

VEREIN  
DEUTSCHER  
INGENIEUREBiologische Verfahren zur Erfassung von  
Umweltbelastungen (Bioindikation)

Fische als Wirkungsindikatoren

Biological procedures to determine  
environmental impact (bioindication)

Fish as effect indicators

VDI 4230

Blatt 5 / Part 5

Ausz. deutsch/englisch  
Issue German/English

*Der Entwurf dieser Richtlinie wurde mit Ankündigung im Bundesanzeiger einem öffentlichen Einspruchsverfahren unterworfen.*

*Die deutsche Version dieser Richtlinie ist verbindlich.*

*The draft of this standard has been subject to public scrutiny after announcement in the Bundesanzeiger (Federal Gazette).*

*The German version of this standard shall be taken as authoritative. No guarantee can be given with respect to the English translation.*

Inhalt	Seite	Contents	Page
Vorbemerkung . . . . .	2	Preliminary note . . . . .	2
Einleitung . . . . .	2	Introduction . . . . .	2
<b>1 Anwendungsbereich . . . . .</b>	<b>3</b>	<b>1 Scope . . . . .</b>	<b>3</b>
<b>2 Begriffe . . . . .</b>	<b>4</b>	<b>2 Terms and definitions . . . . .</b>	<b>4</b>
<b>3 Grundlagen . . . . .</b>	<b>5</b>	<b>3 Background . . . . .</b>	<b>5</b>
3.1 Monitoringstrategien . . . . .	5	3.1 Monitoring strategies . . . . .	5
3.2 Referenzen . . . . .	6	3.2 References . . . . .	6
3.3 Fischarten . . . . .	12	3.3 Fish species . . . . .	12
3.4 Anzahl und Auswahl der Individuen . . . . .	15	3.4 Number and selection of the individuals . . . . .	15
3.5 Probenahme . . . . .	17	3.5 Sampling procedure . . . . .	17
<b>4 Geeignete Biomarker . . . . .</b>	<b>24</b>	<b>4 Suitable biomarkers . . . . .</b>	<b>24</b>
4.1 Allgemeiner Gesundheitszustand . . . . .	24	4.1 General health status . . . . .	24
4.2 Endokrine Wirkungen . . . . .	43	4.2 Endocrine effects . . . . .	43
4.3 Gentoxische Wirkungen . . . . .	50	4.3 Genotoxic effects . . . . .	50
4.4 Biotransformation . . . . .	60	4.4 Biotransformation . . . . .	60
4.5 Reproduktionstoxische Wirkungen . . . . .	65	4.5 Reproductive toxic effects . . . . .	65
4.6 Neurotoxische Wirkungen . . . . .	73	4.6 Neurotoxic effects . . . . .	73
4.7 Metallspezifische Wirkungen . . . . .	75	4.7 Effects specific to metals . . . . .	75
<b>5 Qualitätssicherung und Dokumentation . . . . .</b>	<b>83</b>	<b>5 Quality assurance and documentation . . . . .</b>	<b>83</b>
Schrifttum . . . . .	83	Bibliography . . . . .	83

VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) – Normenausschuss

Fachbereich Umweltqualität

VDI-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 1a: Maximale Immissions-Werte

### **Vorbemerkung**

Der Inhalt dieser Richtlinie ist entstanden unter Beachtung der Vorgaben und Empfehlungen der Richtlinie VDI 1000.

Alle Rechte, insbesondere die des Nachdrucks, der Fotokopie, der elektronischen Verwendung und der Übersetzung, jeweils auszugsweise oder vollständig, sind vorbehalten.

Die Nutzung dieser Richtlinie ist unter Wahrung des Urheberrechts und unter Beachtung der Lizenzbedingungen ([www.vdi.de/richtlinien](http://www.vdi.de/richtlinien)), die in den VDI-Merkblättern geregelt sind, möglich.

Allen, die ehrenamtlich an der Erarbeitung dieser Richtlinie mitgewirkt haben, sei gedankt.

Eine Liste der aktuell verfügbaren Blätter dieser Richtlinienreihe ist im Internet abrufbar unter [www.vdi.de/4230](http://www.vdi.de/4230).

### **Einleitung**

Diese Richtlinie soll als Teil eines umfassenden Richtlinienwerks (VDI 4230 Blatt 2 bis Blatt 4) standardisierte Methoden zum effektbasierten Biomonitoring zur Verfügung stellen. Insbesondere mit der Richtlinie VDI 4230 Blatt 4 wurde bereits eine wichtige Grundlage geschaffen. In dieser werden gemäß dem klassischen Ansatz umweltanalytischer Untersuchungen, durch die Konzentrationen chemischer Stoffe bestimmt werden, Aussagen zur Exposition und Anreicherung von Umweltchemikalien gemacht. Biologische Wirkungen lassen sich damit allerdings nicht darstellen. Die Frage nach der Kausalität (Ursache – Wirkung) bleibt deshalb genauso unbeantwortet wie diejenige nach der Relevanz bioverfügbarer Schadstoffe für Lebewesen und dem mit der Exposition verbundenen Risiko. Zur umfassenden Bewertung der Auswirkungen von Schadstoffen ist es daher notwendig, eine Verknüpfung zwischen Exposition und Wirkung herzustellen. Deshalb ist es naheliegend, aufbauend auf VDI 4230 Blatt 4, eine weitere Richtlinie zu erstellen, in der die biologische Wirkung von chemischen Substanzen im Vordergrund steht, in der also Fische als Wirkungsindikatoren betrachtet werden. Die Notwendigkeit solcher wirkungsbezogenen Analysen zur Beurteilung von ökosystemaren Effekten von Schadstoffen besteht auch im Rahmen der Umsetzung der Richtlinie 2000/60/EG (Wasserrahmenrichtlinie – WRRL). Die EU hat einen Leitfaden für die Anwendung von effektbasierten Monitoringmethoden herausgegeben [1], der die Bedeutung dieser Methoden in Bezug auf die Zielerreichung gemäß WRRL und der damit verbundenen Richtlinien beschreibt. Darin werden überblicksartig Bio-Assays und Biomarker für

### **Preliminary note**

The content of this standard has been developed in strict accordance with the requirements and recommendations of the standard VDI 1000.

All rights are reserved, including those of reprinting, reproduction (photocopying, micro copying), storage in data processing systems and translation, either of the full text or of extracts.

The use of this standard without infringement of copyright is permitted subject to the licensing conditions specified ([www.vdi.de/richtlinien](http://www.vdi.de/richtlinien)) in the VDI Notices.

We wish to express our gratitude to all honorary contributors to this standard.

A catalogue of all available parts of this series of standards can be accessed on the Internet at [www.vdi.de/4230](http://www.vdi.de/4230).

### **Introduction**

This standard provides standardised methods for effect-based biomonitoring as part of a comprehensive set of standards (VDI 4230 Part 2 to Part 4). An important foundation has already been laid, in particular, with standard VDI 4230 Part 4. In this standard, statements are made on exposure to, and accumulation of, environmental chemicals based on the classical approach taken by environmental analytical studies used to determine the concentrations of chemical compounds. However, biological impacts cannot be illustrated using this approach. The question of causality (cause – effect) therefore remains unanswered, as does the question on the relevance of pollutants that are biologically available for organisms and the risk associated with exposure. A comprehensive evaluation of the effects of pollutants therefore requires a link to be established between exposure and effect. It therefore seems natural to compile a further standard that is based on standard VDI 4230 Part 4 and focuses on the biological impacts of chemical substances, where fish are therefore regarded as effect indicators. The requirement for such analyses on impacts for the evaluation of the effects of pollutants on ecosystems is also laid down within the scope of the implementation of the Water Framework Directive 2000/60/EC (WFD). The EU has published a guideline on the use of effect-based monitoring methods [1] that gives a description of the relevance of these methods in relation to achieving the aims pursuant to WFD and its associated directives. This provides an overview of bioassays and biomarkers for all groups of organisms and ecological indicators at bioecoenosis level and - as the Marine Strategy Frame-

alle Organismengruppen und ökologische Indikatoren auf Lebensgemeinschaftsniveau dargestellt und – da auch auf die Meeresstrategie-Rahmenrichtlinie 2008/56/EG Bezug genommen wird – Analysemethoden für marine Organismen einbezogen.

Wie in VDI 4230 Blatt 4 steht auch in der vorliegenden Richtlinie im Vordergrund, welche Voraussetzungen und Bedingungen bei der Probenahme zu berücksichtigen sind, um die zu den entsprechenden biologischen Messverfahren passenden Proben zur Verfügung zu haben.

Für effektbezogene Biomonitoringstudien im Freiland sind in ISO 23893-1 die bisher einzigen Standards für den wichtigen Bereich der Probenahme definiert. Allerdings sind diese sehr stark auf die skandinavischen Gegebenheiten, den Einsatz der beiden Indikatorarten Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) und Aalmutter (*Zoarces viviparus*) sowie nur auf wenige Biomarker (z.B. EROD (Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase), Metallothionein und Vitellogenin) abgestimmt. Die vorliegende Richtlinie behandelt dagegen ein wesentlich breiteres Spektrum an Biomarkern, umfasst deutlich mehr für Biomarkeruntersuchungen geeignete Fischarten und ist damit in einem größeren Kontext und einem geografisch sehr viel größeren Raum anwendbar. Darüber hinaus listet sie die in Bezug auf die Probenahme spezifischen Anforderungen für jeden behandelten Biomarker auf und gibt Empfehlungen, welche Sets von Biomarkern für entsprechende Fragestellungen geeignet sind. Damit geht die vorliegende Richtlinie weit über die Standards der ISO 23893-1 hinaus.

## 1 Anwendungsbereich

Die Richtlinie beschreibt Methoden zur Erfassung chronischer Wirkungen von Stressoren bei Fischen als Indikatoren für den Gütezustand von Gewässern. Dabei ist die Probenahme von zentraler Bedeutung und bedarf einer Standardisierung in vielen Bereichen, um

- Artefakte zu verhindern,
- den Verlust biologischer Informationen zu minimieren,
- die hohe Variabilität biologischer Proben zu minimieren und damit
- Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der gewonnenen Proben und Daten zu gewährleisten.

Es werden Standards für eine reproduzierbare und repräsentative Probenahme vorgegeben und ein Set von Endpunkten (Untersuchungsparametern) für mögliche Fragestellungen im Bereich der Wirkungsuntersuchungen empfohlen. Dadurch soll möglichst um-

work Directive 2008/56/EC is also referred to - analytical methods for marine organisms.

As is also the case in standard VDI 4230 Part 4, the focus of the current standard is on the requirements and conditions that shall be considered during sampling to ensure that samples are available that are suitable for the relevant biological measurement methods.

The only standards that have been defined to date for the important field of sampling in effect-related biomonitoring studies in the field are given in ISO 23893-1. However, these are heavily based on Scandinavian conditions, the use of the two indicator species European perch (*Perca fluviatilis*) and European eelpout (*Zoarces viviparus*), as well as only on a few biomarkers (e.g. EROD (ethoxyresorufin-*O*-deethylase), metallothionein, and vitellogenin). In contrast, the current standard enters into a significantly broader spectrum of biomarkers, covers a far greater number of fish species that are suitable for studies with biomarkers, and can thus be used in a broader context and across a far larger geographical area. In addition, it lists the specific requirements in relation to sampling for each biomarker that is covered in this standard, and gives recommendations on which sets of biomarkers are suitable for answering corresponding questions. The current standard thus goes far beyond the standards given in ISO 23893-1.

## 1 Scope

This standard describes methods for documenting the chronic effect of stressors on fish as indicators for the quality of water bodies. Sampling is of crucial importance to this process and requires standardisation in many areas to

- avoid artefacts,
- minimise the loss of biological information,
- minimise the high variability of biological samples, and to thus
- ensure the reproducibility and comparability of the samples and data that are obtained.

Standards are defined for reproducible and representative sampling, and a set of endpoints (test parameters) is recommended for potential questions in the field of effect studies. This is designed to provide a description of the health of fish as an indicator for the

fassend der Gesundheitszustand von Fischen als Indikator des Gewässer- und Umweltzustands beschrieben werden. Methoden, deren Einsatz im Biomonitoring mit Fischen bislang noch nicht ausreichend etabliert ist, bleiben hierbei unberücksichtigt (z.B. Omics-Techniken, Methoden zum Nachweis von Multixenobiotic Resistance oder Lysosomeninstabilität).

Bei einmaliger, kurzzeitiger Schadstoffexposition treten Effekte erst bei höheren Konzentrationen auf (akute Toxizität) als bei länger andauernder Exposition (chronische Toxizität). Um den aquatischen Lebensraum nachhaltig zu schützen, steht die chronische Toxizität im Fokus dieser Richtlinie. Denn heutzutage sind im Allgemeinen chronische Belastungen in aquatischen Lebensräumen von größerer Bedeutung als akute Expositionen (Unfälle), die in der Regel zum Tod der exponierten Organismen führen. Es ist zu beachten, dass Untersuchungen zu Schadstoffwirkungen mithilfe von Biomarkern generell nicht an bereits verendeten Organismen durchgeführt werden können.

Im Biomonitoring ist der Einsatz lebender Tiere nach heutigem Wissensstand noch unumgänglich, um die Gesundheit von Mensch und Tier sowie die Umwelt zu schützen. Langfristiges Ziel ist es jedoch, für Untersuchungen an lebenden Tieren in der Umweltüberwachung Ersatzmethoden (z.B. In-vitro-Verfahren) zu finden. Einen Rahmen für die Güterabwägung in diesem Zielkonflikt bietet die europäische Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (Richtlinie 2010/63/EU). Ersatzmethoden für Untersuchungen an lebenden Tieren sind jedoch nicht Gegenstand der hier vorliegenden Richtlinie.

condition of the water bodies and environment that is as comprehensive as possible. Methods that are not yet sufficiently well established in biomonitoring with fish are not considered here (e.g. omics techniques, methods used to determine multixenobiotic resistance or lysosome instability).

In comparison to long-term exposure (chronic toxicity), effects only occur at higher concentrations (acute toxicity) in cases of one-off, short-term exposure to pollutants. This standard focuses on chronic toxicity, to ensure the sustainable protection of aquatic habitats. The reason for this is that chronic pollution of aquatic habitats is now generally of greater importance than acute exposure (accidents), which usually results in the death of the organisms that are exposed. Please note that studies conducted on the impact of pollutants using biomarkers can generally not be carried out on organisms that are already dead.

Based on current knowledge, the use of live animals is still indispensable to biomonitoring, to ensure that the health of humans and animals, as well as that of the environment, are protected. However, the long-term aim is to find replacement methods (e.g. in-vitro methods) for environmental monitoring studies conducted on live animals. The European directive on the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/EU) provides a framework for the weighing up these conflicting goals. However, replacement methods for studies on live animals are not the subject of the current standard.