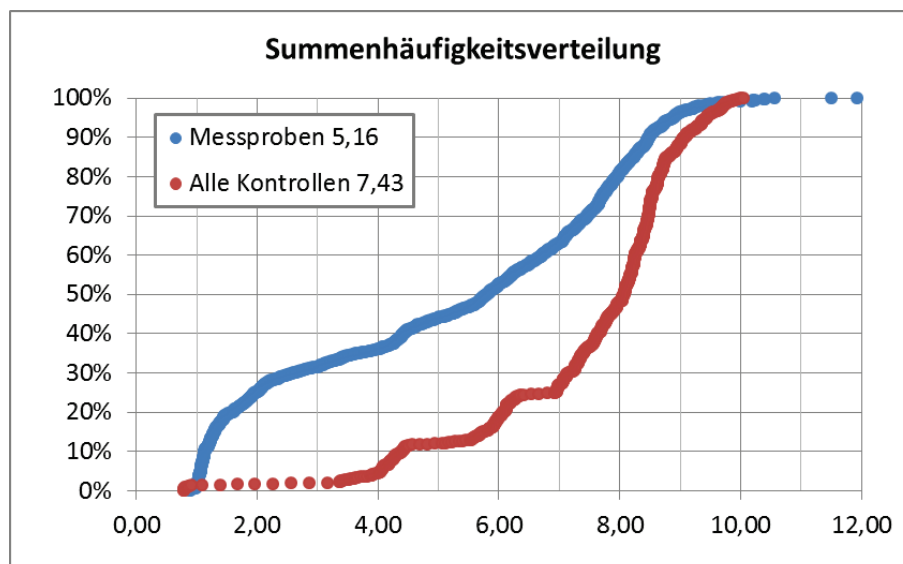


Abbildung 23: Summenhäufigkeitsverteilungen aller vorliegenden 1.196 Messproben sowie der 243 Kontrolluntersuchungen im Bakterienkontakttest zum Zeitpunkt $t = 60$ Minuten

In den Messproben sind kaum typische Verteilungsmuster zu erkennen. Dies ist ein Indiz für die Wirkung der Abfälle auf die Fluoreszenz. Wenn der Validitätsparameter eingehalten wird, dann liegt der Erwartungswert für die Kontrolluntersuchungen auch im ungünstigen Fall einer geringeren Fluoreszenz im Rahmen der zweifachen Standardabweichung sicher im Bereich:

$$4,7 \leq F \leq 7,1$$

Bei einer in einer Messprobe gemessenen Fluoreszenz von $F(t = 60 \text{ Min}) < 3$ handelt es sich daher sehr wahrscheinlich um eine Hemmung.

5.2 Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung

Für die Beurteilung werden nur die Messwerte zu den Zeitpunkten 15, 30 und 45 Minuten genutzt. Aus diesen Werten wird die Steigung der Fluoreszenz pro Minute als $\Delta F/\Delta t$ bestimmt und die lineare Korrelation geprüft. Die Einzelwerte für die Steigung der zu messenden Proben werden dann zum Mittelwert der Kontrollproben in Relation gesetzt und die Hemmung bestimmt. Aus den vier Einzelwerten der Hemmung für jedes Replikat wird wiederum ein Mittelwert gebildet.

Die Steigung (Veränderung der Fluoreszenz pro Minute) als Messparameter geben, kann ggf. aus Gründen der Homogenisierung der Messwerte angezeigt sein. Aber auch das Zeitverhalten der Fluoreszenz selbst ist aufschlussreich, zumal dabei sowohl Adaptions- als auch Stabilisierungseffekte zu beobachten sind.

Beispielhaft sei aus den vier Messungen (15, 30, 45 und 60 Minuten) pro Messzeitpunkt sowie der Kontrolluntersuchung zum Zeitpunkt 60 Min jeweils eine angenäherte Lognormalverteilung abgebildet, die Werte- und Schwankungsbereich darstellen kann. Die Messwerte der Fluoreszenz werden jeweils als Vielfaches des Messwertes zum Zeitpunkt 0 Minuten dargestellt. Darüber hinaus wird durch Abbildung der Messreihen aller Zeitpunkte eine gewisse Dynamik bzw. Anpassungsreaktion des Messsystems sichtbar.

Die in der Legende angegebenen Zahlen geben jeweils die Mittelwerte der Verteilungen an. Die Grafen verdeutlichen, dass die Streuung der Werte mit zunehmender Messdauer steigt. Darüber hinaus wird ersichtlich, dass auch die Kontrolluntersuchung streut. Die Beurteilung einer 30%igen Hemmung erfolgt daher auf Basis der „zufälligen“ Lage von Mittelwerten aus Messung und Kontrolle.

Zur aussagesicheren Messung soll auch hier die Beurteilung auf einem Varianztest basieren und wie folgt dargestellt werden:

1. $\text{Wirkschwelle } WS < MW_{\text{Kontrollen}} - 3 \cdot \sigma_K$
2. Der Messwert sollte die Wirkschwelle um $2 \cdot \sigma_M$ überschreiten.

Darüber hinaus sollte eine erkennbare Dosis-Wirkungs-Beziehung vorliegen.

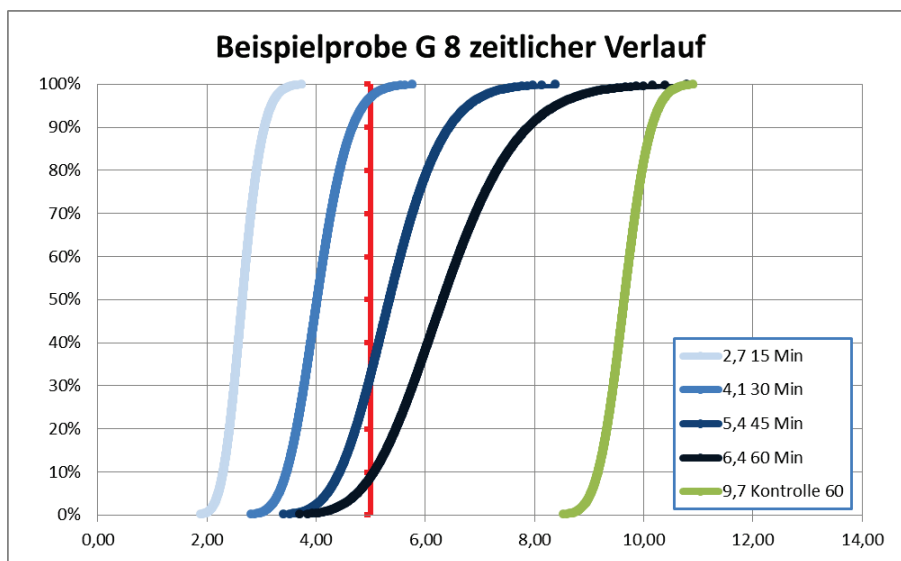


Abbildung 24: Auswertung Bakterienkontakttest beispielhaft

5.3 Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen

Auch für den Bakterienkontakttest wird ein Beispiel im Detail visualisiert.

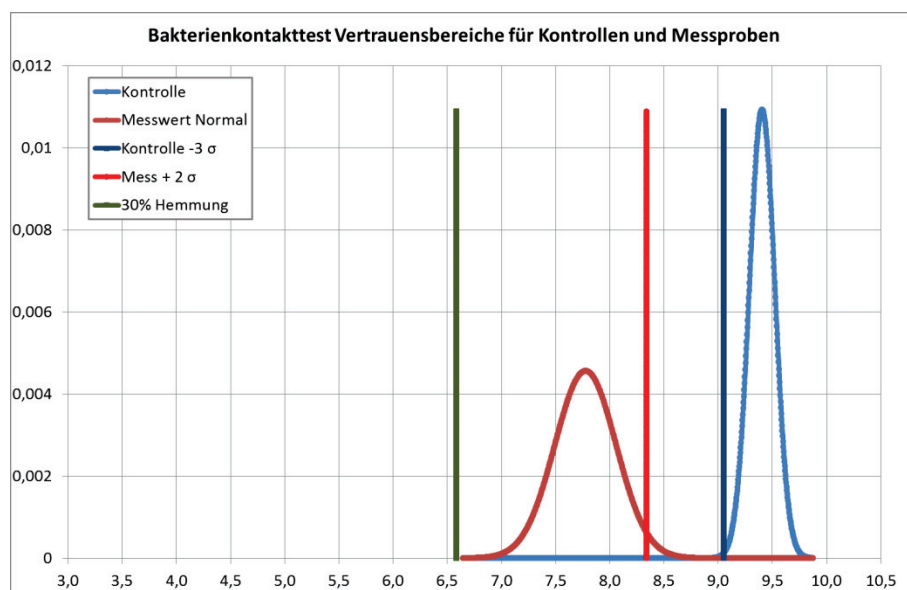


Abbildung 25: Beurteilung im Bakterienkontakttest auf der Basis einer Varianzanalyse zum Messzeitpunkt = 60 Min, beispielhaft.

Kontrolluntersuchungen und Messproben liegen in klar abgrenzbaren Bereichen. Die Wirkung ist statistisch signifikant, obwohl die gesetzte Wirkschwelle von 30% nicht überschritten wird. In der Gesamtübersicht aller Tests ergibt sich folgendes Bild:

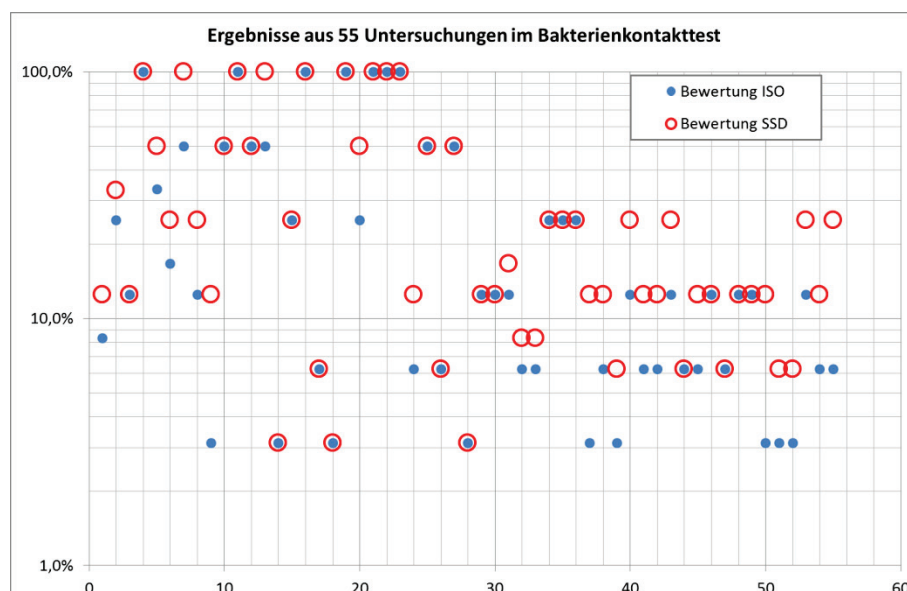


Abbildung 26: Übersicht Bakterienkontakttest Ergebnisse gemäß ISO/CD 10871 und Auswirkungen bei veränderter Evaluation

In 27 Untersuchungen (49,1%) ist das Ergebnis unverändert, entsprechend ist es in 28 Fällen (50,9%) verändert. In 5 Fällen (9,1%) führt die veränderte Auswertung zu einer höheren Konzentration. In 23 Fällen werden teilweise deutlich niedrigere Konzentrationen ermittelt. Dies liegt darin begründet, dass die gesetzte Wirkschwelle mit

30% relativ hoch liegt. Auf Basis der Standardabweichungen können vielfach auch niedrigere Hemmungen als statistisch signifikant identifiziert werden.

Eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung ist in 37 von 55 Fällen gegeben (67,3%). In 8 Fällen ist keine Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennbar. Weitere 6 Fälle sind nicht bewertbar.

6 Pflanzenwachstumstest

Der Pflanzentest wird nach ISO 11269-2 aus dem Jahre 2004 durchgeführt (im Jahr 2012 geringfügig modifiziert). Der Test wird mit ca. 900 g Gemisch aus LUFA Standardboden 2.3 mit dem Originaltestmaterial durchgeführt. Pro Verdünnungsstufe werden vier Replikate (= Testgefäße, in die zu Testbeginn 10 samen eingesetzt wurden) durchgeführt.

6.1 Ergebnisse

Für den Pflanzentest mit *Brassica napus* (Raps) liegen insgesamt 380 Kontrolluntersuchungen vor. Die Summenhäufigkeitsverteilung lässt sich mit einem Korrelationskoeffizienten von 99,6% mit einer Lognormalverteilung annähern:

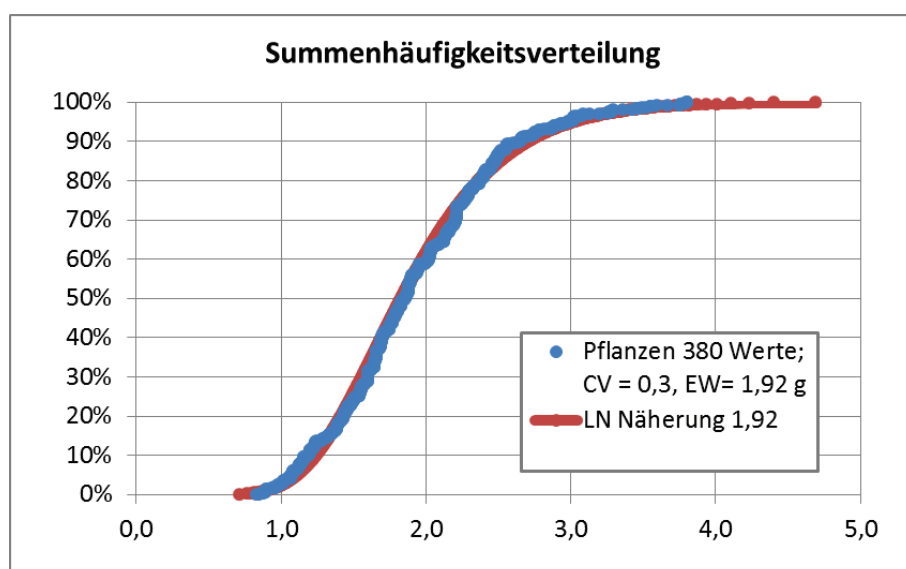


Abbildung 27: Summenhäufigkeitsverteilung von 380 Kontrolluntersuchungen *Brassica napus* im Pflanzentest

Zieht man die angenäherte Lognormalverteilung zur Beschreibung des Pflanzengewichtes heran, so ergeben sich für das unbeeinflusste Pflanzengewicht die nachfolgenden Parameter:

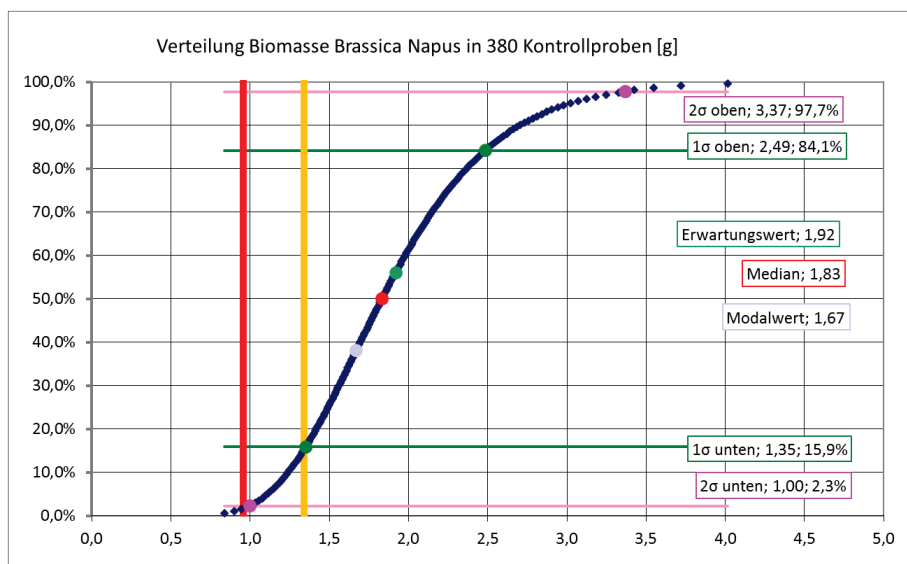


Abbildung 28: Näherungsverteilung für das oberirdische Gewicht von Kontrollproben *Brassica napus* im Pflanzentest ($\mu = 0,606$; $\sigma = 0,304$)

Das Pflanzengewicht der Kontrollproben kann im Rahmen der Verteilung schwanken. Im Rahmen der einfachen Standardabweichung werden Werte von $1,35 \text{ g} \leq \text{Gewicht} \leq 2,49 \text{ g}$ erreicht, für die zweifache Standardabweichung gilt: $1,00 \text{ g} \leq \text{Gewicht} \leq 3,37 \text{ g}$. Der Erwartungswert für das Pflanzengewicht liegt bei 1,92 g, der Median bei 1,83 g und der Modalwert bei 1,67 g. Orientiert man die Beurteilung der Messprobe am zufälligen mittleren Gewicht von 20 Kontrollpflanzen für eine Messprobe und setzt 30% Hemmung gegenüber dem zufälligen mittleren Gewicht der Kontrollpflanzen als Wirkschwelle fest, so ergibt sich auf der Basis der ermittelten Gewichtsverteilung für *Brassica napus* die nachfolgende Summenhäufigkeitsverteilung für das mittlere Pflanzengewicht aus 20 zufälligen Kontrolluntersuchungen.

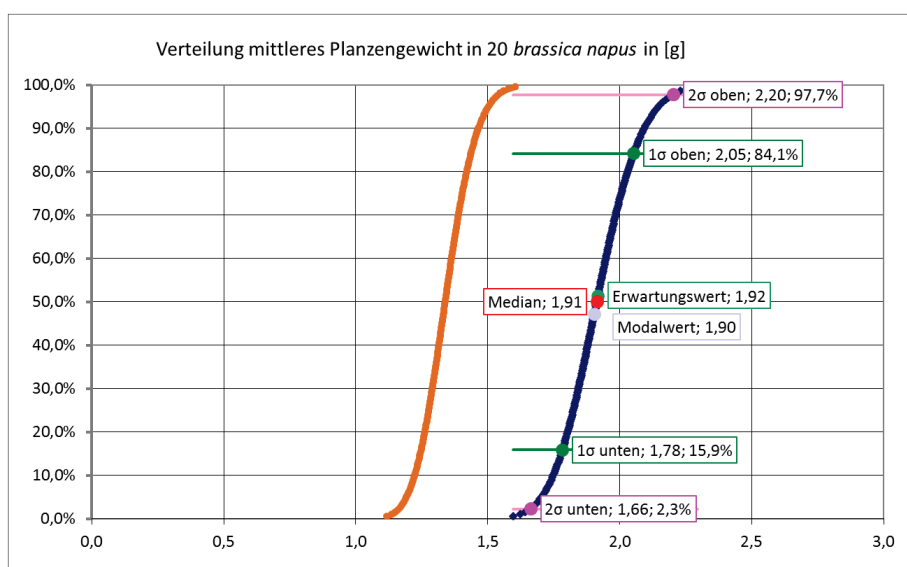


Abbildung 29: Summenhäufigkeitsverteilung für das mittlere Pflanzengewicht aus 20 zufälligen Kontrollpflanzen *Brassica napus* ($\mu = 0,649$; $\sigma = 0,070$)

Durch die Verwendung von 20 Pflanzen und die Mittelwertbildung verringert sich der CV für das mittlere Pflanzengewicht um den Faktor $1/\sqrt{20} = 0,223$. Der CV für das

mittlere Pflanzengewicht liegt damit nicht mehr bei 30% sondern bei ca. 7%. Mit den vorliegenden Ergebnissen der Messproben sieht die Summenhäufigkeitsverteilung wie folgt aus:

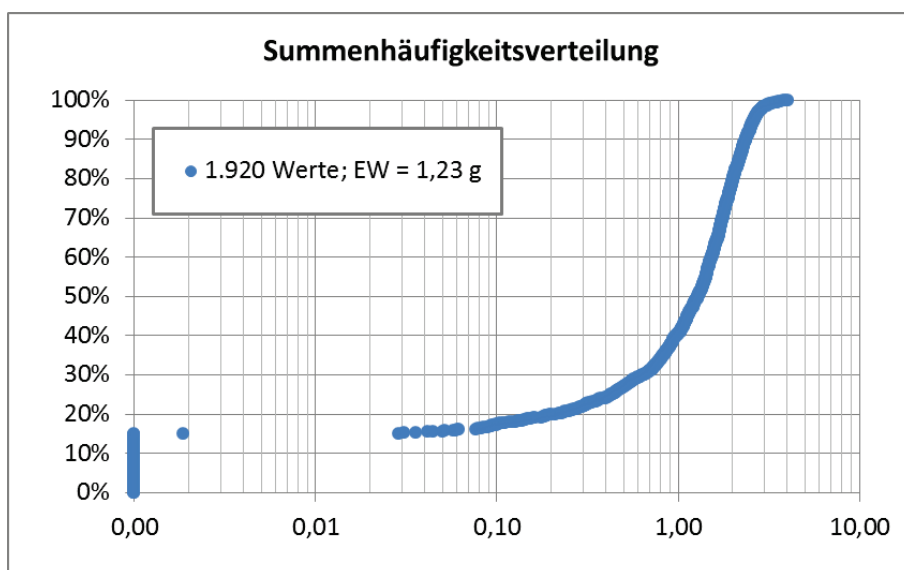


Abbildung 30: Summenhäufigkeitsverteilung von 1.920 Messproben *Brassica napus*

Wie bereits beim Bakterienkontakttest dargelegt, zeigt auch diese Summenhäufigkeit kein typisches Verteilungsmuster. Die Wirkung des Abfalls auf das Wachstum ist bereits aus der Verteilung ablesbar. Beschränkt man die Verteilung auf Pflanzengewichte $> 1,15$ g, so ergibt sich ein nahezu identisches Pflanzengewicht wie in den Kontrollproben.

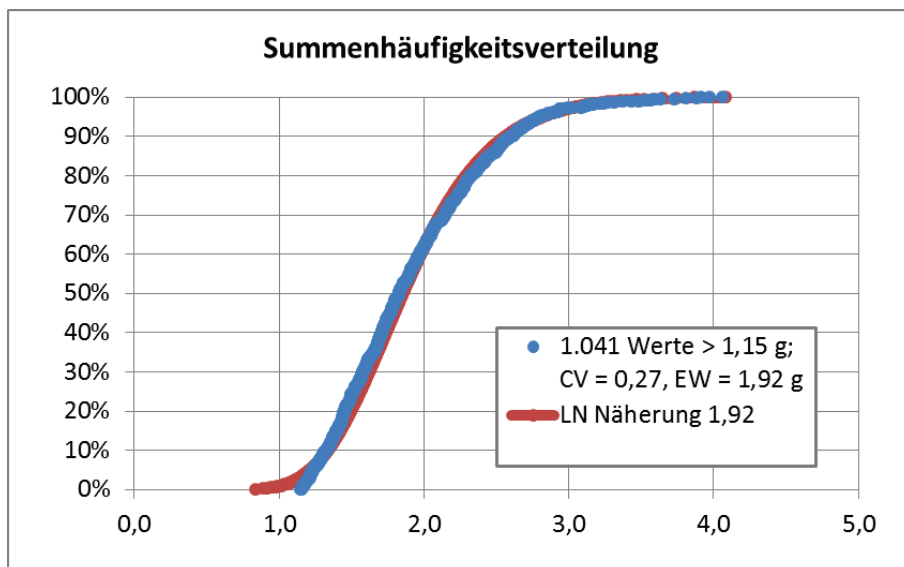


Abbildung 31: Summenhäufigkeitsverteilung 1.041 Messproben *Brassica napus* mit Pflanzengewichten $> 1,15$ g

Um eine sichere Abgrenzung der Aussageunsicherheiten von Messproben und Kontrollproben zu erreichen, bedarf es einer Abschätzung der Aussagesicherheit sowohl bei der Messung der Messproben als auch bei den Kontrollen.

6.2 Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung

Der Test ist mit seiner langen Dauer sowie dem hohen Pflegebedarf zwar aufwändig, aber die Paralleluntersuchung von 20 Kontrollen und Prüfproben erzeugt eine vergleichsweise

hohe Aussagesicherheit. Um die Aussagesicherheit der Untersuchung an einen konkreten Zahlenwert von 95% zu knüpfen, wird analog zu den anderen Testverfahren folgende Vorgehensweise vorgeschlagen:

1. Wirkschwelle $WS < MW_{\text{Kontrollen}} - 3 \cdot \sigma_K$
2. Der Messwert sollte die Wirkschwelle um $2 \cdot \sigma_M$ überschreiten.

Darüber hinaus sollte auch im Pflanzentest im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse darauf geachtet werden, dass eine Dosis-Wirkungs-Beziehung der Prüfproben erkennbar wird.

6.3 Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen

Auch für den Pflanzentest wird ein Beispiel visuell vorgestellt.

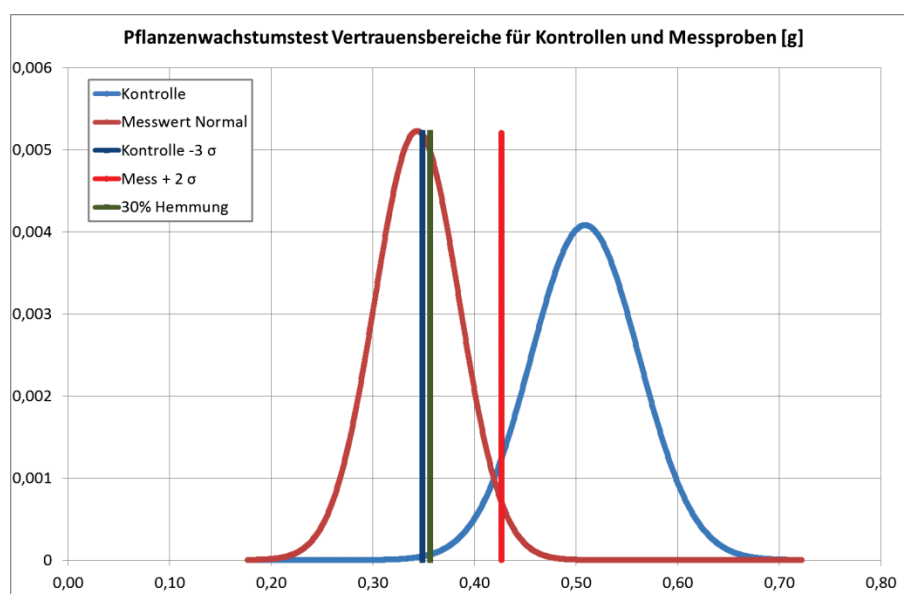


Abbildung 32: Varianzanalytische Beurteilung eines Pflanzenwachstumstests, beispielhaft

Hier handelt es sich um einen Versuch mit nur vier Replikaten. Das Pflanzengewicht der Kontrolluntersuchungen ist mit 0,51 g relativ gering, der CV des Mittelwertes liegt bei 0,1. Die aus der Varianzanalyse ermittelte Wirkschwelle fällt nahezu mit der auf 30% festgesetzten Wirkschwelle zusammen.

Der Mittelwert der Messreihe liegt mit 0,34 g zwar unterhalb beider Wirkschwellen, aber der Variationskoeffizient der Messreihe ist mit 0,12 zu groß, um eine Aussagesicherheit von 95% zu gewährleisten.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die Veränderungen vor dem Hintergrund der neuen Beurteilungsstrategie in der Übersicht.

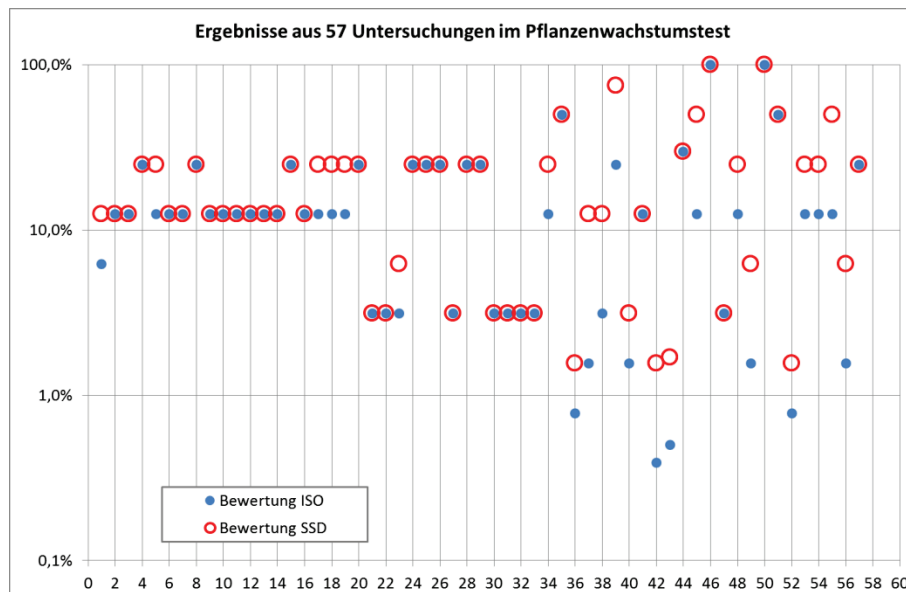


Abbildung 33: Übersicht Pflanzenwachstumstest Ergebnisse gemäß ISO 11269 -2 und Auswirkungen bei veränderter Evaluation (95%-Werte)

Für die Daten aus dem Ringtest (im Bild rechts) zeigen sich recht deutliche Veränderungen. Dies ist im Wesentlichen darauf zurückzuführen, dass hier nur mit 4 Replikaten gearbeitet worden ist.

Insgesamt werden 7 von 57 Ergebnissen (12,3%) verändert. Sie finden sich nahezu ausschließlich im Bereich der Ringtests. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung ist trotz der teilweise recht großen Differenzen im Bereich der Kontrolluntersuchungen nur in 5 Untersuchungen (8,8%) nicht darstellbar. In 43 Untersuchungen (75,4%) ist eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennbar.

7 Regenwurmfluchttest

Die Durchführung des Regenwurmfluchttests ist in der ISO 17512-1 aus dem Jahre 2007 definiert. Zum Einsatz kommt eine Substratmenge von je 250 g Trockengewicht auf der Kontrollseite wie auf der Testseite. Pro Verdünnungsstufe werden fünf Replikate (= Testgefäße mit jeweils 10 adulten Regenwürmern) eingesetzt.

7.1 Ergebnisse

Für den Regenwurmfluchttest liegen bis dato 44 Versuche bei unterschiedlichen Konzentrationen vor. Über die verschiedenen Konzentrationsstufen sind insgesamt 210 Kontrolluntersuchungen verfügbar.

Für einen Regenwurm handelt es sich aufgrund der flächengleichen Teilfelder um eine dichotome 50%-Entscheidung, in welchem Teilfeld des Untersuchungsraumes er sich aufhält. In der Tat zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine klare Korrelation mit einer Binomialverteilung:

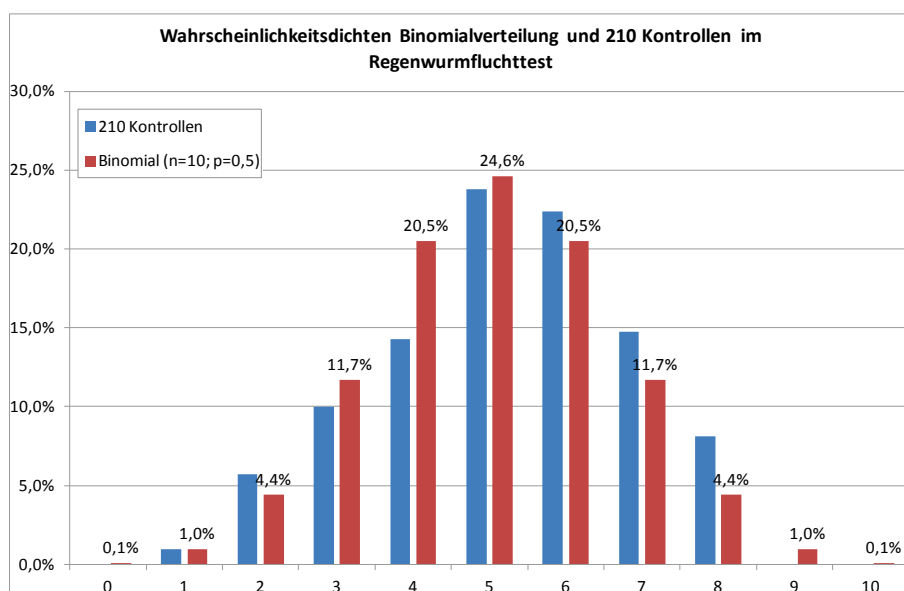


Abbildung 34: Wahrscheinlichkeitsdichten für Binomialverteilung ($n = 10$, $p = 0,5$) und Verteilungsdichte aus 210 Kontrolluntersuchungen

Die Korrelation der Summenhäufigkeitsverteilungen kann in einem Chiquadrat-Homogenitätstest geprüft werden. Hier ist der Test, ob die Stichproben der Kontrolluntersuchungen einer Binomialverteilung mit $p = 50\%$ entstammen können mit 100% signifikant. Beide Verteilungen zeigen einen Korrelationsfaktor von 99,7%. Es ist demnach davon auszugehen, dass der Erwartungswert für die Wurmzahl in einer Hälfte eines 10er-Sets 5 bzw. im gesamten 50er-Set 25 ist.

7.2 Bewertung des Testdesigns und Vorschläge zur messtechnischen Optimierung

Mit der angewandten Zählmethode bleiben stets 5 Würmer unberücksichtigt, da von ihnen angenommen wird, dass sie sich ohnehin im OECD-Bereich aufhalten. Jeder gezählte Wurm macht damit 20% aus. Aus den 5 Replikaten wird der Mittelwert gebildet. Faktisch bedeutet dies, dass ein Test dann negativ bewertet wird, wenn 35 der insgesamt 50 Testwürmer sich auf der OECD-Seite aufhalten. Dann haben 40% von ursprünglich 25

Würmern auf der kontaminierten Seite ihren Standort in den unkontaminierten Bereich verlagert. Insgesamt 70% aller Würmer müssen sich zum Messzeitpunkt im unkontaminierten Bereich befinden. Im Rahmen des UBA 25-Projektes wurde bereits diskutiert, dass die Wirkschwelle sehr niedrig liegt und vorgeschlagen, dass der Test dann als negativ einzustufen ist, wenn sich zum Messzeitpunkt mehr als 90% aller Würmer im unkontaminierten Bereich aufhalten.

Vor dem Hintergrund der hier vorgeschlagenen varianzanalytischen Beurteilungsstrategie ist auch diese Untersuchung neu zu bewerten. Für das gesamte 50er Set ergibt sich die Standardabweichung zu:

$$\sigma_{\text{Binomial}50} = \sqrt{n \cdot p \cdot (1-p)} = \sqrt{50 \cdot 0,25} = 3,5$$

Der Variationskoeffizient liegt bei einem Wert von 0,14.

In einem 10er-Set für Erwartungswert von 5 errechnet sich eine Standardabweichung von:

$$\sigma_{\text{Binomial}10} = \sqrt{n \cdot p \cdot (1-p)} = \sqrt{2,5} = 1,58$$

Dies bedeutet einen Variationskoeffizienten von 0,316. Im Rahmen der zweifachen Standardabweichung treten demnach in einem 10er Kontrollset Werte zwischen 2 und 8 auf, was bedeutet, dass die hier betrachtete Abweichung vom Erwartungswert im Rahmen der zweifachen Standardabweichung von -60% bis +60% schwankt.

Als Bezugsgröße für die Vergleichsmessung eignet sich ein derart schwankender Wert nicht. Aber er ist dennoch wichtig, um nachzuweisen, dass sich die Kontrolluntersuchung schlüssig in den Rahmen der Binomialverteilung mit der Aufenthaltswahrscheinlichkeit $p = 50\%$ einfügt. Das in der Norm genannte Validitätskriterium des Anteils von 50% plus minus 10% bzw. 22,5 bis 27,5 Würmern im 50er-Set erscheint in diesem Zusammenhang theoretisch und ohne Bezug zur Statistik definiert.

Wir schlagen vor, die Beurteilungskriterien

1. Wirkschwelle $WS < MW_{\text{Kontrollen}} - 3 \cdot \sigma_K$
2. Der Messwert sollte die Wirkschwelle um $2 \cdot \sigma_M$ überschreiten.

auch für den Regenwurmfluchttest in Anwendung zu bringen.

Die dreifache Standardabweichung einer binomialverteilten Zufallsgröße mit $p = 50\%$ für $n = 50$ Versuche führt auf einen Wert von 14,4. Aufgerundet müssen demnach 11 Würmer den kontaminierten Bereich verlassen, um mit 99,8% Aussagesicherheit eine Wirkung nachzuweisen. Die durch das Messsystem vorgegebene Wirkschwelle liegt demnach bei 44%.

Darüber hinaus werden die Varianzen der Einzeltests aufgewertet um, testspezifisch die Standardabweichung der Messproben zu bestimmen

7.3 Auswirkungen der vorgeschlagenen Änderungen

Auch für den Regenwurmfluchttest soll ein Versuch im Detail vorgestellt werden. Die Kontrollprobe zeigt 31 Würmer auf der einen sowie 19 Würmer in der anderen Hälfte. Das ist im Rahmen der zu erwartenden Standardabweichung in Ordnung, wäre aber für

einen Nullwertbezug aufgrund der immerhin 24%igen Abweichung vom Erwartungswert ungeeignet

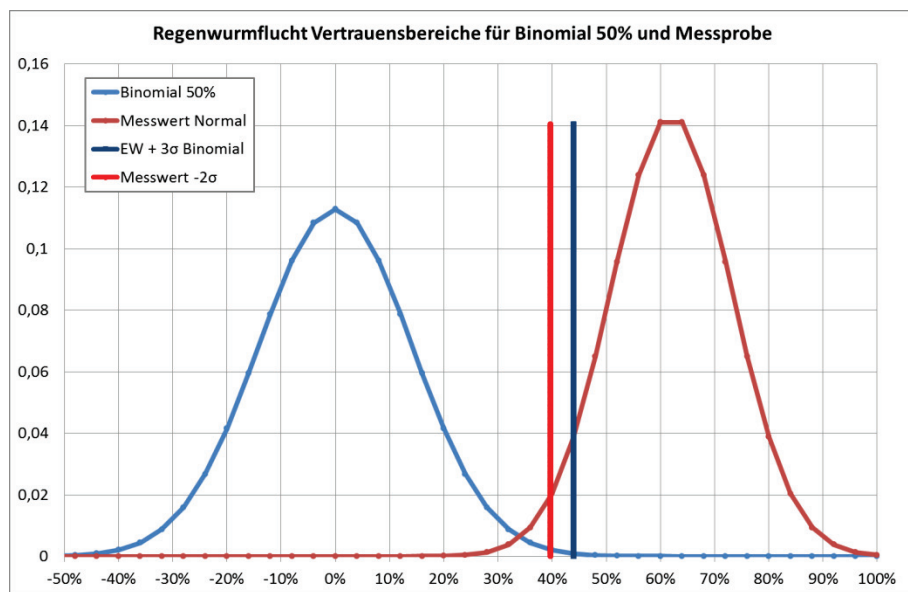


Abbildung 35: Varianzanalytische Beurteilung eines Regenwurmfluchttests, beispielhaft

Der Mittelwert der Messreihe liegt mit 62% (15,5) geflohener Würmer ausgesprochen hoch. Lediglich 9,5 Würmer (3/1/1/3,5/1) sind im kontaminierten Bereich verblieben. Dennoch wird die angestrebte Aussagesicherheit von 95% nicht erreicht.

Mit der Umsetzung der varianzanalytischen Beurteilungsstrategie verändern sich die ursprünglichen Beurteilungen wie folgt (Abbildung 36).

Die Auswirkungen auf die Testbeurteilung sind nicht unerheblich. In 21 von 44 Untersuchungen (47,7%) wird das Ergebnis verändert. Eine Dosis Wirkungsbeziehung ist in 34 von 44 (77,3%) Untersuchungen darstellbar. 9 Untersuchungen (20,5%) zeigen widersprüchliche Zusammenhänge.

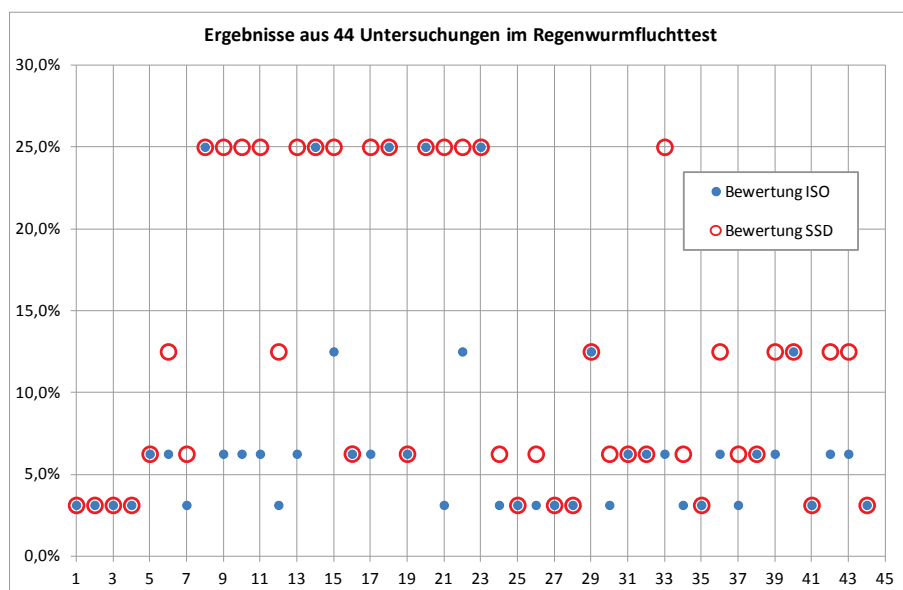


Abbildung 36: Übersicht Regenwurmfluchttest Ergebnisse gemäß ISO 17512-1 und Auswirkungen bei veränderter Evaluation (95%-Werte)

8 Schlussfolgerungen und Empfehlungen

Die Evaluation der vorliegenden Testergebnisse unter der Anwendung der statistischen Basisanforderungen:

1. Die Wirkschwelle (WS) definiert sich aus den Werten der im Originalversuch eingesetzten Kontrollproben. Die wird definiert als Mittelwert der Kontrollen minus drei Standardabweichungen des Mittelwertes
2. Eine Prüfprobe wird dann als signifikant (einseitig 95%) wirksam betrachtet, wenn der mittlere Messwert (MWM) die Wirkschwelle um 2 Standardabweichungen des Messprobenmittelwertes überschreitet.

ist für alle betrachteten Testsysteme möglich.

Die vorliegenden Mehrfachuntersuchungen von Kontrollproben und Messproben ermöglichen es für den Algentest, den Pflanzenwachstumstest und den Bakterienkontakttest, die Vertrauensbereiche für beide Messreihen darzustellen und miteinander abzugleichen.

Für die statistische Absicherung des Daphnientestes bedarf es entweder der Ermittlung der natürlichen Immobilität oder aber der Heranziehung einer hohen Wirkschwelle, um eine aussagesichere Messung zu gewährleisten.

Beim Regenwurmfluchttest erfolgt die Messung im Vergleich zu einer Binomialverteilung, wobei parallel abzusichern ist, dass die Kontrolluntersuchungen einer Binomialverteilung genügen.

Damit können die Mehrfachuntersuchungen in den biologischen Testsystemen genutzt werden, um mit einer vorgegebenen Aussagesicherheit von 95% Beurteilungen zur Wirkung von Abfallgemischen auf die Testsysteme vorzunehmen.

Da nicht bekannt ist, inwieweit alle „wirksamen Parameter“ der zu untersuchenden Grundgesamtheit in der eingesetzten Analysenprobe mit einer hinreichenden Repräsentativität abgebildet werden, wird empfohlen, bei der Untersuchung von Verdünnungsreihen als Kriterium für die Repräsentativität der Analysenprobe auf die schlüssige Darstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung zu achten.

Sollten die Ergebnisse von Paralleluntersuchungen keine reproduzierbaren Ergebnisse liefern, so könnte dies daran liegen, dass die Wirkparameter in der untersuchten Analysenprobe nicht repräsentativ abgebildet werden können.

In solchen Fällen ist zu überlegen, wie die stochastischen Schwankungen der Untersuchungsprobe abgesichert werden können.

Während dies in den terrestrischen Tests nur durch weitere Paralleluntersuchungen zu erreichen ist, bietet sich in den aquatischen Systemen an, bei schlechter Reproduzierbarkeit mehrere Eluate parallel anzusetzen und nach der Elution zu vermischen.

9 Literatur

- Brands 1983: Theorie der Probenahme in: Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie 314, 6-12.
- Büll 2006: Sortieranaysen für die Bestimmung der stofflichen Zusammensetzung fester Abfälle. In: Müllhandbuch digital. Berlin: Erich-Schmidt-Verlag GmbH & Co. 2008
- DIN 2009: DIN 19747 Untersuchung von Feststoffen – Probenvorbehandlung, -vorbereitung und –aufarbeitung für chemische, biologische und physikalische Untersuchungen. Berlin: Beuth-Verlag, Juli 2009
- DIN EN 2011: DIN EN 15442 Feste Sekundärbrennstoffe – Verfahren zur Probenahme. Berlin: Beuth-Verlag Mai 2011
- EPA 2003: Guidance for Obtaining Representative Laboratory Analytical Subsamples from Particulate Laboratory Samples. United States Environmental Protection Agency: EPA/600/R-03/027 November 2003
- European Commission 2004: Methodology for the Analysis of Solid Waste (SWA-Tool) – User Version, Final report of the project “SWA-Tool, Development of a Methodology to Enhance the Precision and Comparability of Solid Waste Data” Brussels: 2004
- Flamme 2009: Analyse der Schwermetallgehalte von Ersatzbrennstoffen – 1678. In: Müllhandbuch digital, MuA Lfg. 1/09. Berlin: Erich Schmidt Verlag GmbH & Co.
- Furtmann 2003: Stand der Abfallanalytik. In: Müllhandbuch digital. Berlin: Erich-Schmidt-Verlag GmbH & Co. 2008
- Gy 2004: Sampling of discrete materials – a new introduction to the theory of sampling. Part I and II. In: Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 74 (2004), 7 – 38
- ISO 6341. 1996, 2010. Water quality - Determination of the inhibition of mobility of *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. Geneva.
- ISO 8692, 2012. Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Desmodesmus subspicatus* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. Geneva.
- ISO 11269-2, 2012. Soil quality – Determination of the Effects of Pollutants on Soil Flora. Part II: Effects of Chemicals on the Emergence and Growth of Higher Plants. Geneva.
- ISO 17512-1, 2007. Soil Quality - Avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals. Test with Earthworms (*Eisenia fetida/andrei*). Geneva.
- ISO 18187, 2012. Soil quality – Quality of solid samples – Solid contact test using the dehydrogenase activity of *Arthrobacter globiformis*. Geneva.
- LAGA 2004: Richtlinie für das Vorgehen bei physikalischen, chemischen und biologischen Untersuchungen in Zusammenhang mit der Verwertung / Beseitigung von Abfällen. - LAGA PN 98, Stand: Dez. 2001 - Grundregeln für die Entnahme von Proben aus festen und stichfesten Abfällen sowie abgelagerten Materialien. Länderarbeitsgemeinschaft Abfall (Hrsg). Berlin, Bielefeld München: Erich Schmidt Verlag
- LfUG 1998: Richtlinie zur einheitlichen Abfallanalytik in Sachsen Teile I, II und III: Sächsisches Landesamt für Umwelt und Geologie. April 1998

<http://www.umwelt.sachsen.de/de/wu/umwelt/lfug/lfug-inter-net/SabfaWeb/sabfaweb-nt/>

Rasemann 2005: Handbuch Probenahme und Qualitätssicherung bei der Untersuchung und Bewertung von Stoffsystemen, Institut für Qualitätssicherung von Stoffsystemen Freiberg e.V.

Römbke, J., Moser, TH. & Moser, H. 2009: Ecotoxicological characterization of 12 incineration ashes (MWI) using 6 laboratory tests. Waste Management 29: 2475-2482.

Rotter et al. 2003: Rotter, S.; Kost, T.; Bilitewski, B.; Kock, O.; Seeger, H.; Urban, A. 2003: Abfallanalysen - Anwendung, Probleme und neue Wege für die Praxis In: Müll und Abfall 9/2003, S. 438 ff.

Skutan 2009: Ausreißer als Indikator einer fehlerhaften EBS-Analytik In: Bilitewski, B. et al: EBS-Analytik 2. Beiträge zur Abfallwirtschaft / Altlasten Band 60, Dresden

TAUW 2005: Pre-normative research on SRF Report for ERFO. Deventer. 13.09.2005.
http://erfo.info/fileadmin/user_upload/erfo/documents/standardisation/Final_report_Prenormative_research_on_solid_recovered_fuel.pdf