

TEXTE

51/2012

Untersuchungen suble- tler Endpunkte an Dung- organismen im Rahmen des Vollzugs des Arznei- mittelgesetzes

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT

Forschungskennzahl 360 14 007
UBA-FB 001665

Untersuchungen subletaler Endpunkte an Dungorganismen im Rahmen des Vollzugs des Arzneimittelgesetzes

von

Dr. J. Römbke, A. Scheffczyk
ECT Oekotoxikologie GmbH, Försheim

Dr. W. Blanckenhorn
Zoologisches Museum, Universität Zürich-Irchel, Schweiz

Dr. J-P. Lumaret
Universität Montpellier, Frankreich

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

UMWELTBUNDESAMT

Diese Publikation ist ausschließlich als Download unter <http://www.uba.de/uba-info-medien/4360.html> 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 Böttgerstr. 2-14 65439 Flörsheim
Abschlussdatum:	Oktober 2010
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 IV 2.2 Arzneimittel Dr. Nicole Adler

Dessau-Roßlau, Oktober 2012

1. Berichtsnummer FKZ 360 14 007	2.	3.
4. Titel des Berichts Investigations of sublethal endpoints in tests with dung organisms as part of the execution of the in the context of the German Medicines Law		
5. Autor(en) (Name, Vorname(n)) Römbke, Jörg, Blanckenhorn, Wolf, Lumaret, Jean-Pierre & Scheffczyk, Adam		6. Abschlussdatum des Vorhabens 31.10.2010
		7. Veröffentlichungsdatum
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) ECT Oekotoxikologie GmbH Böttgerstr. 2-14, D-65439 Flörsheim am Main		9. UFOPLAN-Nr.
		10. Seitenzahl 40
		11. Literaturangaben 35
12. Fördernde Institutionen (Name, Adresse) Federal Environmental Agency Wörlitzer Platz 1, D-06844 Dessau-Roßlau		13. Tabellen 7
		14. Abbildungen 16
15. Zusätzliche Angaben		
16. Kurzfassung Aim of this project was the compilation and publication of the results of the Aveiro-Group as well as the further improvement of existing laboratory tests with dung beetles and dung flies. In the theoretical part publications were finished or prepared: first, recommendations for the preparation, performance and assessment of field studies with dung organisms, second, and in close co-operation with the sponsor, an improved testing strategy for the assessment of veterinary pharmaceuticals. In the practical part it was tried to identify a second dung beetle species for standardised laboratory tests, belonging to the ecological group of „tunnelers“. However, it was not possible to establish laboratory cultures with the species <i>Euoniticellus intermedius</i> and <i>Euoniticellus fulvus</i> . In contrast, two new test methods with the established test species <i>Aphodius constans</i> were developed. They have been successfully proved using Ivermectin and Moxidectin. Both in the Elongated Larvae Test as well as in the Adult Reproduction Test an increased sensitivity was found in comparison to the established OECD Larvae Test; by a factor of two for Ivermectin but less for Moxidectin. In addition, 15 dung fly species belonging to the family Sepsidae were tested (with up to eight different populations), using a modified version of the existing OECD test guideline and ivermectin as a model substance. The sensitivity of the dung flies differed strongly, both within as well as between species. Acute and sublethal endpoints could be established. Starting with the experiences made in this project detailed recommendations have been made: first, for further development of the testing strategy with veterinary pharmaceuticals and dung organisms; second, for the implementation of sublethal tests with dung beetles and additional dung fly species. One outcome based on these recommendations is the recent start of a ring test using the dung beetle species <i>Onthophagus nuchicornis</i> .		
17. Schlagwörter Dung beetles, Dung flies, Sepsidae, Ivermectin, Moxidectin, Laboratory test, field test, test strategy		
18.	19.	20.

1. Berichtsnummer FKZ 360 14 007	2.	3.
4. Titel des Berichts Untersuchungen sublethaler Endpunkte an Dungorganismen im Rahmen des Vollzugs des Arzneimittelgesetzes		
5. Autor(en) (Name, Vorname(n)) Römbke, Jörg, Blanckenhorn, Wolf, Lumaret, Jean-Pierre & Scheffczyk, Adam		6. Abschlussdatum des Vorhabens 31.10.2010
		7. Veröffentlichungsdatum
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) ECT Oekotoxikologie GmbH Böttgerstr. 2-14, D-65439 Flörsheim am Main		9. UFOPLAN-Nr.
		10. Seitenzahl 40
		11. Literaturangaben 35
12. Fördernde Institutionen (Name, Adresse) Federal Environmental Agency Wörlitzer Platz 1, D-06844 Dessau-Roßlau		13. Tabellen 7
		14. Abbildungen 16
15. Zusätzliche Angaben		
16. Kurzfassung Ziel dieses Vorhabens war die Zusammenfassung und Verbreitung der Ergebnisse der Aveiro-Gruppe sowie die Weiterentwicklung bestehender Labortests mit Dungkäfern und Dungfliegen. Im theoretischen Teil wurde eine Publikation mit Empfehlungen zur Vorbereitung, Durchführung und Auswertung von Freilandtests mit Dungorganismen fertig gestellt. Zudem wird gegenwärtig eine zweite Publikation in enger Absprache mit dem Auftraggeber zur Einreichung vorbereitet, bei der es um eine verbesserte Teststrategie bei der Bewertung von Veterinärpharmaka geht. Im praktischen Teil wurde versucht, eine zweite, für die Durchführung standardisierter Tests geeignete Dungkäferspezies aus der ökologischen Gruppe der „Tunneler“ zu identifizieren. Entsprechende Versuche zur Etablierung von Zuchten mit den Arten <i>Euoniticellus intermedius</i> und <i>Euoniticellus fulvus</i> führten nicht zum Ziel. Dagegen konnten zwei neue Testverfahren für die Art <i>Aphodius constans</i> entwickelt und mit den beiden Substanzen Ivermectin und Moxidectin erfolgreich angewandt werden. Im verlängerten Larven- sowie im Reproduktions-Adulttest wurde eine um den Faktor 2 höhere Empfindlichkeit bei Ivermectin, nicht aber für Moxidectin gegenüber dem herkömmlichen OECD-Larventest festgestellt. Zusätzlich wurden 15 Dungfliegenarten aus der Familie der Sepsiden, teils aus bis zu acht verschiedenen Populationen stammend, in auf der OECD-Methode basierenden Tests in Hinsicht auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Ivermectin untersucht. Dabei wurde eine je nach Art und Herkunft stark schwankende, oft aber sehr hohen Empfindlichkeit dieser Fliegen festgestellt, wobei verschiedene akute wie sublethale Endpunkte einsetzbar waren. Ausgehend von den in diesem Vorhaben gemachten Erfahrungen konnten sowohl konkrete Vorschläge für eine Weiterentwicklung der Teststrategie von Veterinärpharmaka gegenüber Dungorganismen als auch Empfehlungen für die Einführung sublethaler Tests mit Dungkäfern als auch weiteren Fliegenarten gemacht werden. Eine Konsequenz daraus ist die gegenwärtige Durchführung eines Ringtests mit der Dungkäferart <i>Onthophagus nuchicornis</i> .		
17. Schlagwörter Dungkäfer, Dungfliegen, Sepsiden, Ivermectin, Moxidectin, Labortest, Freilandtest, Teststrategie		
18.	19.	20.

Inhaltsverzeichnis:

1.	Ziele des Sachverständigengutachtens	5
2.	Darstellung der bisher durchgeführten Arbeiten: Teil Theorie	6
2.1.	Veröffentlichungen	6
2.1.1	Manuskript Nr. 1	6
2.1.2	Manuskript Nr. 2	7
2.2	Weitere Öffentlichkeitsarbeit	7
2.3	Richtlinienbetreuung und –entwicklung	8
3.	Darstellung der bisher durchgeführten Arbeiten: Teil Praxis	9
3.1	Tests mit Dungkäfern	9
3.1.1	Auswahl der zu verwendenden Dungkäfer	9
3.1.2	Zucht und Haltung von Dungkäfern der Art <i>Euoniticellus intermedius</i> und <i>Euoniticellus fulvus</i>	10
3.1.3	Charakterisierung der Testspezies <i>Aphodius constans</i>	14
3.1.4	Diskussion der bisher durchgeführten Käfertests	23
3.2	Durchführung der Tests: Dungfliegen	25
3.2.1	Tests mit Sepsiden	25
3.2.2	Tests mit anderen Dungfliegen	32
4.	Zusammenfassung und Ausblick	34
4.1	Zusammenfassung	34
4.2	Ausblick	35
5.	Literaturverzeichnis	37

Danksagung:

Wir danken allen Mitgliedern der Aveiro-Gruppe für die Möglichkeit der Diskussion der in diesem Bericht dargelegten Ideen und Ergebnisse:

Nicole Adler (Deutschland), Jean Bachmann (Deutschland), Luc Bussiere (England), Chuck Eirkson (USA), John Jensen (Dänemark), Ralf Jochmann (Schweiz), Silvio Knäbe (Deutschland), Ute Kryger (Südafrika), Joost Lahr (Niederlande), Keith Wardhaugh (Australien), Kevin Floate (Kanada).

1. Ziele des Sachverständigengutachtens

Aufgabe des Vorhabens ist die Überprüfung des von der „Aveiro-Gruppe“ auf ihren Sitzungen in den Jahren 2007 und 2008 erarbeiteten Prüfprotokolls für „higher-tier tests“ für Dungorganismen in einer Weise, dass dieses (in mehr oder weniger modifizierter Form) in die bestehenden Leitfäden zum europäischen Arzneimittelrecht für Veterinärpharmaka eingearbeitet werden kann. Die wichtigste Änderung auf formaler Ebene war die Verlängerung des ursprünglichen Vorhabens um 15 Monate, d.h. von Anfang Juli 2009 bis Ende September 2010. Grund dieser Verlängerung war primär die Ausweitung des zu testenden Organismenspektrums, da neben den bisher untersuchten Dungkäfern auch Dungfliegen abgedeckt werden sollten. Für diesen Teil der Arbeiten wurde als Unterauftragnehmer Dr. W. Blanckenhorn, Universität Zürich gewonnen, dessen Arbeitsgruppe über große Erfahrungen mit Dungfliegen (Scathophagidae, Sepsidae, Muscidae) verfügt. Im Berichtszeitraum wurden vor allem praktische Tests durchgeführt, wobei sowohl Arbeiten aus dem Labor des Auftragnehmers ECT GmbH als auch parallel dazu erarbeitete Ergebnisse aus dem Labor von Prof. J-P. Lumaret (Universität Montpellier) vorgestellt werden.

Im Einzelnen gliedert sich das Vorhaben (und der Bericht) in einen theoretischen und einen praktischen Teil, deren Ziele sich wie folgt konkretisieren lassen:

Teil Theorie:

- Publikation der Ergebnisse der Arbeitsgruppen 2 und 3 der Aveiro-Gruppe
- Publikation der Ergebnisse der Arbeitsgruppe 1 der Aveiro-Gruppe
- Publikation der Ergebnisse der im Rahmen des Vorhabens durchgeführten praktischen Käfer- und Fliegentests
- Betreuung der Richtlinienentwicklung der OECD.

Teil Praxis:

- Auswahl der für eine Testung am besten geeigneten Dungkäferspezies (inklusive deren Haltung und Zucht)
- Durchführung von sublethalen Tests, primär mit der Art *Aphodius constans*
- Durchführung von nicht-standardisierten Tests mit Fliegenarten aus der Familie der Sepsiden

Die Ergebnisse aus beiden Teilen des Vorhabens sind in Form von Empfehlungen zum weiteren Vorgehen bei der ökotoxikologischen Testung von Veterinärpharmaka zusammen zu fassen.

2. Darstellung der bisher durchgeführten Arbeiten: Teil Theorie

2.1. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse der „Aveiro-Gruppe“ wurden für die Publikation durchgeführt. De facto werden gegenwärtig zwei Manuskripte vorbereitet, die sich wie folgt beschreiben lassen:

2.1.1 Manuskript Nr. 1

Titel: Higher tier test strategy for dung fauna organisms during the authorization process of parasiticides

Autoren: Nicole Adler, Jean Bachmann & Jörg Römbke

Evtl.: Rick Greening, Jennifer Mackie, Tom Hargreaves (Mitglieder der WG2)

Basis: Poster SETAC-Europe Conference Meeting Göteborg 2009
Aveiro-Group Reports 2 and 3; Minutes of the Berlin Workshop

Journal: Integrated Environmental Assessment and Management

Abstract: According to European legislation, an Environmental Risk Assessment (ERA) of veterinary medicinal products (VMPs) for dung fauna is required if the substance acts as a parasiticide for the treatment of pasture animals. However, the demonstration of the environmental safety of those VMPs for dung fauna was strongly hampered by the fact that no standardized tests were available until recently. Therefore, starting with recommendations from the SETAC advisory group DOTTS (Dung Organism Toxicity Test Standardization) test systems for phase II tier A tests on the mortality of dung fly and dung beetle larvae were developed. The dung fly test guideline No. 228 was adopted by OECD on October 2008, while an OECD guidance document for standard laboratory tests with dung beetles will be available in 2009. If a risk is identified for dung organisms in phase II tier A of the ERA process, a higher tier test strategy is required for tier B – but currently no advice is given for those studies in the existent guidelines. Therefore, three workshops took place in 2007/2008 with international dung fauna experts (Aveiro-Group) in order to find an appropriate test strategy for higher tier dung fauna. Possible strategies and potential endpoints were identified and their practicability for routine testing were discussed. Based on this discussion recommendations are given considering different dung species, test compounds and endpoints.

Status: Ein Entwurf liegt vor und wird gegenwärtig durch Vertreter des Auftraggebers kommentiert. Die Einreichung wird noch in diesem Herbst erfolgen.

2.1.2 Manuskript Nr. 2

Titel: Recommendations for designing field studies on the effects of parasiticides on dung organism in the context of regulatory higher testing

Autoren: Ralf Jochmann, Wolf Blanckenhorn, Luc Bussiere, Chuck Eirkson, John Jensen, Silvio Knäbe, Ute Kryger, Joost Lahr, Jean-Pierre Lumaret, Jörg Römbke , Keith Wardhaugh, Kevin Floate

Journal: Intergrated Environmental Assessment and Management

Abstract: To register veterinary medicinal products (VMPs) as parasiticides on pastured animals, legislation in the European Union requires an Environmental Risk Assessment to test the potential non-target effects of faecal residues on dung-dwelling organisms. Products with adverse effects in single-species laboratory tests require further ‘higher-tier’ testing to assess the extent of these effects on entire communities of dung dwelling organisms under more realistic field or semi-field conditions. Currently there are no documents specifically written to assist researchers in conducting higher tier tests, nor to assist regulators in interpreting the results of such tests in an appropriate context. Here we provide such a document written by members of the SETAC Advisory Group DOTTS (Dung Organism Toxicity Testing Standardisation) with research experience on dung fauna in central and southern Europe, Canada, Australia, and South Africa. This document briefly reviews the organisms that comprise the dung community and their role in dung degradation, identifies key considerations in the design and interpretation of experimental studies, and makes recommendations on how to proceed.

Status: Das im April 2010 eingereichte Manuskript befindet sich bei der oben genannten Zeitschrift im Druck. Die dort gemachten Empfehlungen wurden in ein gerade begonnenes UBA-Vorhaben (FKZ 371063412) integriert.

2.2 Weitere Öffentlichkeitsarbeit

Während der SETAC-Europe Tagung in Göteborg (Schweden) im Mai 2009 wurden sowohl die generelle Vorgehensweise als auch Details der Testdurchführung mit Dungkäfern (*A. constans*) in einem Poster vorgestellt (Adler et al. 2009). Eine ähnliche Darstellung erfolgte, auch als Poster, im Rahmen der diesjährigen SETAC-Europe Tagung in Seville (Spanien) (Römbke et al. 2010). Weitere Vorstellungen der Erfahrungen aus diesem Vorhaben wurden auf einem „Dung Ecology Workshop“ in Oxford (UK) im Dezember 2009 vorgetragen.

2.3 Richtlinienbetreuung und -entwicklung

Im Berichtszeitraum wurden die folgenden Aktivitäten im Zusammenhang mit Richtlinien zur Dungorganismen-Testung durchgeführt:

- Beantwortung der zweiten Runde der (wenigen) Kommentare der Experten der OECD-Testrichtlinienkommission zum Entwurf des „Guidance Documents“ zum Dungkäfer-Test (OECD 2009); inzwischen wurde die neue Version zur erneuten Kommentierung (Dauer: bis Januar 2010) an die nationalen Koordinatoren verschickt.
- Nach offizieller Publikation der Richtlinie zur Dungfliegen-Testung (OECD 2008) wurden die zugrunde liegenden Daten aus einem internationalen Ringtest mit den Dungfliegen *S. stercoraria* und *M. autumnalis* in zwei englischsprachigen Journalen veröffentlicht (Römbke et al. 2009; 2010).

In der zweiten Hälfte des Jahres 2009 wurde das Umweltbundesamt bei der Organisation und Durchführung eines Experten-Fachgesprächs mit dem Titel „Non-target impacts of the veterinary parasiticide ivermectin on the biodiversity of dung dwelling organisms“ unterstützt, das am 03. und 04. Dezember 2009 in Berlin stattfand. Ziel dieser Veranstaltung, an der 14 Kollegen aus Australien, Dänemark, Deutschland, Frankreichs, Griechenland, Kanada, den Niederlanden, der Schweiz und Südafrika teilnahmen, war es, das Expertenwissen zur Biodiversität von Dungorganismen zusammenzutragen. Außerdem sollten Wissenslücken zur Wirkung von Parasitiziden auf die Dungorganismengemeinschaft identifiziert werden. Im Rahmen des Fachgesprächs wurde von Seiten der ECT ein Vortrag zum Thema „Protecting biodiversity as part of the environmental risk assessment of pesticides or contaminated soils: Lessons learned from current discussions in the European Union“ gehalten.

Die Experten kommentierten zudem ein von Dr. J. Jensen vorgestellten Entwurf eines EMEA-Konzeptpapiers mit dem Titel „Concept Paper on Higher Tier Testing of Antiparasitics to Dung Organisms“. Die dabei gemachten Ergänzungen und Anregungen wurden bei der Endfassung dieses Dokuments berücksichtigt, das wiederum als Grundlage für das weitere Vorgehen bei der Umweltrisikobeurteilung von Veterinärpharmaka auf der EU-Ebene, speziell in Hinblick auf die Auswahl von „Higher-Tier-Tests“, gilt. Weitere Konsultationen zwischen Mitgliedern der entsprechenden Arbeitsgruppe der EMEA und Mitarbeitern der ECT GmbH erfolgten auch im laufenden Jahr.

3. Darstellung der bisher durchgeführten Arbeiten: Teil Praxis

3.1 Tests mit Dungkäfern

3.1.1 Auswahl der zu verwendenden Dungkäfer

Im Berichtszeitraum wurden die Tests mit der im Vorläuferprojekt verwendeten Spezies *Aphodius constans* als Vertreter der ökologischen Gruppe der „Dwellers“ abgeschlossen (Abb. 1). Dagegen war es bisher nicht möglich, Arten der „Tunnelers“ (z.B. *Onthophagus taurus*, *Onthophagus gazellae*, *Euoniticellus fulvus* und *Euoniticellus intermedius*) zu untersuchen, da teils die entsprechenden Starterkulturen (*O. taurus* von Huntingdon Life Sciences, UK) nicht geliefert werden konnten, teils die angesetzten Kulturen (*E. intermedius*, Universität Montpellier, Frankreich) nicht ausreichend Jungtiere lieferten. Alle bei der ECT GmbH angesetzten Kulturen scheiterten spätestens in der dritten Generation. Es bleibt aber der Anspruch, zwei der wichtigen Lebens- und Vermehrungsstrategien von Dungkäfern durch repräsentative Testspezies abzudecken, da diese aufgrund ihres unterschiedlichen Einflusses auf das Ökosystem Dunghaufen (z.B. dauert deren Abbau bei „Tunnelers“ meist nur Stunden bis Tage, während es bei „Dwellers“ Wochen bis Monate sein können) auch als ökologische Gruppen mit spezifischen ökosystemaren Leistungen aufzufassen sind (Doube 1990).

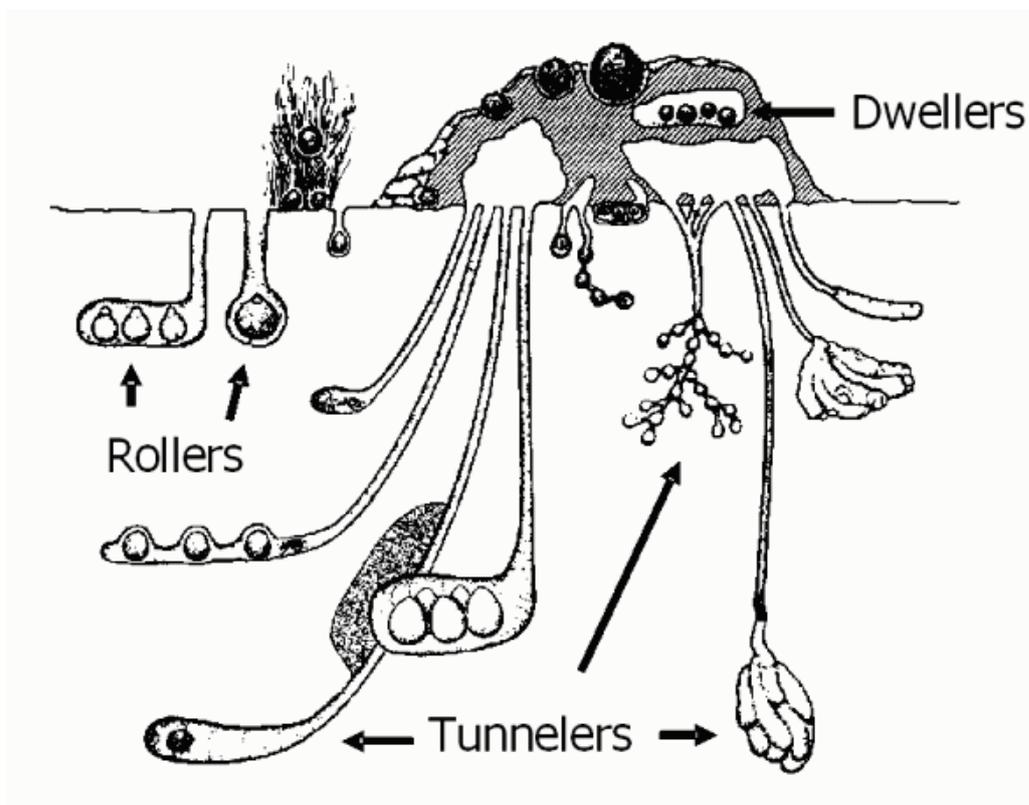


Abb. 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Lebens- und Vermehrungsstrategien von Dungkäfern (nach Doube (1990), verändert von N.N. (2005)).

3.1.2 Zucht und Haltung von Dungkäfern der Art *Euoniticellus intermedius* und *Euoniticellus fulvus*

Beide Arten wurden von Keith Wardhaugh, CSIRO Entomology, Australien geliefert. Ziel war es, mit diesen Organismen eine Laborzucht zu etablieren. Analog zu den meisten ökotoxikologischen Labortests wurde versucht auf Freilandfänge als Testorganismen zu verzichten, im besten Fall sollten lediglich im Labor geschlüpfte Käfer für entsprechende Tests verwendet werden. Zuerst wurde nur *Euoniticellus intermedius* geliefert (Dezember 2008). Diese Tiere waren jedoch für einen Zuchtaufbau ungeeignet da sie offensichtlich durch den Transport stark beeinträchtigt waren. Insbesondere die Mobilität war stark eingeschränkt. In einem zweiten Schritt wurden sowohl *E. intermedius* als auch *E. Fulvus* geliefert. Einige Individuen von *E. intermedius* waren mit Milben befallen (Abb. 2), weitere erkennbare Auffälligkeiten wurden nicht beobachtet. Die mit Milben befallenen Käfer wurden separiert.

Laut Empfehlung von Keith Wardhaugh wurden 10 Pärchen pro Zuchtbehälter eingesetzt. Da diese Empfehlung sich aber hauptsächlich auf die Erfahrungen mit Zuchtversuchen der Art *Ontophagus taurus* bezieht wurden darüber hinaus in einigen Zuchtbehältern mehr Pärchen eingesetzt. Damit sollte herausgefunden werden, ob eine höhere Besatzdichte an Individuen ebenfalls geeignet ist. Im Falle von *E. intermedius* war die Unterscheidung der Geschlechter problemlos. Die Männchen wurden am Horn im Kopfbereich identifiziert (Abb. 3), was ohne optische Hilfsmittel möglich war. Diese Unterscheidung war bei *E. fulvus* nicht machbar, da sich die Tiere optisch nicht von einander unterschieden. Aus diesem Grund wurden jeweils 20 Individuen pro Zuchtbehälter eingesetzt, mit der Hoffnung, dass das – nicht bekannte - Geschlechterverhältnis der Vermehrung der Tiere zuträglich war.

Die Haltung beider Arten erfolgte zwischen 24 und 28 °C bei einem Lichtzyklus von 16 h hell (Lichtintensität zwischen 400 und 800 Lx) und 8 h dunkel. Für die Haltung wurden Plastikeimer mit einem Volumen von 10 L verwendet. Diese wurden zu knapp mehr als zur Hälfte mit einem Gemisch des Standardbodens Lufa St. 2.2 und Vermiculit gefüllt und mit gelöcherten Deckeln verschlossen. Als Futtermittel diente frischer Rinderdung, welcher vorher für mindestens 48 h eingefroren und ein bis zwei Tage vor Verwendung aufgetaut wurde. Dazu wurde auf die Oberfläche des Standardbodens je nach Bedarf, aber höchstens zweimal pro Woche, ein etwa faustgroßer Dungball gelegt (Abb. 4). Der alte Dungball wurde nach Käfern durchsucht und danach entfernt.



Abb. 2: Bauchansicht von *E. intermedius* mit Milbenbefall im Kopfbereich



Abb. 3: *Euoniticellus intermedius*, links Weibchen rechts Männchen.



Abb. 4: Dungball auf Lufa St. 2.2 mit Individuen der Art *E. intermedius*

Nach ca. 14 Tagen wurden die Zuchtbehälter nach Brutbällen durchsucht und die Überlebensrate der adulten Käfer bestimmt. Bei diesem Arbeitsschritt wurde zuerst der Dungball nach Käfern durchsucht, danach wurde das Zuchtsubstrat durch ein 5 mm Sieb gegeben und sowohl die Käfer als auch die Brutbälle gezählt. Das Substrat wurde zurück in den Zuchtbehälter überführt, auf die Oberfläche wurde ein frischer Dungball gegeben und die lebenden adulten Käfer wieder eingesetzt. Sowohl bei *E. fulvus* als auch bei *E. intermedius* wurden die Brutbälle vorsichtig mit der Hand geöffnet und überprüft, ob ein Ei enthalten war (Abb. 5a). Gelegentlich wurde beobachtet, dass sich in einzelnen Brutbällen adulte Käfer aufhielten. Diese wurden nachträglich in die entsprechenden Zuchtbehälter überführt. Die geöffneten Brutbälle, die ein Ei enthielten, wurden vorsichtig wieder geschlossen und mit etwas frischem Dung fixiert. Diese Brutbälle wurden separat in mit Lufa St. 2.2 gefüllten 1 L Bellaplastschalen gegeben (je 10 Stück pro Bellaplastschale) und mit Vermiculit abgedeckt. Diese Arbeitsschritte wurden einmal pro Woche durchgeführt.

Die Brutbälle wurden nach ca. 10 Tagen auf Schlupferfolg der Larven überprüft (Abb. 5b) und wieder mit frischem Dung geschlossen. Danach wurden die Bellaplastschalen wöchentlich

nach frisch geschlüpften Käfern durchsucht, diese gezählt und das Geschlecht bestimmt (Abb. 6). Diese wurden dann unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben gehalten.



Abb. 5a: Brutball mit Ei



Abb. 5b: Brutball mit Larve (*E. intermedius*)



Abb. 6: Nachzucht von *E. intermedius*

Im Laufe der Zeit wurden in den Original-Zuchtbehältern keine Brutbälle mehr produziert, gleichzeitig stieg die Anzahl der toten Käfer. In den Zuchtbehältern der zweiten Generation wurden zwar weiterhin Brutbälle mit Eiern produziert, aus diesen sind allerdings keine Larven bzw. Käfer geschlüpft, so dass die Zucht aufgegeben werden musste. Ähnliche Erfahrungen wurden in anderen europäischen Laboratorien gemacht, ohne dass dafür bisher ein Grund angegeben werden kann.

3.1.3 Charakterisierung der Testspezies *Aphodius constans*

Entwicklungsstadien vom Ei zum adulten Käfer

In Tabelle 1 sind die verschiedenen Entwicklungsstadien der Art *A. constans* hinsichtlich ihrer typischen Merkmale sowie der Dauer des jeweiligen Stadiums dargestellt.

Tab. 1: Zusammenstellung der verschiedenen Entwicklungsstadien von *Aphodius constans*. Die Zeitangaben sind empirisch beobachtete Werte und unterliegen erheblichen Schwankungen.

Zeitpunkt	Stadium	Merkmal
Schlupf	1. Larvenstadium	Körper und Kopf weiß
ca. 1 – 7 Tage	1. Larvenstadium	Körper weiß, Kopf rötlich
ca. 7 – 14 Tage	2. Larvenstadium	Körper weiß/grau und größer als im 1. Stadium. Kopf schwarz
ca. 14 – 21 Tage	3. Larvenstadium	Körper grau, noch größer als im 2. Stadium. Kopf rötlich bis schwarz
ca. 21 – 25 Tage	3. Larvenstadium kurz vor Verpuppung	Körper weiß (Darm entleert).
ca. 25 – 49 Tage	Puppenstadium	Puppe weiß.
ca. 35 – 52 Tage	Schlupf des Käfers	
ca. 35 – 70 Tage	Entwicklung des Käfers bis zum voll ausgewachsenen Tier	Körperfarbe verändert sich von weiß, gold, rotbraun, braun, zu schwarz (Abb. 7).

Biologisch lassen sich die vier Stadien wie folgt charakterisieren:

Eier:

- Form kapselförmig, von hellgelber Färbung, Länge ca. 2 mm
- Ablage einzeln innerhalb des Dungfladens in einer Schicht von ca. 60 – 65 % Feuchte
- Mit zunehmender Austrocknung des Fladens: Ablage in verschiedenen Schichten

Larven:

- Charakteristisch für jeden Teil des Larvenstadiums: zunehmender Kopfdurchmesser (Messung horizontal, um Fehler durch bewegliche Mundwerkzeuge zu vermeiden)
- Körper madenförmig, weißliche Färbung mit dunkel durchscheinendem Darm, Kopf gelblich- bis rötlich-braun mit kräftigen Mundwerkzeugen
- Ernährung von kleinen, festen Dungpartikeln; vor der Verpuppung keine Nahrungsaufnahme für 1 - 2 Wochen, gefolgt von kompletter Entleerung der Darms.

Puppe:

- Gelbliche Körperfärbung, Länge ca. 6 mm
- Verpuppung nach Eingraben der Larven in den Boden
- Störung der Verpuppung kann zu Fehlbildungen bei den Käfern führen.

Käfer:

- Entwicklungsdauer vom Ei bis zum Käfer ca. 2 Monate (bei 20°C), kann jedoch je nach Temperatur stark differieren.
- Länge ca. 6 mm, Färbung nach Verpuppung gelb bis rot; adulte Tiere schwarz
- Dauer der Oviposition: 1 - 2 Monate
- Nahrung: flüssige Anteile des Dungs (Mandibel der adulten Käfer weich)



Abb. 7: Entwicklungsstadien von *A. constans* vom Schlupf aus der Puppe bis zum Adultus. Die unterschiedliche Größe der Tiere zeigt die Bandbreite des individuellen Wachstums auf.

Lebensraum von *Aphodius constans*

Verbreitung:

- Hauptsächlich im Mittelmeerraum, aber auch in Deutschland und Großbritannien
- Herkunft der selbst getesteten Tiere: Süd-Frankreich, Roussillon

Abiotische Faktoren (Temperatur, Feuchte, Licht)

- Im mediterranem Raum Eiablage zwischen Herbst und Frühjahr (optimal: 15 - 20°C)
- Überleben der Adulti im Winter auch bei Frost ohne Schaden möglich

- Diapause im Sommer, d.h. Rückzug der Tiere in tiefere Bodenschichten
- Bevorzugung der tagaktiven adulten Käfer: Tag/Nacht-Zyklus (8 - 10 h hell)
- Larven und Puppen: Dauerdunkel
- Bei einer Feuchte des Dungs < 60 % verringert sich die Dauer der Larvalentwicklung, die Körpergröße der adulten Tiere ist jedoch kleiner.
- Adulte Käfer bevorzugen ein trockeneres Bodensubstrat als die Puppen.

Taxonomie von *Aphodius constans*:

- Verwechslungsgefahr mit anderen in Europa vorkommenden Dungkäfern sehr gering, da *A. constans* an Färbung und Größe eindeutig zu erkennen ist.
- Einzige ähnlich aussehende Art: *Aphodius ater*. Unterscheidungsmerkmale sind:
 - die gedrungener Körperform und dunklere Färbung
 - ausgeprägtere und von Durchmesser und Verteilung gleichmäßigere Vertiefungen auf der Oberseite des Brustpanzers.
 - Dornartige Auswüchse unterhalb des Flügelansatzes
- Unterschiede zwischen ♀ und ♂ bei *Aphodius constans* (Abb. 8)
 - drei hornartige Erhebungen auf dem Kopfpanzer; bei ♂ ausgeprägter
 - „stirnartige“ Erhebung auf dem Kopfpanzer der ♀.
 - männliches Abdomen spitzer als weibliches (schwer zu erkennen)



Abb. 8: Weibliches (links) und männliches (rechts) Individuum von *A. constans*

3.1.4 Durchführung der Tests: Käfer

Die Durchführung der in diesem Kapitel beschriebenen Dungkäfertests erfolgte parallel in den Laboratorien der ECT GmbH bzw. denen der Universität Montpellier.

Im Berichtszeitraum wurden in Flörsheim jeweils zwei verschiedene Methoden in Tests mit Ivermectin und Moxidectin eingesetzt. Parallel dazu wurden in Montpellier beide Methoden, bisher aber nur mit Ivermectin durchgeführt. Bei der ersten Methode, dem verlängerten Larventest, handelt es sich um eine Abwandlung des bekannten 21-d-Larventests (OECD 2009), während es sich bei dem Reptest um eine Neuentwicklung handelt (Tab. 2). Beide Veterinärpharmaka sind häufig eingesetzte Antiparasitika aus den Gruppen der Avermectine bzw. Milbemycine (Floate et al. 2005; Lumaret et al. 2010). Besonders Ivermectin dürfte das ökotoxikologisch am besten charakterisierte Pharmakon sein, was sich auch in seiner Rolle als Referenzsubstanz in der OECD-Richtlinie 228 (2008) zur Dungfliegentestung widerspiegelt. In allen Tests wurde die Art *Aphodius constans* verwendet, wobei sublethale Endpunkte im Mittelpunkt des Interesses standen. Die beiden Methoden lassen sich kurz wie folgt charakterisieren (siehe auch Kapitel 3.1.2.1 und 3.1.2.2):

Tab. 2: Zusammenfassung der verschiedenen Testmethoden mit der jeweiligen Testdauer, dem verwendeten Mess-Eckpunkt sowie einer kurzen Methodenbeschreibung

Testmethode	Dauer	Endpunkt	Methode
Larventest (OECD 2010)	21 d	Mortalität	20 Replikate pro Behandlungsstufe, eine Larve pro Testgefäß.
Verlängerter Larventest	Max. 70 Tage	Schlupfrate adulter Käfer	Wie oben beschrieben. Nach 21d Umfüllen des behandelten Dungs auf LUFA St. 2.2 Boden in neue Testgefäße. Überprüfung der Entwicklung der überlebenden Larven bis zum adulten Käferstadium.
Reproduktions-test	21 d	Reproduktion	2 - 4 Replikate pro Behandlungsstufe. 20 - 30 adulte Käfer pro Testgefäß. Kontaminierter frischer Dung auf unkontaminiertem LUFA St. 2.2 Boden.

Statistische Auswertung

In Übereinstimmung mit den entsprechenden Richtlinien (z.B. OECD 2008) bzw. der Literatur (Finney 1971) wurden die LC50/EC50-Werte mittels Probitanalyse mit integrierter linearer Max. Likelihood Regression berechnet. Wenn eine Berechnung der 95% Konfidenzintervalle möglich war, werden diese jeweils mit den zugehörigen LC50/EC50-Werten angegeben. Für alle Berechnungen wurde das Programm ToxRat Professional Version 2.10 verwendet. Als statistische Kenngrößen wurden nur LC50/EC50-Werte berechnet. Auf eine NOEC-Bestimmung wurde verzichtet, da teilweise zu wenige Replikaten (<4) vorlagen.

Verlängerter Larventest mit *Aphodius constans*

Dieses Verfahren begann, wie der Akuttest der OECD (2010), mit Larven im Alter von ≤ 7 Tagen. Allerdings endete der Test nicht nach drei Wochen, sondern lief weiter bis zum Schlupf der adulten Käfer (Dauer: maximal 10 Wochen). In den bisherigen Versuchen wurde als Testsubstrat vorbehandelter Dung verwendet, d.h. frischer Dung wurde getrocknet, gehäckselt und vor Testbeginn bis zu einem Wassergehalt von 60 % (TG) befeuchtet. Am Teststart wurden die Larven mit dem bereits dotierten vorbehandelten Dung auf unkontaminierten Boden (Lufa St. 2.2) in neue Testgefäße umgesetzt. Hierbei handelte es sich um Glasgefäße mit einem Durchmesser von ca. 2,5 cm und einer Höhe von ca. 9 cm. Messendpunkte waren die Entwicklungsdauer sowie der Schlupferfolg. Die Testergebnisse beider Teile (d.h. nach 3 und 10 Wochen), durchgeführt mit Ivermectin und Moxidectin, sind Tabelle 3 zu entnehmen.

In dem nach OECD (2010) durchgeführten Larventest wurde bei ECT für Ivermectin eine LC₅₀ von 0,55 mg/kg Dung Trockengewicht (TG) bestimmt (Abb. 9a). Nach Verlängerung dieses Tests lag die LC₅₀ bei 0,26 mg/kg Dung (TG). In Montpellier wurde im Larventest nach OECD (2010) eine LC₅₀ von 0,81 generiert. Ergebnisse zu einem verlängerten Larventest liegen nicht vor. Bei der ECT wurden beide Teile des Tests auch mit Moxidectin durchgeführt (Abb. 9b). Die LC₅₀ für das Überleben der Larven nach 21 Tagen wurde als 3,63 mg/kg Dung (TG) berechnet, während nach Verlängerung die LC₅₀ für den Schlupferfolg der Käfer bei 2,00 mg/kg Dung (TG) lag. Der Rückgang der Käferanzahl in der Kontrolle (25%) ist durch die lange Testdauer (70 d) erklärbar: Im Ivermectintest haben von 20 eingesetzten Larven nach 21 Tagen noch 19 gelebt (d.h. Überlebensrate 95%). Von diesen 19 Larven haben sich nach 70 Tagen noch 15 Käfer entwickelt (d.h. Überlebensrat von 75%). Dieses Verhalten entspricht der natürlichen Variabilität (Lumaret, pers. Mittl.) und hat keine Auswirkung auf das Testergebnis.

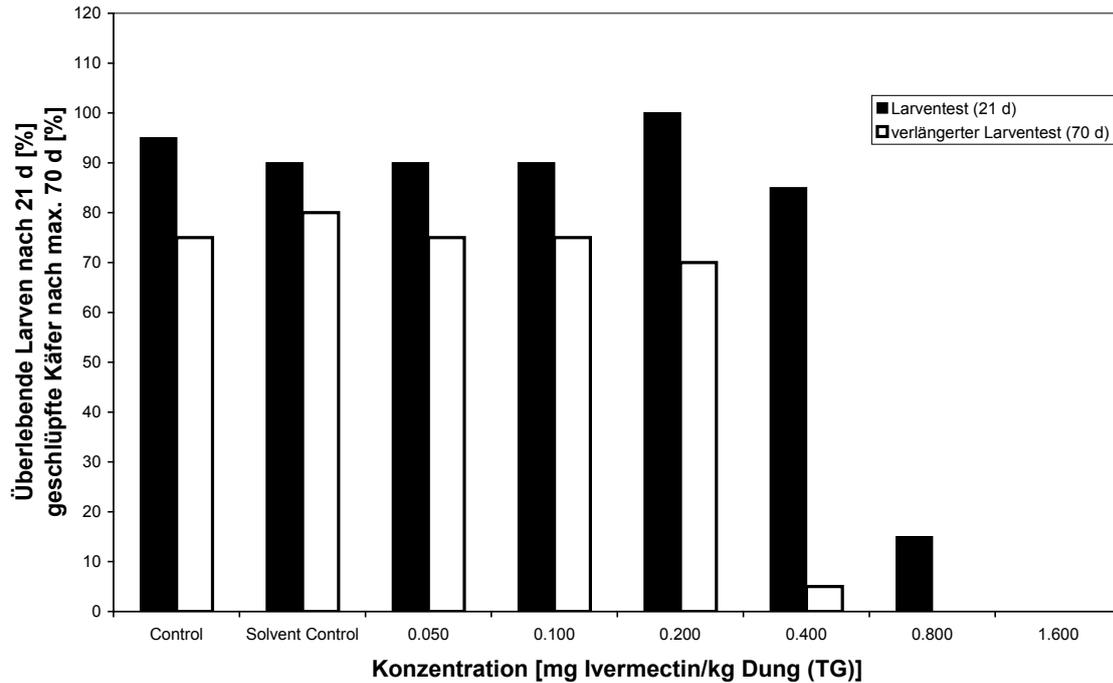


Abb. 9a: Anzahl der überlebenden Larven in Prozent (n = 20) im Larventest und Anzahl der geschlüpften Käfer in Prozent (n = 20) von *Aphodius constans* im verlängerten Test nach max. 70 Tagen mit **Ivermectin**. Test durchgeführt bei **ECT**.

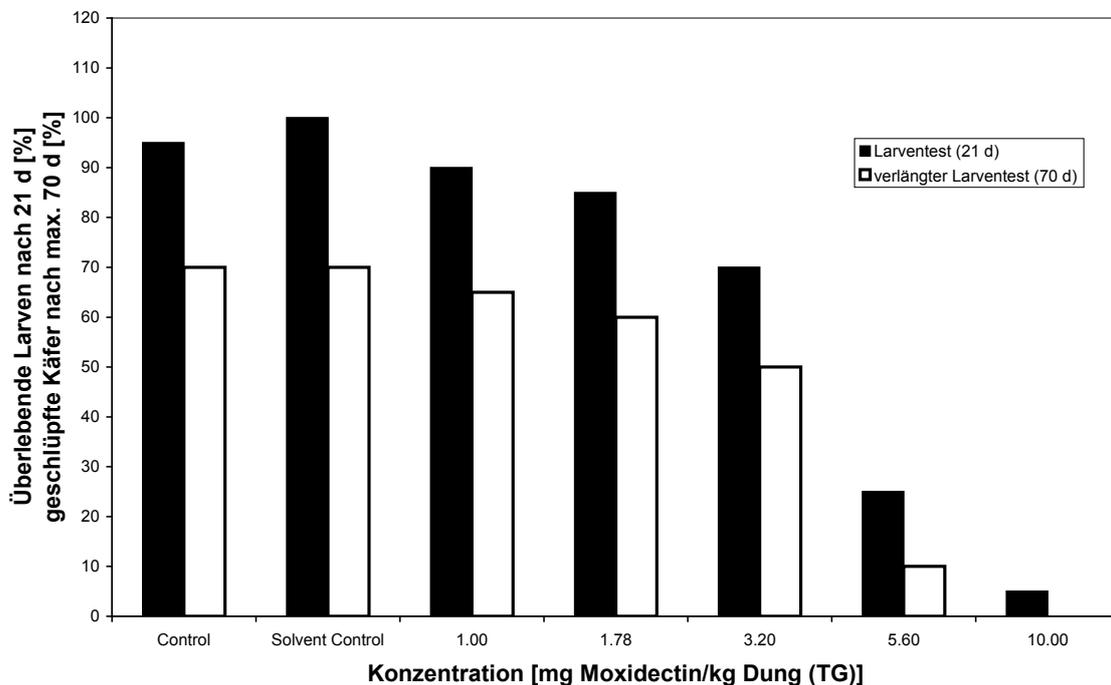


Abb. 9b: Anzahl der überlebenden Larven in Prozent (n = 20) im Larventest und Anzahl der geschlüpften Käfer in Prozent (n = 20) von *Aphodius constans* im verlängerten Test nach max. 70 Tagen mit **Moxidectin**. Test durchgeführt bei **ECT**.

Reproduktionstest mit adulten *Aphodius constans*

In diesem Test wurde mit 20 - 30 adulten Käfern pro Testgefäß begonnen. Für die Exposition wurde frischer Dung mit Ivermectin bzw. Moxidectin beaufschlagt, welcher auf die Oberfläche von unkontaminiertem Boden (Lufa St. 2.2) aufgebracht wurde (Abb. 10). Nach 21 Tagen wurde die Überlebensrate der Adulten, die Anzahl der geschlüpften Larven sowie ihr Entwicklungsstadium bestimmt (Tab. 3). Danach sollten die geschlüpften Larven weiter im selben Testgefäß exponiert werden, um die Schlupfrate bis zum adulten Käfer zu bestimmen (ca. 5 – 10 Wochen) und somit einen kompletten Generationszyklus zu erfassen. Diese Planung über das ursprüngliche Ziel des Vorhabens hinaus: Nach dem Auszählen der Larven nach 21 Tagen wurden diese je nach Entwicklungsstadium (1. – 3. Larvenstadium) in Glaspetrischalen sortiert und dort bis zum vollständigen Auszählen des jeweiligen Testgefäßes „zwischen gelagert“, bevor sie wieder in das ursprüngliche Testsubstrat eingesetzt wurden. Aufgrund fehlender Erfahrung der Bearbeiter war die Lagerungsdauer der (bereits gezählten) Larven in den Schalen offensichtlich zu lang bzw. die Schale nicht feucht genug, denn sie haben sich nach dem Einsetzen auf das Testsubstrat, wohl aufgrund beginnender Austrocknung, nicht mehr eingegraben. Somit ließ sich der Schlupferfolg nicht mehr bestimmen.



Abb. 10: Reproduktionstestgefäß mit LUFA 2.2 Boden unten und kontaminiertem Dung auf der Bodenoberfläche. Die eingesetzten adulten Käfer sind auf der Dungoberfläche zu erkennen

Im 21 d Reproduktionstest wurde bei ECT für Ivermectin eine EC_{50} von 0,29 mg/kg Dung (TG) und in Montpellier eine EC_{50} von 0,32 mg/kg Dung (TG) berechnet. Die Ergebnisse dieser Tests sind den Abbildungen 11a und 11b zu entnehmen. Für Moxidectin wurde mit dieser Testmethode bei ECT eine EC_{50} von 2,65 mg/kg Dung (TG) bestimmt (Abb. 11c).

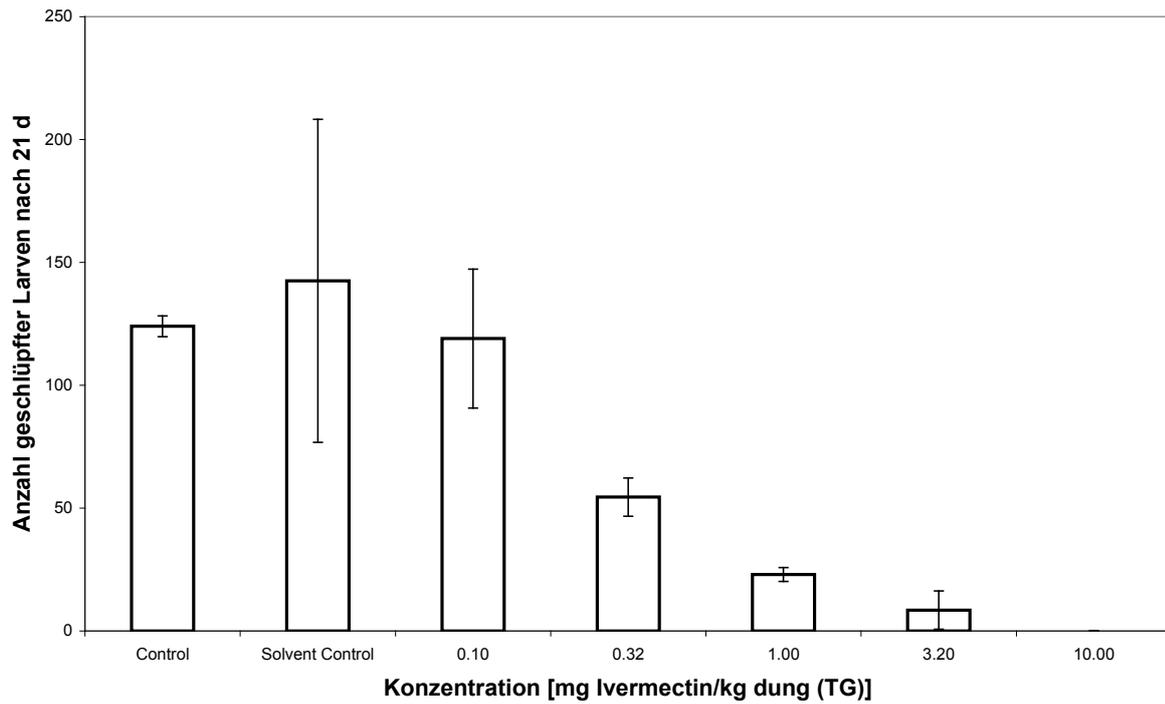


Abb. 11a: Mittelwert und Standardabweichung (n = 2) für die Reproduktion (Anzahl der nach 21 Tagen geschlüpften Larven) von *Aphodius constans* mit **Ivermectin**, durchgeführt bei **ECT**. Start mit 30 adulten *Aphodius constans* pro Testgefäß.

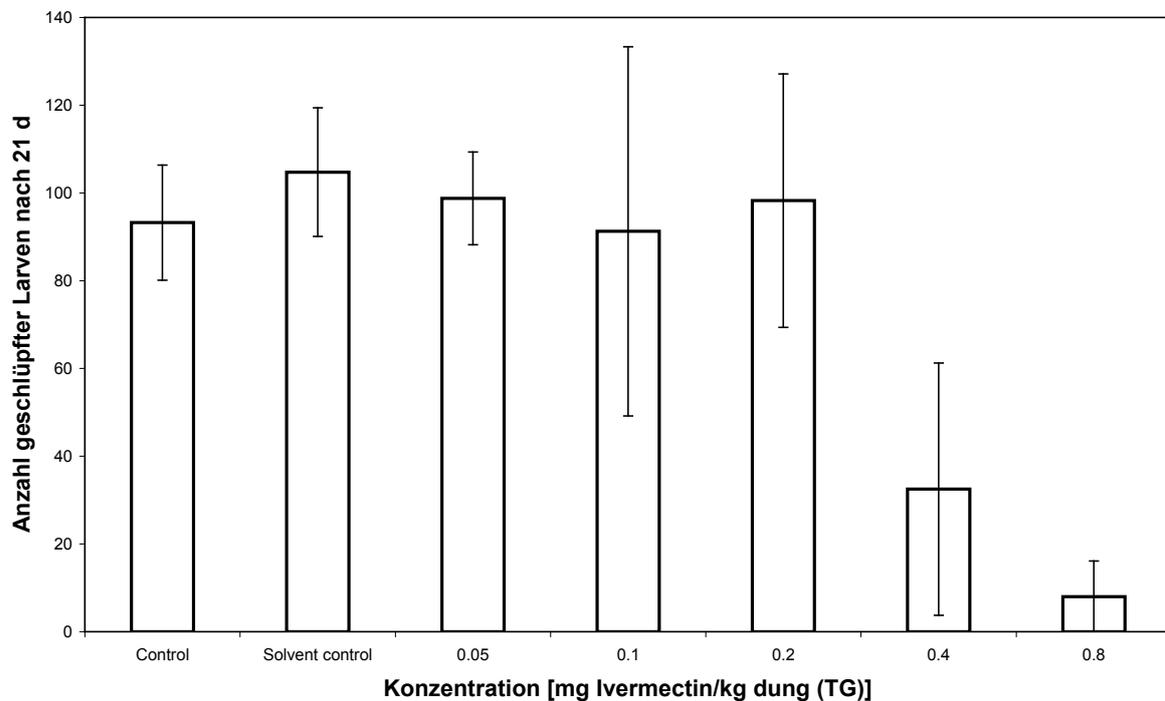


Abb. 11b: Mittelwert und Standardabweichung (n = 4) für die Reproduktion (Anzahl der nach 21 Tagen geschlüpften Larven) von *Aphodius constans* mit **Ivermectin** durchgeführt in **Montpellier**. Start mit 20 adulten *Aphodius constans* pro Testgefäß.

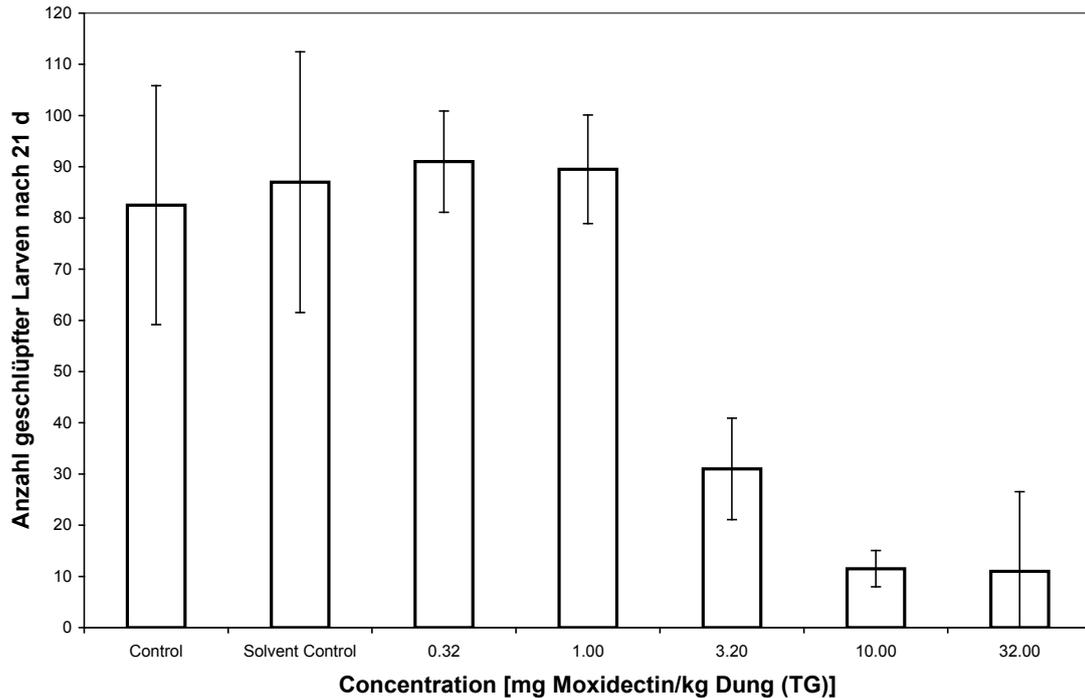


Abb. 11c: Mittelwert und Standardabweichung ($n = 2$) für die Reproduktion (Anzahl der nach 21 Tagen geschlüpften Larven) von *Aphodius constans* mit **Moxidectin** durchgeführt bei ECT. Start mit 30 adulten *Aphodius constans* pro Testgefäß.

Tab. 3: Zusammenfassung der Testergebnisse für Ivermectin und Moxidectin [mg Testsubstanz/kg Dung TG] an den Standorten Flörsheim (ECT) und Montpellier (UM).

Iver- Mectin	Larven-Test nach OECD (2010) (21 d)		Verlängerter Larventest mit Schlupferfolg (ca. 70 d)		Reproduktionstest (21 d)	
	ECT	UM	ECT	UM	ECT	UM
EC50	0,55	0,81	0,26	-	0,29	0,32
Sd	n.d.	0,68 – 0,95	n.d.	-	0,21 – 0,40	0,24 – 0,43

Moxi- Dectin	Larven-Test nach OECD (2010) (21 d)		Verlängerter Larventest mit Schlupferfolg (ca. 70 d)		Reproduktionstest T (21 d)	
	ECT	UM	ECT	UM	ECT	UM
EC50	3,63	-	2,00	-	2,65	-
Sd	2,87 – 4,63	-	1,39 – 2,64	-	0.21 - 0.40	-

3.1.4 Diskussion der bisher durchgeführten Dungkäfertests

Arten:

Entgegen der ursprünglichen Planung war es bisher nicht möglich, die Eignung als Testspezies bei einer der nachfolgend aufgeführten Spezies aus den oben genannten Gründen praktisch zu verifizieren: *Onthophagus taurus*, *Onthophagus gazellae*, *Euoniticellus fulvus* und *Euoniticellus intermedius*. Nachdem wiederholte Versuche scheiterten, eine ausreichende Anzahl von Dungkäfern entweder von dem englischen Labor „Huntingdon Life Sciences“ oder als Freilandfänge in Südfrankreich zu bekommen wurde beschlossen, sich während der Restlaufzeit des Vorhabens auf die Testung der Art *Aphodius constans* zu konzentrieren. Parallel dazu wurden die Bemühungen fortgesetzt, genügend Individuen einer *Onthophagus*-Art für einen Ringtest zu erlangen. Nach dem gegenwärtigen Stand könnte ein solcher Ringtest mit mehreren Laboratorien für den Herbst 2010, d.h. nach Abschluß dieses Vorhabens, mit Hilfe von Dr. K. Floate (Lethbridge Research Centre, Kanada) durchgeführt werden.

Demgegenüber hat sich die bisher in Larventests (21 d) eingesetzte Art *Aphodius constans* auch in den hier vorgestellten Tests bewährt, so dass deren weiterer Einsatz zu empfehlen ist. Zudem könnte die erst im Laufe der hier beschriebenen Tests entstandene Idee eines Full-Life-Cycle-Tests mit *A. constans* aufgegriffen werden.

Empfindlichkeit:

Im Larventest nach dem „Guidance Document“ (OECD 2009) wurden im laufenden Vorhaben die im ursprünglichen UBA-Forschungsprojekt erarbeiteten und inzwischen auch publizierten Testergebnisse (Hempel et al, 2006; Lumaret et al. 2007; Römbke et al. 2007) weitgehend bestätigt: Während in diesem Vorhaben von ECT bzw. UM für Ivermectin LC50-Werte von 0,55 bzw. 0,81 (0,68 – 0,95) mg/kg Dung (TG) gefunden wurden lagen die entsprechenden LC50-Werte damals bei 0,88 mg/kg Dung TG (Hempel et al. 2006). Auch bei Moxidectin gibt es nur einen Unterschied um den Faktor <2 zwischen den hier erhobenen Werten (3,63 (2,87 – 4,63) mg/kg Dung (TG)) sowie Literaturangaben (5,4 mg/kg Dung (TG)) (Hempel et al. 2006). Damit konnte die Robustheit des Larventests nach OECD (2010) bestätigt werden.

Die Ergebnisse, angegeben als EC50-Werte, der bisher durchgeführten verlängerten Larventests sowie der Reproduktionstest mit Adulten liegen alle unter den Werten aus den Larventests (OECD 2010). Wenn man von einem mittleren LC50-Wert von 0,75 mg/kg Dung (TG) für

Ivermectin im Larventest (OECD 2010) ausgeht (Mittelwert der drei bisher in den Labors von ECT und UM durchgeführten Tests), so liegen die Ergebnisse des 21d Reproduktionstest ca. um den Faktor 2 (Reproduktionstest: $EC_{50} = 0,29 - 0,32$ mg/kg Dung (TG)) bzw. um den Faktor 3 (verlängerter Larventest: $EC_{50} = 0,26$ mg/kg Dung (TG)) niedriger.

Die niedrigeren Wirkwerte hätten bei der Durchführung einer Umweltrisikobeurteilung zwar eine Verschärfung, aber keine grundsätzliche Änderung des Ergebnisses bewirkt (Liebig et al. 2010). Allerdings haben die hier gewonnenen EC_{50} -Werte eine höhere Relevanz, wenn man sie mit dem Ergebnis einer bei Madrid (Spanien) durchgeführten Freilandstudie vergleicht: dort lag der EC_{50} -Wert für den Dungkäfer *Volinus distinctus* bei 0,62 mg/kg Dung (TG); d.h. die Ergebnisse des Reproduktions- und des verlängerten Larventests liegen noch darunter.

Obwohl schon in mehreren Studien der Einfluss von Ivermectin auf Dungkäfer der Gattung *Aphodius* untersucht wurde lassen sich quantitative Vergleiche aufgrund des unterschiedlichen Versuchsdesigns bzw. fehlenden Angaben zur Konzentration nicht ziehen. Allerdings ist bekannt, dass die Gesamtzahl der Larven von *Aphodius ater* bzw. *A. rufipes* in kontaminierten Dung ein ähnlich empfindlicher Endpunkt wie die Entwicklungsdauer ist (O'Hea et al. 2010). Gerade der letztgenannte Parameter hat sich in Tests mit Dung behandelte Rinder aufgrund seiner hohen Sensitivität als sehr geeignet erwiesen (Madsen et al. 1990, Sommer et al. 1993; Strong & Wall 1994). Dagegen reagierten adulte Käfer deutlich weniger oder wurden sogar von ivermectin-behandeltem Dung angezogen (Errouissu & Lumaret 2010; Webb et al. 2010). Letzteres konnte in einer kanadischen Studie auch für mehrere Arten der Gattung *Aphodius* (z.B. *A. coloradensis*, *A. erraticus*, *A. fossor*, *A. granarius* oder *A. vittatus*) bestätigt werden (Floate 2007). Allerdings kann allein eine reduzierte Aktivität der Adulti zu Veränderungen im Dung (z.B. hinsichtlich des Wachstums bestimmter Pilze) führen (Finnegan et al. 2007).

Der Unterschied ist bei Moxidectin geringer als bei Ivermectin, denn hier unterscheiden sich die EC_{50} -Werte der beiden Reproduktions-Tests (2,0 – 2,65 mg/kg Dung (TG)) um weniger als den Faktor 2 vom Ergebnis des OECD-Larventests (3,63 mg/kg Dung (TG)). Im Augenblick kann nicht entschieden werden, ob diese Unterschiede in der Empfindlichkeit der beiden Testsubstanzen robust sind oder ob die Zahl der Ergebnisse schlicht noch zu klein ist.

Die Zahl der Literaturdaten zur Wirkung von Moxidectin auf Dungkäfer, speziell der Gattung

Aphodius, ist deutlich geringer als bei Ivermectin. Neben den Ergebnissen eigener Versuche ist nur bekannt, dass kein Effekt auf die Entwicklung vom Ei bis zum adulten Tier bei *Aphodius*-Larven gefunden wurde (Strong & Wall 1994). Allerdings konnte Floate (2007) zeigen, dass auch Moxidectin einen starken Anlockeffekt auf Dungkäfer, darunter auch mehrere *Aphodius*-Arten, hat. Generell bestätigen diese Ergebnisse, dass die Toxizität von Moxidectin auf Dungkäfer geringer ist als die von Ivermectin.

Fazit:

Festzuhalten ist, dass die Einbeziehung des Reproduktions-Endpunkts zu einer größeren Empfindlichkeit des Testsystems Dungkäfer geführt hat. Dabei ist der Unterschied zum bisher durchgeführten Larventest bei Ivermectin größer als bei Moxidectin. Es ist daher zu prüfen, ob durch einen „Full-Life-Cycle-Test“ mit dieser Art eine weitere Erhöhung der Empfindlichkeit erreicht werden kann. Die technische Umsetzung sollte machbar sein, da die einzelnen Teilschritte schon erfolgreich umgesetzt wurden. Vor einer entsprechenden Empfehlung ist noch abzuschätzen, ob der Vorteil einer höheren Empfindlichkeit durch den im verlängerten Larven- bzw. im „Full-Life-Cycle-Test“ erheblich höheren Aufwand gerechtfertigt ist.

3.2 Durchführung der Tests: Dungfliegen

Die Versuche mit verschiedenen Dungfliegenarten erfolgten im Labor der Universität Zürich.

3.2.1 Tests mit Sepsiden

Einleitung und Arten

In Zürich wurden im Jahr 2009, in Anlehnung an die Arbeiten mit der gelben Dungfliege *Scathophaga stercoraria* und der „Face fly“ *Musca autumnalis*, standardisierte Tests mit diversen Ivermectinkonzentrationen durchgeführt (OECD 2008; Römbke et al. 2009; 2010). Ziel war es, die vorhandenen Methoden zur Dungfliegentestung auf diese Gruppe von kleinen, sich schnell entwickelnden Schwingfliegen auszudehnen, deren ca. 300 Arten weltweit vorkommen und von denen viele Arten einfach im Labor in großen Populationen mit Zucker, Wasser und Kuhdung zücht- und haltbar sind. Obgleich keine einzelne Art weltweit verbreitet ist, ließen sich jedoch analoge Tests mit den jeweils vorkommenden Arten durchführen, die insofern realistisch die heimischen ökologischen Gegebenheiten widerspiegeln. Darunter sind europäische und nordamerikanische Arten der gemäßigten Klimate sowie tropische asiatische Arten (Tab. 4). Generell wurden neben der Mortalität auch

sublethale Parameter wie die Körpergröße und die Gesamt-Entwicklungsdauer (und somit die Wachstumsrate) als Endpunkte erfasst (siehe das Beispiel *Sepsis fulgens* in Abb. 12 – 14). Für einige Arten wurden dabei multiple Populationen aus verschiedenen Regionen getestet, um die Artspezifität der Empfindlichkeit gegenüber Ivermectin zu bestätigen (Tab 4).

Tab. 4: Liste der in Zürich auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Ivermectin und Moxidectin getesteten Sepsidenarten bzw. -populationen

Art	Herkunft der Population	Labor	Verhalten	Labor
Gattung <i>Sepsis</i>	Ivermectin			Moxidectin
<i>S. cynipsea</i>	Österreich, Schweiz, Schweden, Italien	X	X	X (Schweiz)
<i>S. dissimilis</i>	Brunei	X		
<i>S. duplicata</i>	Schweiz	X	X	
<i>S. flavimana</i>	Schweiz	X	X	
<i>S. fulgens</i>	Österreich, Spanien, Estland, Italien	X	X	
<i>S. lateralis</i>	Indonesien (Java)	X		
<i>S. monostigma</i>	China	X		X
<i>S. neocynipsea</i>	USA (Arizona, Illinois), Italien, Schweiz	X	X	X (Schweiz)
<i>S. orthocnemis</i>	Österreich, Schweiz	X	X	X (Schweiz)
<i>S. punctum</i>	Schweiz, Deutschland, USA (New York, Georgia)	X	X	X (Schweiz)
<i>S. secunda</i>	USA (Georgia)	X		
<i>S. thoracica</i>	Österreich, Spanien, Italien	X	X	
<i>S. violacea</i>	Österreich, Estland	X	X	
Andere Gattungen				
<i>Meroplius fukuhari</i>	Indonesien (Java)	X		
<i>Saltella sphondylii</i>	Schweiz	X	X	

Weiterhin wurden Tests mit vier Arten (*S. cynipsea*, *S. fulgens*, *S. punctum*, *S. thoracica*) nicht nur in Klimakammern unter konstanten Temperaturbedingungen durchgeführt, sondern zusätzlich – wie zuvor für *Scathophaga stercoraria* – im Freiland unter natürlich schwankenden Umwelt- und Wetterbedingungen (z.B. Temperatur) (unterstrichen in Tab. 4). Auch wurden mit einigen Arten Verhaltensversuche im Labor durchgeführt (Tab. 4). Dabei wurden diesen randomisiert Eiablagemöglichkeiten mit Dung diverser Konzentrationen (plus zwei Kontrollen) angeboten. Generell zeigte sich hierbei, dass die Weibchen das Ivermectin nicht detektieren können und somit gleichermaßen in alle Dingtöpfchen Eier ablegen.

Testmethodik:

Die Testmethoden folgen mehrheitlich den vorhandenen Richtlinien für *Musca autumnalis* und *Scathophaga stercoraria*. Kolonien von diversen Sepsidenarten und –populationen wurden gesammelt und danach im Labor, z.T. über Jahre, in 3 L Gruppenbehältern bei konstanten Bedingungen (24 °C, 60% Luftfeuchte; 14 Stunden Licht) mit Zucker, Wasser und frischem, vorher gefrorenem Kuhdung gehalten. Für den Test wurde die Testsubstanz gemäß den vorhandenen Protokollen in vorher gefrorenen und homogenen Kuhdung in 6 (Ivermectin; wie gehabt) bzw. 10 (Moxidectin) Konzentrationen gemischt.

Um Testindividuen zu erhalten, wurden kleine Mistportionen über ca. 8 – 12 Stunden in die jeweiligen Zuchtbehälter gegeben, in die Sepsidenweibchen ihre Eier legten. Anfänglich wurden Eier (zählbar auf ein kleines feuchtes Filterpapier), später jedoch zumeist frisch geschlüpfte Larven (direkt in den Dung) in die Testbehälter umgesetzt. Insbesondere für das Umsetzen von Larven, aber auch der Eier, empfiehlt es sich, die im Zuchtbehälter angebotene Dungschicht möglichst großflächig aber dünn zu halten (z.B. 2 x 1 cm², wenige mm dick), da in größeren Dungportionen ansonsten die Eier- bzw Larvensuche (unter Binokular) mühsam ist. Die Eier werden „unter Wasser“ in den Dung gelegt, und nur ein weißer Faden zur Atmung ist sichtbar. Larven kommen an die Oberfläche wenn der Dung langsam austrocknet.

Testbehälter waren ca. 20 x 10 mm² große Plastikdöschen mit Rand (ca. 5 mm) randvoll mit Testdung, in welche ca. 10 Eier oder Larven abgezählt wurden. Sowohl Eier als auch Larven wurden mit feinen Malpinseln übertragen. Die Döschen wurden dann liegend in 50 oder 100 ml Glasfläschchen gegeben und mit einem luftdurchlässigen Stopfen (Schaumstoff bzw. Papier) verschlossen. 5 Replikate à ca. 10 Eier/Larven pro Konzentration (inkl. Kontrollen) wurden angesetzt, entsprechend beschriftet und auf einem Tablar in einem Klimaschrank bei 21 °C, 60% Luftfeuchte und 14 h Licht aufgezogen. Für die Feldversuche unter natürlichen Umweltbedingungen wurde das Tablar, vor Regen und direkter Sonneneinstrahlung geschützt auf dem Balkon gelagert. Geschlüpfte Imagines (adulte Sepsiden) wurden täglich geerntet und sofort eingefroren. So wurden Daten zur Mortalität (geschlüpfte/ingesetzte Individuen), Entwicklungsdauer (Ei – Adulttier) und Körpergröße (Kopfbreite mit Augen, unter Binokular bei 40x Vergrößerung gemessen; bei größeren Insekten auch tenerales Feucht- oder Trockengewicht möglich) generiert, getrennt für beide Geschlechter (Männchen der meisten Sepsidenarten haben Dornen an ihren Vorderbeinen, die den Weibchen fehlen).

Testergebnisse:

In Tabelle 5 sind die in den Tests mit Ivermectin determinierten EC50-Werte aufgeführt. Eine genaue Analyse dieser Daten würde den Rahmen dieses Berichts sprengen und wird statt dessen in Form internationaler Publikationen erfolgen. Erste Schlussfolgerungen sind aber möglich. Generell reagieren Sepsiden sehr unterschiedlich auf Ivermectin. Die EC50-Werte differieren im Bereich zwischen 0,04 µg/kg Dung TG (*S. cynipsea* aus Italien) und 222,97 µg/kg Dung TG (*S. punctum* aus der Schweiz), d.h. um einen Faktor von ca. 6000.

Tab. 5: Wirkung von Ivermectin auf verschiedene Arten der Gattung *Sepsis* (Diptera: Sepsidae), angegeben als µg/kg Dung (TG). Pop = Herkunft der getesteten Population; PopNo = Nummer der Population; LabFeld: Angabe, ob die Organismen im Labor oder im Freiland getestet wurden. CI95%l / CI95%h: Untere (l = low) and obere (h = high) Grenze des 95%-Vertrauensbereichs

Angaben zu den Testorganismen				Angaben in µg/kg Dung TG		
Species	Pop	PopNo	LabFeld	EC50	CI95%l	CI95%h
<i>cynipsea</i>	Österreich	3	Lab	4,62	2,11	9,49
<i>cynipsea</i>	Schweiz	1	Feld	1,06	0,39	2,36
<i>cynipsea</i>	Schweiz	1	Lab	1,75	0,61	4,28
<i>cynipsea</i>	Italien	4	Lab	0,04	0,01	0,11
<i>cynipsea</i>	Schweden	2	Feld	0,54	0,29	0,91
<i>cynipsea</i>	Schweden	2	Lab	0,72	0,42	1,14
<i>cynipsea</i>	Schweden	3	Lab	1,13	0,50	2,18
<i>dissimilis</i>	Brunei	1	Lab	0,27	0,10	0,54
<i>duplicata</i>	Schweiz	1	Lab	0,17	0,05	0,37
<i>flavimana</i>	Schweiz	1	Lab	0,16	0,01	0,73
<i>fulgens</i>	Österreich	3	Lab	59,43	15,47	407,95
<i>fulgens</i>	Spanien	1	Feld	4,49	1,97	9,70
<i>fulgens</i>	Spanien	1	Lab	4,16	1,45	10,58
<i>fulgens</i>	Estland	2	Feld	6,14	3,30	11,11
<i>fulgens</i>	Estland	2	Lab	5,55	2,48	11,46
<i>fulgens</i>	Italien	4	Lab	40,37	21,13	92,32
<i>lateralis</i>	Java, Indonesien	1	Lab	16,07	3,38	139,93
<i>monostigma</i>	China	1	Lab	117,18	43,74	467,96
<i>neocynipsea</i>	Arizona, USA	1	Lab	15,04	6,33	41,43
<i>neocynipsea</i>	Italien	3	Lab	0,80	0,31	1,62
<i>neocynipsea</i>	Illinois, USA	2	Lab	6,05	2,05	17,60

<i>neocynipsea</i>	Schweiz	4	Lab	0,99	0,60	1,55
<i>orthocnemis</i>	Österreich	1	Lab	23,75	5,08	115,17
<i>orthocnemis</i>	Schweiz	2	Lab	6,09	3,12	11,91
<i>punctum</i>	Schweiz	1	Feld	14,08	3,87	64,62
<i>punctum</i>	Schweiz	1	Lab	222,97	47,90	5060,46
<i>punctum</i>	Deutschland	2	Feld	13,20	5,81	34,56
<i>punctum</i>	Deutschland	2	Lab	13,11	6,02	32,82
<i>punctum</i>	Georgia, USA	3	Lab	163,11	46,33	1510,98
<i>punctum</i>	New York, USA	4	Lab	40,17	11,56	216,89
<i>secunda</i>	North Ca., USA	1	Lab	10,98	3,51	38,95
<i>thoracica</i>	Österreich	3	Lab	4,68	1,13	16,90
<i>thoracica</i>	Spanien	1	Feld	0,67	0,26	1,36
<i>thoracica</i>	Spanien	1	Lab	0,17	0,07	0,31
<i>thoracica</i>	Italien	2	Feld	1,51	1,10	2,03
<i>thoracica</i>	Italien	2	Lab	1,15	0,66	1,86
<i>thoracica</i>	Italien	2	Lab	2,69	1,50	4,58
<i>violacea</i>	Österreich	1	Lab	1,86	0,23	6,60
<i>violacea</i>	Estland	2	Lab	7,34	1,68	26,60
<i>Meroplus f.</i>	Java, Indonesien	1	Lab	0,36	0,08	0,93
<i>Saltella s.</i>	Schweiz	1	Lab	0,88	0,50	1,43

Für fünf Arten liegen ≥ 4 Werte aus Tests mit verschiedenen Populationen vor (Tab. 6). Auch wenn sich dabei die Sensitivität einzelner Arten unterscheidet (z.B. *S. thracica* hoch, *S. punctum* niedrig), so sind schon die Unterschiede auf Populationsebene erheblich: die Minimum- und Maximumwerte liegen um einen Faktor von 15 – 115 auseinander.

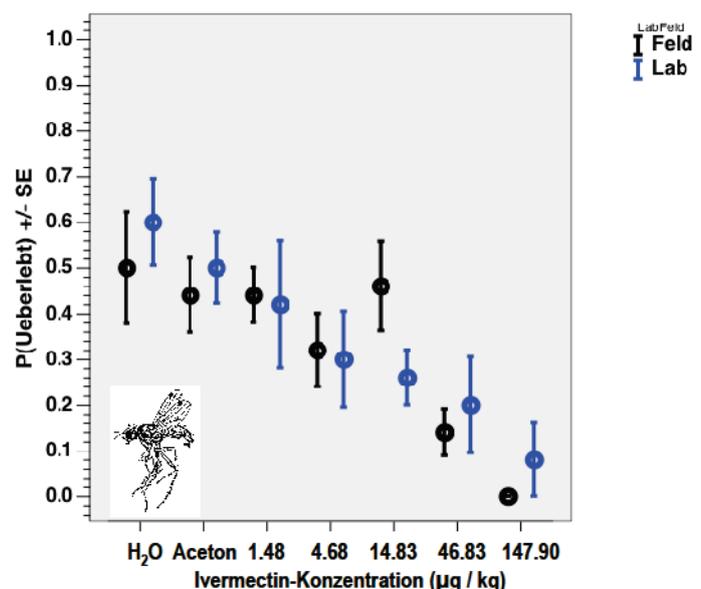
Tab. 6: Wirkung von Ivermectin auf 4 – 6 Populationen von 5 Arten der Gattung *Sepsis* (Diptera: Sepsidae), angegeben als EC50 in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Dung (TG) sowie dem Faktor zwischen dem Minimal- und Maximalwert (EC50).

Art	Anzahl Populationen (Herkunft)	EC50 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Dung TG)	Min-Max-Faktor (ca.)
<i>S. cynipsea</i>	7 (Süd- bis Nordeuropa)	1,41	115
<i>S. fulgens</i>	6 (Süd- bis Osteuropa)	20,0	15
<i>S. neocynipsea</i>	4 (Italien, Schweiz, USA)	5,72	20
<i>S. punctum</i>	6 (Mitteleuropa, USA)	77,8	15
<i>S. thoracica</i>	6 (Süd- bis Mitteleuropa)	1,81	30

Es ist gegenwärtig nicht entscheidbar, ob diese großen Unterschiede typisch für Sepsiden sind – oder ob bei anderen Testorganismen noch zu wenig Tiere aus verschiedenen Populationen untersucht worden sind. Die Herkunft der jeweiligen Tiere (Labor oder Freiland bzw. die geographische Region) scheint, vorbehaltlich einer statistischen Auswertung, jedenfalls keine Rolle zu spielen. Erfahrungen aus der Literatur hinsichtlich der Wirkungen von Ivermectin auf Sepsiden liegen kaum vor. Allerdings deuten die Ergebnisse von Freilandstudien auf eine hohe Empfindlichkeit dieser Tiere hin (z.B. Floate 1998; Floate et al. 2002; Iwasa et al. 2005). Zudem gibt es Hinweise, das Ivermectin auf Tiere der Gattung *Sepsis* anziehend wirken kann (Floate 2007).

Beispielhaft zeigen die Abbildungen 12 – 14 die Schlupfrate, Entwicklungsdauer und Körpergröße (Kopfbreite) in Abhängigkeit von der Ivermectinkonzentration, bezogen auf Trockengewicht, für *Sepsis fulgens*. Man sieht eine etwas ungewöhnliche kontinuierliche Erniedrigung der Schlupfrate mit der Ivermectinkonzentration, im Feld wie im Labor (Abb. 12). Nur bei den höchsten Konzentrationen erhöhte sich die Entwicklungsdauer (Abb. 14) und gleichzeitig erniedrigte sich die Körpergröße (Abb. 13). Insgesamt bedeutet dies eine Verringerung der Wachstumsrate. Allerdings sind diese sublethale Effekte nicht bei allen Arten gleichermaßen zu beobachten. Auch ist daran zu erinnern, dass bei hohen Konzentrationen die Datenmenge der überlebenden Fliegen natürlich stark reduziert ist.

Abb. 12: Schlupfrate von *S. fulgens* in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen von Ivermectin in Versuchen unter Labor- und Freilandbedingungen ($\mu\text{g}/\text{kg}$ Dung TG)



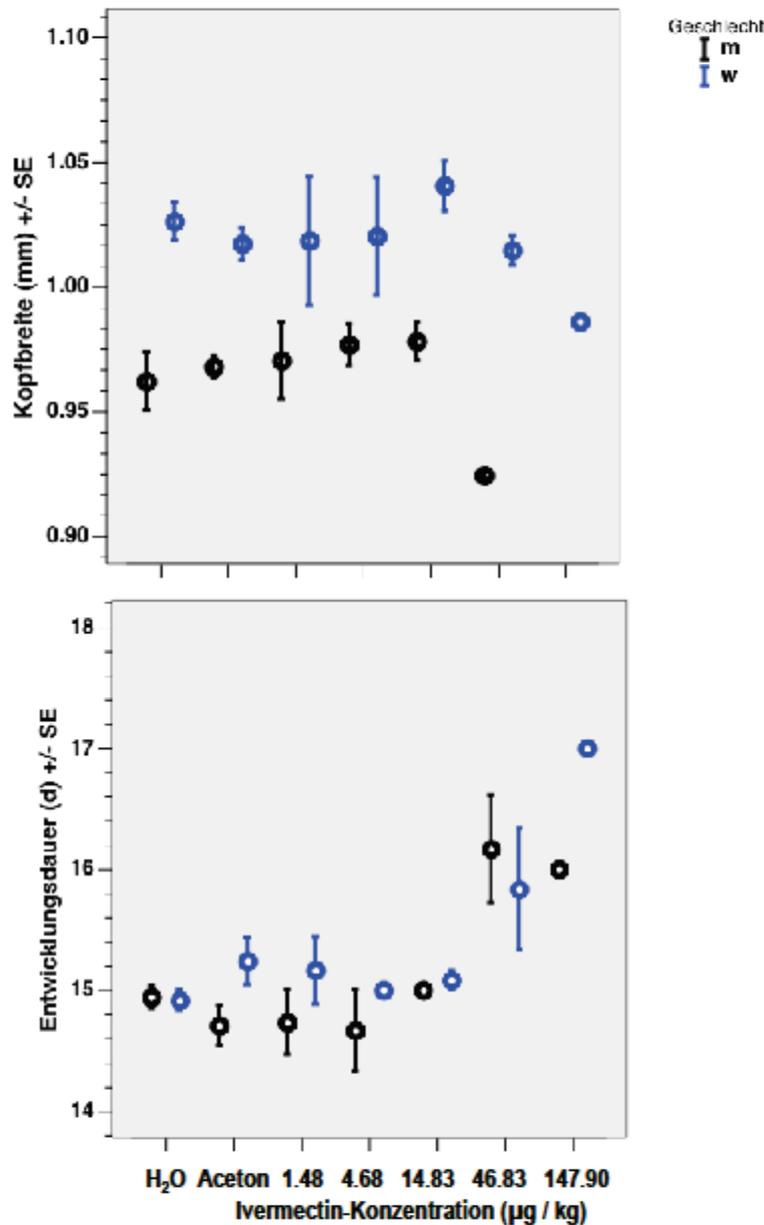


Abb. 13 (oben): Adultgröße (Kopfbreite) von *S. fulgens* in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen von Ivermectin in Versuchen unter Labor- und Freilandbedingungen (µg/kg Dung TG)

Abb. 14 (unten): Entwicklungsdauer von *S. fulgens* in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen von Ivermectin in Versuchen unter Labor- und Freilandbedingungen (µg/kg Dung TG)

3.2.2 Tests mit anderen Dungfliegen

Neben den Sepsiden wurden Ivermectintests auch noch mit der gelben Dungfliege *Scathophaga stercoraria* (bereits früher; Römbke et al. 2009a), der nah verwandten Art *Sc. suilla* (neu) und zwei Populationen von *Musca domestica* durchgeführt (Tab. 7). Auch wurde der Moxidectintest noch mit *Musca autumnalis* durchgeführt, die freundlicherweise von der Firma *eurofins Agrosience* in Niefern-Öschelbronn (Dr. Silvio Knäbe) aus ihrer Zucht bereitgestellt wurden. Somit stehen für beide Fliegenfamilien (Muscidae; Scathophagidae) zumindest zwei Artenvertreter für Tests zur Verfügung, wodurch Effekte der phylogenetischen Verwandtschaft auf die Empfindlichkeit zumindest grob eingeschätzt werden können. Bei allen Arten (inklusive der Sepsiden) können neben der Mortalität (lethaler Effekt) zumindest die beiden sublethalen Endpunkte adulte Körpergröße und Entwicklungsdauer (Ei – Adulttier) einfach abgeschätzt werden. Werden Eier auf ein feuchtes Filterpapierchen umgesetzt (wie etwa bei *Scathophaga stercoraria*), kann auch die Eimortalität (= Larvenschlupf) bestimmt werden. Für alle Arten außer *Musca domestica* lassen sich Larven und Puppendauer (und –größe) schwer erfassen, da die Tiere sich im oder unter dem Dung verpuppen (*M. domestica*-Puppen dagegen liegen auf der Oberfläche.)

Tab. 7: Liste der in Zürich auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Ivermectin und Moxidectin getesteten Fliegenarten bzw. Populationen

Weitere Arten	Herkunft der Population	Labor	Verhalten	Labor
	Ivermectin			Moxidectin
<i>Musca autumnalis</i>	USA			X (USA)
<i>Musca domestica</i>	Schweiz, Schweden	X		X (CH)
<i>Scathophaga suilla</i>	Schweiz	X		
<i>Sc. stercoraria</i>	Schweiz	X	X	X (Schweiz)

Aus der Literatur ist die hohe Empfindlichkeit von Dungfliegen gegenüber Ivermectin gut bekannt. So wurden z.B. in den beiden Ringtests, die der Verabschiedung der OECD-Richtlinie zur Dungfliegentestung vorangingen (Römbke et al. 2009; Römbke et al. 2010), die folgenden Toxizitätswerte für Ivermectin bestimmt:

S. stercoraria: Mortalität (Ei-Adultus): EC50 = 20,9 µg/kg Dung f.w.; NOEC = 8,1 µg/kg Dung f.w.; Entwicklungsdauer: NOEC < 0,8 µg/kg Dung f.w.

M. autumnalis: Emergenz: EC50 = 4.65 ± 2.17 (SD) µg/kg fw; NOEC = 1,11 – 3,33 µg/kg f.w.; keine Wirkung auf die Entwicklungsdauer.

Eine Übersicht über weitere Testergebnisse ist Lumaret et al. (2010) zu entnehmen, während mögliche Unterschiede hinsichtlich der Wirkung von Ivermectin auf verschiedene Fliegenarten, inklusive *Musca domestica*, von Farkas et al. (2003) diskutiert werden. Gerade im Fall von *M. domestica* konnte zudem das Auftreten indirekter Effekte im Nahrungsnetz beobachtet werden (Floate & Fox 1999).

Daten zur Toxizität von Moxidectin auf Dungfliegen liegen kaum vor, doch scheint die Wirkung deutlich geringer als die von Ivermectin zu sein. So konnten weder für *Musca domestica* (Wardhaugh et al. 1996; Floate et al. 2001; Farkas et al. 2003) noch *Musca inferior* (Wardhaugh et al. 2001) Effekte nachgewiesen werden.

In den in diesem Vorhaben durchgeführten Tests mit Moxidectin wurden folgende Wirkdaten (EC50 plus Standardabweichung) bestimmt:

<i>Musca domestica</i> (CH):	26,64 (7,54 – 288,5) mg/kg Dung FG = 189, 9 mg/kg Dung TG
<i>Musca domestica</i> (S):	12,95 (3,09 – 40,92) mg/kg Dung FG = 92,3 mg/kg Dung TG
<i>Scathophaga suilla</i> (CH):	8,92 (3,88 – 24,21) mg/kg Dung FG = 63,6 mg/kg Dung TG

4. Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

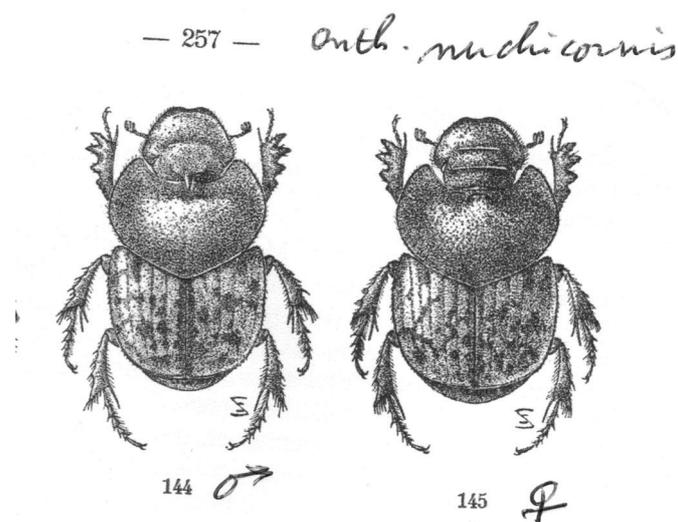
- Die im Rahmen der Treffen der Aveiro-Gruppe erarbeiteten Überlegungen zum Higher-Tier-Testing von Dungorganismen im Rahmen der Umweltrisikobeurteilung von Veterinärpharmaka wurden veröffentlicht bzw. ein entsprechendes Manuskript für die Veröffentlichung vorbereitet.
- Weniger erfolgreich verlief die Auswahl weiterer Test-Arten von Dungkäfern neben der schon bisher eingesetzten Spezies *Aphodius constans*. Entgegen den Erwartungen ist auch bei in der Literatur empfohlenen Spezies die Zucht ein erhebliches Problem.
- Die Modifikation bzw. Neuentwicklung von Reproduktions-Tests mit *Aphodius constans* in Hinsicht auf die Verwendung sublethaler Endpunkte ist weit vorangeschritten. Sowohl die Verlängerung des schon als OECD „Guidance Documents“ (2010) vorliegenden Larventests von 21 auf 70 Tage als auch ein mit adulten Käfern startender Reproduktionstest erwiesen sich bei der Untersuchung von Ivermectin und Moxidectin als empfindlicher im Vergleich zum existierenden OECD-Larventest. Die Frage, ob die höhere Sensitivität den erhöhten Testaufwand rechtfertigt, ist dagegen noch nicht entschieden.
- Beim Vergleich der hier vorgestellten Daten mit Literaturangaben zur Wirkung von Ivermectin und Moxidectin auf *Aphodius*-Spezies zeigt sich, dass die Auswahl der Messendpunkte sowie die Empfindlichkeit der verlängerten Tests gut mit bisher publizierten Erfahrungen korrespondieren. Allerdings ist noch nicht geklärt, wie im Einzelnen die Attraktivität von mit Ivermectin oder Moxidectin kontaminierten Dunghaufen bei der Bewertung berücksichtigt werden kann.
- In Tests mit verschiedenen Arten aus der Familie der Schwingfliegen (Sepsidae) ließ sich bestätigen, dass diese kleinen Dipteren gerade für Tests mit Endpunkten wie Schlupfrate oder Entwicklungsdauer gut geeignet sind. In diesen Versuchen wurden zudem bisher vernachlässigte Fragen wie z.B. Unterschiede hinsichtlich der Wirkung von Veterinärpharmaka auf einzelne Populationen der gleichen Art untersucht. Da diese Fliegen zudem einfach zu züchten sind, ist nach jetzigem Kenntnisstand eine weitergehende Prüfung ihrer Eignung als Testorganismen zu empfehlen. Zudem können verschiedene, evtl. lokale Arten, in verschiedenen Weltregionen mit den gleichen Methoden zum Einsatz kommen.

- Neben den zahlreichen Sepsiden (Sepsidae) stehen nun für die Fliegenfamilien Muscidae und Scathophagidae zumindest zwei Artenvertreter für Tests zur Verfügung, wodurch Effekte der phylogenetischen Verwandtschaft auf die Empfindlichkeit zumindest grob eingeschätzt (korreliert und letztlich kontrolliert) werden können. Bei allen Arten können neben der Mortalität (lethaler Effekt) zumindest die beiden sublethalen Endpunkte adulte Körpergröße und Entwicklungsdauer (Ei – Adulttier) einfach abgeschätzt werden.

4.2 Ausblick

Die Standardisierung eines Tests mit einer Käferart, die eine andere ökologische Rolle als *Aphodius constans* spielt, wird weiter verfolgt. Zum Zeitpunkt des Abschlusses dieses Berichts wurde ein internationaler Ringtest mit der aus kanadischen Freilandfängen stammenden Art *Onthophagus nuchicornis* (Abb. 15). an dem insgesamt neun Laboratorien aus fünf Ländern teilnehmen, begonnen. Diese Aktivität wird vom UBA im Rahmen des Vorhabens „Bereitstellung von Dungkäfern zur Durchführung eines Ringtestes als Voraussetzung der Implementierung eines OECD Leitfadens (FKZ 360 14 012) unterstützt. Ergebnisse dürften zum Jahreswechsel 2010/2011 zu erwarten sein. Eine Einarbeitung der dabei gemachten Erfahrungen in das bestehende OECD Guidance Document oder die Erstellung einer eigenen Richtlinie sowie die Abfassung einer Publikation werden dann die nächsten Schritte sein. Diese Arbeiten werden in enger Abstimmung mit dem Auftraggeber (UBA) sowie der EMA erfolgen.

Abb. 15: Abbildung beider Geschlechter der Testspezies *Onthophagus nuchicornis* (Quelle: J-P. Lumaret)



Diverse Arten von Schwingfliegen (Sepsidae) erwiesen sich gerade für Tests mit Endpunkten wie Schlupfrate oder Entwicklungsdauer als gut geeignet. Da diese Fliegen einfach zu züchten sind, ist nach jetzigem Kenntnisstand eine weitergehende Prüfung ihrer Eignung als Testorganismen zu empfehlen. Zudem könnten verschiedene, evtl. lokale Arten in verschiedenen Weltregionen mit den gleichen Methoden zum Einsatz kommen. In den Sepsiden-Versuchen wurden weiterhin bisher vernachlässigte Fragen untersucht, wie z.B. Unterschiede hinsichtlich der Wirkung von Veterinärpharmaka auf einzelne Populationen der gleichen Art, oder auch mögliche Unterschiede der Wirkung unter kontrollierten, konstanten Labor- vs. Freilandbedingungen. Neben mehreren Schwingfliegenarten (Sepsidae) stehen nun auch für die Fliegenfamilien Muscidae und Scathophagidae zumindest zwei Artenvertreter für Tests zur Verfügung, wodurch Effekte der phylogenetischen Verwandtschaft auf die Empfindlichkeit zumindest grob eingeschätzt, korreliert und letztlich kontrolliert werden können. Bei allen Arten können neben der Mortalität (lethaler Effekt) zumindest die beiden sublethalen Endpunkte adulte Körpergröße und Entwicklungsdauer (Ei – Adulttier) einfach erfasst werden.

Abschließend ist darauf hinzuweisen, dass die hier beschriebenen Arbeiten und Erkenntnisse in das vor kurzem gestartete UBA-Projekt „Vergleich der Dungfauna- und Pflanzenökosysteme auf ivermektin-belasteten und -unbelasteten Weideflächen als Beispiel für Auswirkungen eines Tierarzneimittelwirkstoffes (FKZ 371063412)“ einfließen werden. In diesem Vorhaben werden sowohl die Biodiversität von Dungorganismengemeinschaften (speziell Käfern) als auch deren ökologische Funktionen und Leistungen betrachtet werden (Hutton & Giller 2003; Nichols et al. 2008). Zudem werden die Aktivitäten der SETAC-Advisory-Group DOTTS (z.B. die Organisation eines Sitzungsblocks bei der nächsten SETAC-Europe Tagung (May 2011, Mailand)) weiter geführt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Adler, N., Hickmann, S., Bachmann, J. & Römbke, J. (2009): Higher tier test strategies for dung fauna organisms during the authorization process of antiparasiticides. Poster, SETAC-Europe Conference, Seville (Spain).
- Doube, B.M. (1990): A functional classification for analysis of the structure of dung beetles assemblages. *Ecological Entomology* 15:371-383.
- Errousissi, F., Alvinerie, M., Galtier, P., Kerboeuf, D. & Lumaret, J.P. (2001): The negative effects of the residues of Ivermectin in cattle dung using a sustained-release bolus on *Aphodius constans* (Duft.) (Coleoptera: Aphodiidae). *Vet Res* 32: 421-427.
- Errousissi, F. & Lumaret, J.P. (2010): Field effects of faecal residues from ivermectin slow-release boluses on the attractiveness of cattle dung to dung beetles. *Medical Veterinary Entomology* (in press; DOI 10.1111/j.1365-2915.2010.00891).
- Farkas, R., Gyurcsó, A. & Börzsönyi, L. (2003): Fly larval activity in the faeces of cattle and pigs treated with endectocide products. *Medical Veterinary Entomology* 17: 301-306.
- Finnegan, P.M., Flanagan, D.P. & Gormally, M.J. (1997): Preliminary investigations of *Aphodius* species activity in cattle faeces treated with ivermectin. *Medical Veterinary Entomology* 11: 139-142.
- Finney, D.J. (1971): *Probit Analysis*. Cambridge University Press.
- Floate, K.D. (1998): Off-target effects of ivermectin on insects and on dung degradation in southern Alberta, Canada. *Bulletin of Entomological Research* 88, 25–35.
- Floate, K.D., Colwell, D.D. & Fox, A.S. (2002): Reductions of non-pest insects in dung of cattle treated with endectocides: a comparison of four products. *Bulletin of Entomological Research* 92: 471-481.
- Floate, K.D. & Fox, A.S. (1999): Indirect effects of ivermectin residues across trophic levels: *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) and *Muscidifurax zaraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Bull. Ent. Res.* 89: 225-229.
- Floate, K.D., Spooner W. & Colwell, D.D. (2001): Larvicidal activity of endectocides against pest flies in the dung of treated cattle. *Med. Vet. Entomol.* 15: 117-120.
- Floate, K.D., Wardhaugh, K.G., Boxall, A.B., Sherratt, T.N. (2005): Fecal residues of veterinary parasiticides: Nontarget effects in the pasture environment. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 153-179.
- Floate, K.D. (2007): Endectocide residues affect insect attraction to dung from treated cattle: implications for toxicity tests. *Medical Veterinary Entomology* 21: 312-322.
- Hempel, H., Scheffczyk, A., Schallnaß, H.-J., Lumaret, J.-P., Alvinerie, M. & Römbke, J.

- (2006): Effects of four veterinary pharmaceuticals on the dung beetle *Aphodius constans* in the laboratory. *Envir. Toxicol. Chem.* 25: 3155-3163.
- Hutton, S.A. & Giller, P.S. (2003): The effects of intensification of agriculture on northern temperate beetle communities. *J. Applied Ecology* 40: 994-1007.
- Iwasaa, M., Nakamura, T., Fukakia, K. & Yamashita, N. (2005): Nontarget Effects of Ivermectin on Coprophagous Insects in Japan. *Environmental Entomology* 34:1485-1492.
- Jochmann, R., Blanckenhorn, W., Bussière, L., Jensen, J., Kryger, U., Lahr, J., Lumaret, J-P., Römbke, J., Wardhaugh, K., Floate, K. (2010): How to test non-target effects of veterinary pharmaceutical residues in livestock dung in the field. *Integr. Envir. Assess. Management* (in press)
- Liebig, M., Alonso, A., Blübaum-Gronau, E., Boxall, A., Brinke, M., Carbonell, G., Egeler, P., Fenner, K., Fernandez, C., Fink, G., Garric, J., Halling-Sørensen, B., Knacker, T., Krogh, K.A., Küster, A., Löffler, D., Porcel Cots, M.A., Pope, L., Prase, C., Römbke, J., Rönnefahrt, I., Schneider, M.K., Schweitzer, N., Tarazona, J.V., Ternes, T.A., Traunspurger, W., Wehrhan, A. & Duis, K. (2010): Environmental Risk Assessment of Ivermectin – A Case Study with a Veterinary Pharmaceutical. *IEAM 6, Suppl. 1*: 567-587.
- Lumaret, J-P., Alvinerie, M., Hempel, H., Schallnaß, H-J., Claret, D. & Römbke, J. (2007): New screening test to predict the potential impact of ivermectin-contaminated cattle dung on dung beetles. *Veterinary Research* 38: 15-24.
- Lumaret, J-P., Errouissi, F., Floate, K., Roembke, J. & Wardhaugh, K. (2010): A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in the terrestrial and aquatic environment. In: *Current Pharmaceutical Biotechnology* (in press).
- Madsen, M., Overgaard-Nielsen, B., Holter, P., Pedersen, O.C., Brøchner Jespersen, J., Vagn Jensen, K-M., Nansen, P. & Grønvold, J. (1990): Treating cattle with ivermectin: Effects on the fauna and decomposition of dung pats. *J Appl Ecol.* 27: 1-15.
- Nichols, E., Spector, S., Louzada, J., Larsen, T., Amezquita, S., Favila, M.E. & The Scarabaeinae Research Network (2008): Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. *Biological Conservation* 141: 1461-1474.
- N.N. (2005): A guide to dung beetles. Brochure, Fort Dodge, 8 pp.
- OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development) (2010) OECD Guidance Document on the Determination of the Toxicity of a Test Chemical to Dung Beetles.

Draft. Paris, France.

- OECD (Organisation for Economic Co-Operation and Development) (2008): OECD Guidelines for the testing of Chemicals. Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies (*Scathophaga stercoraria* L. (Scathophagidae), *Musca autumnalis* De Geer (Muscidae)). OECD 228. Paris, France.
- O'Hea, N.M., Kirwan, L., Giller, P.S. & Finn, J.A. (2010): Lethal and sub-lethal effects of ivermectin on north temperate dung beetles, *Aphodius ater* and *Aphodius rufipes* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Conservation and Diversity* 3: 24-22.
- Römbke, J., Hempel, H., Scheffczyk, A., Schallnaß, H-J., Alvinerie, M. & Lumaret, J-P. (2007): Environmental risk assessment of veterinary pharmaceuticals: development of a standard laboratory test with the dung beetle *Aphodius constans*. *Chemosphere* 70: 57-64.
- Römbke, J., Floate, K.D., Jochmann, R., Schäfer, M.A., Puniamoorthy, N., Knäbel, S., Lehmus, J., Rosenkranz, B., Scheffczyk, A., Schmidt, T., Sharples, A., Blanckenhorn, W.U. (2009): Lethal and sublethal toxic effects of a test chemical (ivermectin) on the Yellow Dung Fly (*Scathophaga stercoraria*) based on a standardized international ring test. *Envir. Toxicol. Chem.* 28: 2117-2124.
- Römbke, J., Barrett, K., Blanckenhorn, W.U., Hargreaves, T., Knäbe, S., Lehmus, J., Lumaret, J-P., Rosenkranz, B., Scheffczyk, A. & Sekine, T. (2010): Results of an international ring test with the dung fly *Musca autumnalis* in support of a new OECD test guideline. *Science Total Environ.* 408: 4102-4106..
- Römbke, J., Coors, A., Fernandez, A.A., Fernandez, C., Förster, B., Jensen, J., Lumaret, J.P., Porcel Cots, M.A., Liebig, M. (2010): Effects of the parasiticide ivermectin on the structure and function of dung and soil invertebrate communities in the field (Madrid, Spain). *Applied Soil Ecology* 45: 284–292.
- Römbke, J., Lumaret, J-P., Scheffczyk, A. & Adler, N. (2010): Recent advantages of dung organisms testing in the context of the risk assessment of veterinary pharmaceuticals. Poster, SETAC-Europe Conference, Seville (Spain).
- Sommer, C., Steffansen, B., Nielsen, B.O., Grønvold, J., Vagn Jensen, K.M., Jespersen, J.B., Springborg, J. & Nansen, P. (1992): Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pour-on treatment: concentrations and impact on dung fauna. *Bull. Entomol. Res.* 82: 257-64.
- Strong, L. & Wall, R. (1994): Effects of ivermectin and moxidectin on the insects of cattle dung. *Bull. Entomol. Res.* 84: 403-409.

ToxRat Solutions. 2003. ToxRat[®]. Software for the statistical analysis of biotests. Alsdorf, Germany.

Wardhaugh, K.G., Holter, P., Whitby, W.A. & Shelley, K. (1996): Effects of drug residues in the faces of cattle treated with injectable formulations of ivermectin and moxidectin on larvae of the bush fly, *Musca vetustissima* and the house fly *Musca domestica*. Aust. Vet. J. 74: 370-374.

Wardhaugh K.G., Mahon, R.J. & Bin Ahmad, H. (2001): Efficacy of macrocyclic lactones for the control of larvae of the Old World screw-worm Fly, *Chrysomya bezziana*. Aust. Vet. J. 79: 121-124.

Webb, L., Beaumont, D.J., Nager, R.G. & McCracken, D.I. (2010): Field-scale dispersal of *Aphodius* dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) in response to avermectin treatments on pastured cattle. Bull. Ent. Res. 100: 175-183.