

TEXTE

57/2016

# Prüfungslücke bei der Biozidbewertung: Wirkungsrelevanz von Repellentien (Produktart 19) für Nichtzielorganismen (Insektenlarven, Krebse) in Oberflächengewässern, Teil 2: Laborstudie

Langfassung



TEXTE 57/2016

Umweltforschungsplan des  
Bundesministeriums für Umwelt,  
Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit

Forschungskennzahl 3712674172  
UBA-FB-002202

**Prüfungslücke bei der Biozidbewertung:  
Wirkungsrelevanz von Repellentien  
(Produktart 19) für Nichtzielorganismen  
(Insektenlarven, Krebse) in  
Oberflächengewässern,  
Teil 2: Laborstudie**

von

Prof. Dr. Eric von Elert, Zoologisches Institut, Universität zu Köln, Köln

PD Dr. Patrick Fink, Zoologisches Institut, Universität zu Köln, Köln

Zoologisches Institut, Biozentrum, Zulpicher Str. 47 B, 50674 Köln

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Abschlussdatum 31. Mai 2015

# Impressum

**Herausgeber:**

Umweltbundesamt  
Wörlitzer Platz 1  
06844 Dessau-Roßlau  
Tel: +49 340-2103-0  
Fax: +49 340-2103-2285  
info@umweltbundesamt.de  
Internet: www.umweltbundesamt.de

 /umweltbundesamt.de

 /umweltbundesamt

**Durchführung der Studie:**

Zoologisches Institut, Biozentrum, Zülpicher Str. 47 B, 50674 Köln

**Abschlussdatum:**

31. Mai 2015

**Redaktion:**

IV 2.5, Dr. Michael Feibicke

**Publikationen als pdf:**

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen/>

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, Juli 2016

Das diesem Bericht zu Grunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit unter der Forschungskennzahl 3712674172 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

## Kurzbeschreibung

Als Repellent werden Wirkstoffe bezeichnet, die von einem Organismus über den Geruchssinn wahrgenommen werden und diesen abschrecken, ohne ihn zu töten. In der praktischen Anwendung werden Repellentien vor allem gegen blut saugende Gliederfüßer wie Stechmücken, Bremsen oder Zecken eingesetzt. Künstliche Repellentien gegen Gliederfüßer sind beispielsweise Diethyltoluamid (DEET), Icaridin (Picaridin) oder IR3535 (Ethylbutylacetylaminopropionat, EBAAP). Auch bei bestimmungsgemäßem Einsatz könnten von Repellentien bisher nicht beachtete Wirkungen auf Nicht-Zielorganismen ausgehen. Deshalb wurden die Repellentien DEET, EBAAP und Icaridin auf ihre Wirkung auf das Verhalten von vier verschiedenen aquatischen Invertebraten untersucht. Dabei handelt es sich um einen Test, in dem das Ausweichverhalten im Zooplankton am Beispiel eines Vertreters der Daphniidae (Wasserflöhe) untersucht wurde. In einem weiteren Test mit dem Endpunkt ‚organismische Drift in Fließgewässern‘ wurden als benthische Invertebrate je ein Vertreter der Gammaridae (Bachflohkrebse) und der Larven der Baetidae (Eintagsfliegen) untersucht. In einem weiteren Test wurde die driftunabhängige Repellentwirkung auf eine aquatische Lungenschnecke (Lymnaeidae) quantifiziert. In allen drei Tests wurde untersucht, ob von DEET, EBAAP oder Icaridin eine Repellentwirkung auf die Nicht-Zielorganismen ausgeht. Die Verhaltenstests mit Daphnien ermöglichen zudem, auch eine mögliche störende Wirkung der Repellentien auf Verhaltensänderungen, die durch natürliche Infochemikalien induziert werden, zu erfassen (‘Infochemikalieneffekt’ nach Klaschka; 2008). In den mehrfach replizierten Versuchen wurden die drei Repellentien als Einzelsubstanzen mit nominellen Konzentrationen von 5 pg/L bis zu 50 µg/L eingesetzt.

## Abstract

Repellents are compounds that are perceived via olfaction by an organism that then is deterred without being killed. Repellents are mainly applied against blood-sucking arthropods as mosquitoes, horse flies or ticks. Synthetic repellents are e.g. diethyltoluamide (DEET), Icaridin (Picaridin) or IR3535 (ethyl 3-(N-butylacetamido) propionate, EBAAP). Even in case of proper use repellents may affect non-target organisms. Therefore we investigated the effects of the repellents DEET, EBAAP and Icaridin on the behaviour of four species of aquatic invertebrates. One assay investigated the escape behaviour of zooplankton using a representative of the Daphniidae (water fleas). In another assay organismic drift in running waters was assessed using benthic invertebrates, i.e. one representative of the Gammaridae (freshwater shrimps) and of larvae of the Baetidae (mayflies). In another assay, the repellent effect on an aquatic pulmonate snail (Lymnaeidae) was quantified. All three assays investigated if DEET, EBAAP or Icaridin would repel these non-target organisms. In addition, the behavioural assays with daphnids allowed to test for an interference of the repellents with changes in behaviour in response to natural infochemicals (‘infochemical effect’ *sensu* Klaschka; 2008). In the replicated assays the three repellents were tested as single compounds with nominal concentrations from 5 pg/L up to 50 µg/L.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	8
Tabellenverzeichnis.....	10
Abkürzungsverzeichnis.....	11
Zusammenfassung .....	12
Summary .....	13
1 Einleitung.....	14
1.1 Ziel der Aufgaben .....	15
1.2 Aufgabenstellung und Lösungsweg.....	15
1.3 Untersuchte Repellentien und Versuchsorganismen.....	15
2 Material und Methoden .....	16
2.1 Untersuchungen mit <i>Daphnia magna</i> .....	16
2.1.1 Wachstumsraten, Gelegegrößen und Size at First Reproduction .....	16
2.1.1.1 Gelegegröße .....	17
2.1.1.2 Size at First Reproduction .....	17
2.1.1.3 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien .....	17
2.1.1.4 GC-MS Analytik der Repellentien .....	18
2.1.2 Effekte auf die Vertikalverteilung von <i>D. magna</i> .....	18
2.1.3 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien .....	19
2.2 Organismische Drift.....	20
2.2.1 Versuchsaufbau .....	20
2.2.2 Versuchsorganismen .....	21
2.2.3 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien .....	22
2.3 Versuche mit aquatischen Lungenschnecken.....	23
2.3.1 Versuchsaufbau .....	23
2.3.2 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien .....	24
3 Ergebnisse .....	24
3.1 Effekte auf <i>Daphnia magna</i> .....	24
3.1.1 Effekte auf Wachstum, Gelegegröße und Size at First Reproduction.....	25
3.1.1.1 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien .....	25
3.1.1.2 Effekte auf das Wachstum .....	27
3.1.1.3 Effekte auf die Gelegegröße .....	27
3.1.1.4 Effekte auf Infochemikalien-vermittelte Life-History Veränderungen .....	28
3.1.2 Effekte auf die Vertikalverteilung von <i>D. magna</i> .....	29

3.1.2.1	Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien	29
3.1.2.2	Direkte Effekte auf die Vertikalverteilung	31
3.1.2.3	Effekte auf Infochemikalien-induziertes Verhalten	33
3.2	Organismische Drift.....	34
3.2.1	Versuchsorganismus <i>Gammarus pulex</i> (Crustacea, Gammaridae).....	34
3.2.2	Versuchsorganismus <i>Cloeon dipterum</i> (Ephemeroptera, Baetidae).....	35
3.2.3	Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien .....	37
3.3	Effekte auf das Verhalten einer aquatischen Lungenschnecke.....	38
3.3.1	Verhalten von <i>Lymnaea stagnalis</i> .....	38
3.3.2	Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien .....	40
4	Quellenverzeichnis.....	41
5	Stellungnahmen zu Rückfragen.....	43
5.1	Elutionsverhalten des IS im Vergleich zu den Repellentien.....	43
5.2	Interferenzen bei Zielionen der Repellentien mit Untergrund und matrixgestützte Standards zur Eichung .....	43
5.3	Einengen der Proben am Rotationsverdampfer.....	44

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformeln der Repellentien Diethyltoluamid (DEET), Icaridin und Ethylbutylacetylaminopropionat (EBAAP).....	14
Abbildung 2:	Temperaturprofil in der 'Planktonorgel'.....	19
Abbildung 3:	Technische Skizze des Driftmeters (modifiziert nach Werth & Marten, 2007).....	20
Abbildung 4:	Schemazeichnung der Lochgefäße aus den Verhaltensbiotests mit <i>L. stagnalis</i> (aus Fink et al. 2006b).....	23
Abbildung 5:	Wiederfindungsraten der Repellentien im Life-History Ansatz.....	26
Abbildung 6:	Somatische Wachstumsraten von <i>D. magna</i> mit und ohne Repellentien .....	27
Abbildung 7:	Größe des ersten Geleges von <i>D. magna</i> mit und ohne Repellentien. ....	28
Abbildung 8:	Größe bei der ersten Reproduktion von <i>D. magna</i> mit und ohne fischbürtige Kairomone .....	29
Abbildung 9:	Wiederfindungsraten der Repellentien Plankton-Orgel Versuchen.....	30
Abbildung 10:	'Planktonorgel' zur Erfassung direkter Effekte der Repellentien auf die Vertikalverteilung von <i>D. magna</i> .....	31
Abbildung 11:	Aufenthaltstiefe von <i>D. magna</i> in einer geschichteten Wassersäule mit und ohne DEET .....	32
Abbildung 12:	Aufenthaltstiefe von <i>D. magna</i> in einer geschichteten Wassersäule mit und ohne EBAAP .....	32
Abbildung 13:	Aufenthaltstiefe von <i>D. magna</i> in einer geschichteten Wassersäule mit und ohne Icaridin .....	32
Abbildung 14:	'Planktonorgel' zur Erfassung der Vertikalverteilung von <i>D. magna</i> in einer stratifizierten Wassersäule mit fischbürtigen Kairomonen.....	33
Abbildung 15:	Aufenthaltstiefe von <i>D. magna</i> in einer geschichteten Wassersäule mit fischbürtigen Kairomonen und Repellentien.....	34
Abbildung 16:	Driftrate von <i>Gammarus pulex</i> in Abhängigkeit der Konzentration der Repellentien A) DEET, B) EBAAP oder C) Icaridin. ....	35
Abbildung 17:	Driftverhältnis von <i>Cloeon dipterum</i> in Abhängigkeit der Konzentrationen der Repellentien A) DEET, B) EBAAP oder C) Icaridin.....	36
Abbildung 18:	Wiederfindungsraten der Repellentien in den Driftversuchen.....	37
Abbildung 19:	Keine Verhaltensreaktion der Lungenschnecke <i>Lymnaea stagnalis</i> auf die Repellentien A) DEET, B) EBAAP oder C) Icaridin.....	39
Abbildung 20:	Wiederfindungsraten der Repellentien in den Verhaltensversuchen mit der Lungenschnecke <i>L. stagnalis</i> .....	40

Abbildung 21:	Keine unterschiedliche Elution von Atrazin (IS) und Repellentien von der C18-SPE.....	43
Abbildung 22:	Overlay der ‚Extracted Ion Chromatogramme‘ für m/z 130 (Zielion für EBAAP) einer Probe und einer Kontrolle.....	44
Abbildung 23:	Effekte des Einrotierens auf die Wiederfindung der Repellentien.....	45

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Untersuchte Repellentien .....	15
Tabelle 3:	Mittlere Wiederfindungsraten (+/- SE) der Repellentien in den Life-History Versuchen.....	26
Tabelle 4:	Nominal- und Effektivkonzentrationen der Repellentien in den Life-History Versuchen.....	26
Tabelle 5:	Mittlere Wiederfindungsraten (+/- SE) der Repellentien in den Plankton-Orgel Versuchen .....	30
Tabelle 6:	Nominal- und Effektivkonzentrationen der Repellentien in den Plankton-Orgel Versuchen .....	30
Tabelle 7:	Mittlere Wiederfindungsraten (+/- SE) der Repellentien in den Driftversuchen .....	37
Tabelle 8:	Nominal- und Effektivkonzentrationen der drei Repellentien in den Driftversuchen .....	38
Tabelle 9:	Mittlere Wiederfindungsraten (+/- SE) der Repellentien in den Verhaltensversuchen mit der Lungenschnecke <i>L. stagnalis</i> .....	40
Tabelle 10:	Nominal- und Effektivkonzentrationen der drei Repellentien in den Verhaltensversuchen mit der Lungenschnecke <i>L. stagnalis</i> .....	41

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ANOVA</b>	Analysis of variance (Varianzanalyse)
<b>DEET</b>	N,N-Diethyl-m-toluamid = Diethyltoluamid
<b>DVM</b>	Diel vertical migration (tagesperiodische Vertikalwanderung)
<b>EBAAP</b>	3-(N-n-Butyl-N-acetyl-amino)-propionsäureethylester = Ethylbutylacetylaminopropionat
<b>GC-MS</b>	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
<b>IR3535</b>	3-(N-n-Butyl-N-acetyl-amino)-propionsäureethylester = Ethylbutylacetylaminopropionat
<b>IS</b>	Interner Standard
<b>SFR</b>	Size at first reproduction (Körpergröße bei der 1. Reproduktion)
<b>SE</b>	Standard Error

## Zusammenfassung

Im Rahmen einer Laborstudie wurden die Repellentien DEET, EBAAP und Icaridin auf ihre Wirkung auf die aquatischen Nicht-Zielorganismen *Daphnia magna*, *Gammarus pulex*, *Cloeon dipterum* und *Lymnaea stagnalis* untersucht.

In Life-history Versuchen mit *D. magna* konnten für alle drei Repellentien im Bereich von 5 ng/L bis zu 50 µg/L keine Effekte auf juveniles Wachstum und die Größe des ersten Geleges gezeigt werden, so dass subletale Toxizitätseffekte ausgeschlossen werden können. In thermisch geschichteten Wassersäulen, in denen die Repellentien im Epilimnion in Konzentrationen von 5 ng/L bis zu 50 µg/L eingebracht wurden, konnte kein Ausweichen der Daphnien aus dem Epilimnion in das Repellent-freie Hypolimnion beobachtet werden. Fischbürtige Kairomone induzierten in den thermisch geschichteten Wassersäulen ein Räubervermeidungsverhalten, das sich im Aufenthalt der Daphnien im Hypolimnion äußerte. Dieses Räubervermeidungsverhalten trat unverändert auch dann auf, wenn im Hypolimnion einzelne Repellentien eingebracht wurden. Fischbürtige Kairomone induzieren zudem eine verminderte 'Size at first Reproduction' (SFR). Auch dieser Effekt der natürlichen Kairomone wurde von der Anwesenheit der Repellentien (4 - 5 µg/L) nicht beeinflusst. Zusammenfassend zeigten alle drei Repellentien weder einen Repellent-Effekt auf das Verhalten von Daphnien, noch störten sie die durch natürliche Fischkairomone induzierten Änderungen des Verhaltens und der SFR bei *D. magna*.

In einem Testsystem zur Erfassung der organismischen Drift wurde eine mögliche Induktion der vermehrten Drift durch Repellentien mit zwei verschiedenen aquatischen Invertebraten untersucht – dem Gammariden *Gammarus pulex* und der Ephemeropterenlarve *Cloeon dipterum*. Es konnte für keines der drei getesteten Repellentien in einem Konzentrationsbereich von 5 pg/L bis 50 µg/L eine Veränderung der Drift der beiden Testorganismen beobachtet werden, wohingegen in Positivkontrollen mit einem Insektizid für beide Testorganismen eine Induktion von Drift beobachtet wurde. Im Gegensatz zu Insektiziden scheinen die ausgewählten Repellentien keine Effekte auf die organismische Drift von Nicht-Zielorganismen in einem umweltrelevanten Konzentrationsbereich zu haben.

In dem dritten verwendeten Testsystem wurden die Effekte der Repellentien auf das Bewegungs- und Futtersuchverhalten einer aquatischen Lungenschnecke (*Lymnaea stagnalis*) untersucht. Ähnlich wie bereits bei den anderen beiden Testsystemen konnten keine Effekte der drei Repellentien (in einem Konzentrationsbereich von 5 pg/L bis 50 µg/L) auf das Verhalten von *L. stagnalis* beobachtet werden. Es scheint keine Scheuchwirkung der hier ausgesuchten Repellentien auf diese benthischen Herbivoren zu geben, was auch eine Interaktion der Repellentien mit natürlichen Infochemikalien ('Infochemikalieneffekt' nach Klaschka; 2008) unwahrscheinlich macht.

## Summary

In a laboratory study we investigated effects of the arthropod repellents DEET, EBAAP and Icaridin on the aquatic non-target organisms *Daphnia magna*, *Gammarus pulex*, *Cloeon dipterum* and *Lymnaea stagnalis*.

In Life-history experiments with *D. magna* concentrations of each of the three repellents ranging from 5 ng/L to 50 µg/L did neither affect juvenile growth rates, nor egg numbers of the first clutch, so that sublethal effects can be excluded. In thermally stratified water columns, in which the repellents were present in the epilimnion in concentrations ranging from 5 ng/L to 50 µg/L, no evasion of *D. magna* from the epilimnion into the repellent-free hypolimnion was observed. In these stratified water columns fish borne kairomones induced predator-avoidance behaviour, i.e. a residence of *Daphnia* in the hypolimnion. This predator-avoidance remained unaffected, if repellents were present in the hypolimnion. In addition, fish borne kairomones induce a reduced 'Size at first Reproduction' (SFR). This effect of natural kairomones remained unaffected by the presence of repellents (4 - 5 µg/L). In summary, it can therefore be concluded that each of the three repellents neither repelled *D. magna* nor interfered with inducible changes in behaviour or SFR in response to fish borne kairomones.

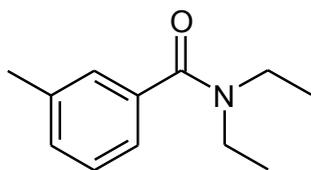
A potential induction of drift behaviour by repellents in two aquatic invertebrates (the amphipod *Gammarus pulex* and larvae of the mayfly *Cloeon dipterum*) was tested in a test system for the recording of organismic drift. Across a concentration range from 5 pg/L to 50 µg/L, no increased drift could be recorded for any of the repellents and test organisms, respectively. In contrast, positive controls with an insecticide induced strongly increased drift behaviour in both test organisms, thus demonstrating the functionality of the assay. Hence, in contrast to insecticides, repellents appear not to affect the drift behaviour of aquatic non-target organisms in an environmentally relevant concentration range.

In the third test system, we assessed the effects of the three repellents on the movement and foraging behaviour of an aquatic pulmonate gastropod (*Lymnaea stagnalis*). Similar to the previous two test systems, no effects of the three repellents (in a concentration range from 5 pg/L to 50 µg/L) on the behaviour of *L. stagnalis* could be observed. Hence, there appears to be no deterrent activity of repellents on these benthic herbivores, which makes interactions with natural infochemicals ('infochemical-effects', Klaschka; 2008) unlikely.

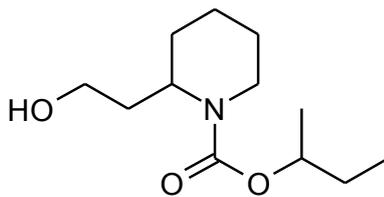
## 1 Einleitung

Als Repellentien werden Wirkstoffe bezeichnet, die von einem Organismus über den Geruchssinn wahrgenommen werden und diesen abschrecken, ohne ihn zu töten. In der praktischen Anwendung werden Repellentien vor allem gegen Blut saugende, krankheitsübertragende Gliederfüßer wie Stechmücken, Bremsen oder Zecken eingesetzt. Künstliche Repellentien gegen Gliederfüßer sind beispielsweise Diethyltoluamid (DEET), Icaridin (Picaridin) oder IR3535 (Ethylbutylacetylaminopropionat, EBAAP; Abbildung 1). Auch bei bestimmungsgemäßem Einsatz könnten von Repellentien bisher nicht beachtete Wirkungen auf Nicht-Zielorganismen ausgehen. Aufgrund der Repellentwirkung auf Zielorganismen wären die möglichen Wirkungen auf Nicht-Zielorganismen ebenfalls im Bereich von Verhaltensänderungen zu erwarten. Vor allem der Eintrag in Oberflächengewässer könnte bei aquatischen Arthropoden<sup>1</sup> bereits bei nicht-toxischen Konzentrationen zu veränderter Habitatnutzung führen, die durch indirekte Effekte wie veränderte Ressourcennutzung und Räuber-Beute Interaktionen zu weitreichenden Veränderungen der trophischen Interaktionen führen können (Turner and others 2000). Eine extreme Form der veränderten Habitatnutzung stellt dabei das Ausweichen in andere Habitate dar, wie es v.a. in Fließgewässern der aktive Übergang von Organismen in die Drift darstellt (Elliott 2002; 2003).

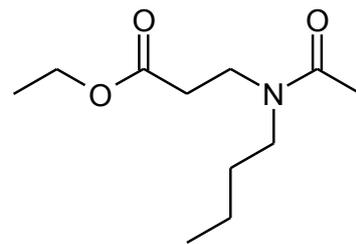
Abbildung 1: Strukturformeln der Repellentien Diethyltoluamid (DEET), Icaridin und Ethylbutylacetylaminopropionat (EBAAP)



DEET (CAS 134-62-3)



Icaridin (CAS 119515-38-7)



EBAAP (CAS 52304-36-6)

In Fließgewässern und Seen werden zahlreiche Prozesse durch Infochemikalien gesteuert; dies gilt insbesondere für Kairomon<sup>2</sup>-vermittelte Räuber-Beute Interaktionen und für die Lokalisation von Futter (für eine Übersicht s. Von Elert 2012). Diese indirekten Effekte steuern ökosystemweit trophische Interaktionen und Stoffflüsse (Pohnert 2007). Für mehrere induzierbare Verteidigungen gegen Räuber ist gezeigt, dass sie auch durch Xenobiotika hervorgerufen werden und/oder die Perzeption der Kairomone durch die Fremdstoffe gestört wird, die im letzteren Fall als ‚Infodisrupter‘ fungieren; entsprechend hat die Störung der natürlichen chemischen Kommunikation weitreichende Folgen für die Funktion von Ökosystemen und ihr Management (Lürling and Scheffer 2007). Gemäß Klaschka (2008; 2009) können solche Störungen natürlicher chemischer Kommunikation durch Xenobiotika als 'Infochemikalieneffekt' bezeichnet werden.

In einer Literaturstudie über mögliche Infochemikalieneffekte von Xenobiotika (Nendza and others 2013) wurden die drei Repellentien DEET, EBAAP und Icaridin als vorrangig zu untersuchende Substanzen vorgeschlagen. DEET wurde in Oberflächengewässern in Konzentrationen von bis zu 1,13

<sup>1)</sup> Gliederfüßer, zu denen u.a. Insekten, Krebse und Spinnen gehören

<sup>2)</sup> Botenstoff zwischen 2 verschiedenen Arten, bei denen nur der Empfänger die Botschaft nutzt

µg/L (Costanzo and others 2007) und Icaridin in Konzentrationen bis zu 2,2 µg/L nachgewiesen (Nendza and others 2013). Für EBAAP liegen keine Angaben vor (Nendza and others 2013).

## 1.1 Ziel der Aufgaben

Es sollten die Repellentien DEET, EBAAP und Icaridin auf ihre Wirkung auf Invertebrate in Oberflächengewässern im Rahmen einer Laborstudie geprüft werden. Die Ergebnisse sollten ggf. in die Entscheidungsfindung beim Vorgehen in anderen Regelungsbereichen und bei der Beurteilung anderer Stoffe im Hinblick auf negative Effekte auf Biozönosen von Oberflächengewässern einfließen.

## 1.2 Aufgabenstellung und Lösungsweg

Im Rahmen einer Laborstudie sollten drei verschiedene Verhaltenstests mit aquatischen Invertebraten<sup>3</sup> etabliert werden. Dabei handelt es sich um einen Test, in dem das Ausweichverhalten im Zooplankton am Beispiel eines Vertreters der Daphniidae untersucht wird. In einem weiteren Test mit dem Endpunkt ‚organismische Drift in Fließgewässern‘ wurden als benthische Invertebrate je 1 Vertreter der Gammaridae<sup>4</sup> und der Larven der Baetidae<sup>5</sup> untersucht. In einem weiteren Test wurde die driftunabhängige Repellentwirkung auf eine aquatische Lungenschnecke (Lymnaeidae) quantifiziert. In allen drei Tests sollte untersucht werden, ob von DEET, EBAAP oder Icaridin eine Repellentwirkung auf die Nicht-Zielorganismen ausgeht. Der Verhaltenstest mit Daphnien<sup>6</sup> ermöglichte zudem zu untersuchen, ob Repellentien die durch natürliche Infochemikalien induzierte Verhaltensänderung beeinflussen (‘Infochemikalieneffekt‘ nach Klaschka; 2008). Mögliche Effekte der Repellentien auf das Verhalten der Invertebraten sollten in mehrfach replizierten Ansätzen über einen weiten Konzentrationsbereich untersucht werden.

## 1.3 Untersuchte Repellentien und Versuchsorganismen

Die untersuchten Repellentien DEET, EBAAP und Icaridin (Strukturformeln, Abbildung 1) zeichnen sich durch hohe Wasserlöslichkeit und Kow Werte im Bereich von 1,7 - 2,4 aus (Tabelle 1).

Tabelle 1: Untersuchte Repellentien

Substanzname	IUPAC Name	CAS	Bezug	Wasserlöslichkeit	log Kow	Abbaubarkeit
DEET	N,N-Diethyl-3-methylbenzamid	134-62-3	Sigma	11,2 g/L*	2,4*	nicht persistent*
EBAAP	3-(N-n-Butyl-N-acetylamino) propionsäure ethylester	52304-36-6	Sigma	70 g/L*	1,7*	nicht persistent*
Icaridin	1-(1-Methylpropoxycarbonyl)- 2-(2-hydroxyethyl) piperidin	119515-38-7	Saltigo**	8,2 g/L*	2,2*	potentiell persistent*

\*zitiert aus Nendza et al. 2013; \*\* als Referenzmaterial freundlicherweise überlassen

3) Wirbellose

4) sog. Flohkrebse

5) Familie innerhalb der Eintagsfliegen

6) Kleinkrebse, die allgemein als „Wasserflöhe“ bezeichnet

Um mögliche Effekte auf das Verhalten aquatischer Invertebraten zu erfassen, wurden mit dem Großer Wasserfloh *Daphnia magna* Versuche zur Vertikalverteilung in einer geschichteten Wassersäule durchgeführt. Begleitend wurden Life-History Versuche durchgeführt, um auf subletale Effekte der Repellentien zu testen (Tabelle 2).

Beim Bachflohkrebs *Gammarus pulex* und der Eintagsfliegenlarve *Cloeon dipterum* wurde untersucht, ob die Repellentien zu einer Erhöhung der Driftrate führen (Tabelle 2).

Mögliche Repellentwirkungen auf aquatische Schnecken wurden am Beispiel der Spitzschlammschnecke *Lymnaea stagnalis* untersucht, indem die Verteilung der Tiere in Gegenwart einer Punktquelle der Repellentien erfasst wurde (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Testorganismen

Art	Familie	Deutscher Name	Testsystem	Endpunkt
<i>Daphnia magna</i>	Daphniidae	Großer Wasserfloh	Vertikalverteilung, Life-History	Aufenthaltstiefe, Wachstumsrate, Size at first reproduction, Gelegegröße
<i>Gammarus pulex</i>	Gammaridae	Bachflohkrebs	Drift	Organismische Drift
<i>Cloeon dipterum</i>	Baetidae	-/-	Drift	Organismische Drift
<i>Lymnaea stagnalis</i>	Lymnaeidae	Spitzschlammschnecke	Horizontalverteilung	Driftunabhängige Repellentwirkung

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungen mit *Daphnia magna*

Zur Erfassung einer möglichen subletalen Toxizität wurden mit einem Klon von *D. magna* Versuche zur Bestimmung der somatischen Wachstumsraten und der Gelegegröße und der ‚Size at First Reproduction‘ (SFR) durchgeführt. Da alle diese Parameter mit demselben experimentellen Aufbau ermittelt wurden, werden sie im Folgenden mit einander verknüpft dargestellt (s. Kapitel 2.1.1).

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Repellentien direkt das Verhalten von *D. magna* beeinflussen oder ob es indirekte Effekte auf das Verhalten gibt, indem die Repellentien eine Verhaltensänderung, die bei Daphnien durch natürliche Infochemikalien von Fischen induziert wird, unterdrücken. Diese beiden Aspekte wurden in einer sog. ‚Planktonorgel‘ untersucht und werden deshalb im Folgenden mit einander verknüpft dargestellt (s. Kapitel 2.1.2).

#### 2.1.1 Wachstumsraten, Gelegegrößen und Size at First Reproduction

Mit jedem der drei Repellentien wurde ein getrennter Versuch durchgeführt. In jedem dieser Versuche wurden die Daphnien ohne Repellent (Kontrolle) oder in Gegenwart von sechs verschiedenen Konzentrationen eines Repellents im Bereich von nominell 5 ng/L bis zu 50 µg/L gehältert. Für die Versuche wurden juvenile Daphnien verwendet, die aus dem dritten Gelege geschlüpft waren und die nicht älter als 12 h waren. Jeweils 5 dieser Tiere wurden in 250 mL Wasser mit *Chlamydomonas klinobasis* als Futteralge in einer Konzentration von 2 mg partikulärem organischem Kohlenstoff pro Liter überführt. In den Ansätzen mit Repellent wurde zunächst ein Aliquot einer methanolischen Stammlösung in das trockene Glas gegeben. Nach Verdunsten des Lösungsmittels wurde mit Wasser aufgefüllt. In die Kontrollansätze wurde analog ein Aliquot Methanol gegeben. Jeder Ansatz wurde dreifach repliziert, so dass einschließlich der Kontrollen 21 Ansätze pro Versuch durchgeführt wur-

den. Die Tiere wurden täglich in frisches Wasser mit Repellentien und mit frischem Futter überführt. Die juvenile somatische Wachstumsrate  $g$  wurde anhand der Trockengewichtszunahme der Daphnien vom Zeitpunkt des Schlüpfens (Tag1) bis zur Anlage des ersten Geleges (Tag 7) gemäß Von Elert (2002) berechnet:  $g [d^{-1}] = (\ln w_t - \ln w_0) / t [d^{-1}]$ , mit  $w_t$ : Trockengewicht am Versuchsende;  $w_0$ : Trockengewicht bei Versuchsbeginn;  $t$ : Versuchsdauer. Innerhalb eines jeden mit einem Repellent durchgeführten Versuchs wurde mittels one-way ANOVA statistisch getestet, ob sich in einem der Repellent-Ansätze das Wachstum von dem in der Kontrolle ('Minus') unterschied. Zuvor wurde überprüft, ob die Daten die Voraussetzung der Varianzhomogenität (Levene Test) erfüllten.

#### 2.1.1.1 Gelegegröße

In den in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Versuchen zur Bestimmung der Wachstumsraten wurde am Tag 7 des Versuchs die Gelegegröße bei allen Individuen eines Replikats mikroskopisch bestimmt und Mittelwert aller Gelegegrößen je Replikat berechnet. Aus den drei Replikaten eines Ansatzes ergab sich auf diese Weise eine mittlere Gelegegröße mit einer Varianz für den experimentellen Ansatz. Innerhalb eines jeden mit einem Repellent durchgeführten Versuchs wurde mittels one-way ANOVA statistisch getestet, ob sich in einem der Repellent-Ansätze die Gelegegröße von der in der Kontrolle ('Minus') unterschied. Zuvor wurde überprüft, ob die Daten die Voraussetzung der Varianzhomogenität (Levene Test) erfüllten.

#### 2.1.1.2 Size at First Reproduction

Im gleichen experimentellen Aufbau wie unter Kapitel 2.1.1 beschrieben wurden Daphnien in An- und Abwesenheit von Repellentien und fischbürtigen Infochemikalien kultiviert, die als ein standardisierter Extrakt aus Fischhälterungswasser zugegeben wurden, von dem bekannt ist, dass er eine Verringerung der SFR induziert (Von Elert and Stibor 2006; Effertz and Von Elert 2014). Bei Anlage des ersten Geleges (Tag 7) wurde gemäß Von Elert and Stibor (2006) für jedes eitragende Individuum die SFR (Abstand von Oberkante des Komplexauges bis zur Basis der Spina) mithilfe eines Binokulars, das mit einer Digitalkamera und einer Bildverarbeitungs-Software ausgerüstet war, bestimmt. Für jedes Replikat wurde eine mittlere SFR berechnet; diese Mittelwerte wurden zur Berechnung des Mittelwerts und der Varianz eines jeden Treatments verwendet.

Innerhalb eines jeden mit einem Repellent durchgeführten Versuchs wurde mittels one-way ANOVA und Tukey Posthoc Test untersucht, zwischen welchen Ansätzen signifikante Unterschiede nachweisbar waren. Zuvor wurde überprüft, ob die Daten die Voraussetzung der Varianzhomogenität (Levene Test) erfüllten.

#### 2.1.1.3 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien

Um die Effektivkonzentrationen der Repellentien in den Life-History Versuchen zu bestimmen, wurde, wie oben für die Life-History-Versuche beschrieben, Wasser mit nominellen Konzentrationen von 5  $\mu\text{g/L}$  und von 50  $\mu\text{g/L}$  angesetzt und dann aus den entsprechenden Wasservolumina mittels C18-SPE extrahiert (Bernhard and others 2006). Jeweils drei Aliquote dieser Lösungen wurden unmittelbar aufgearbeitet, während drei weitere Aliquote aufgearbeitet wurden, nachdem sie, identisch wie in den Life-History Versuchen, mit Futteralgen und Daphnien in Gläsern mit je 250 mL für 24 h exponiert worden waren. Von den Lösungen mit einer nominellen Konzentration von 50  $\mu\text{g/L}$  wurden Aliquote von 400 mL, von den Lösungen mit nominell 5  $\mu\text{g/L}$  wurden Aliquote von 2 L aufgearbeitet. Durch Filtration über Celluloseacetat-Filter (0,45  $\mu\text{m}$  Porengröße) wurden zunächst die Daphnien und die Futteralgen abgetrennt, dann wurde das Aliquot auf 1 % Methanol eingestellt und die Repel-

lenticen wurden durch lipophile Festphasenextraktion (10 g Sorbens, 60 mL, end-capped, Varian Mega Bond Elut, Agilent Technologies) aus dem Wasser extrahiert und anschließend mit 50 mL Methanol von der Festphase eluiert. Nachdem das Eluat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt worden war, wurde es mit 2 x 1 mL Methanol zurückgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und am Vakuum zur Trockene eingengt und schließlich in 1 mL Methanol aufgenommen.

Es lagen am Ende 12 Proben vor (6 Ansätze mit 5 µg/L, davon 3 nach unmittelbarer Aufarbeitung und 3 nach Exposition; 6 Ansätze mit 50 µg/L, davon 3 nach unmittelbarer Aufarbeitung und 3 nach Exposition). Zur Messung wurde jeweils 1 µL injiziert, und von jeder Probe wurden 2 Messungen durchgeführt (2 technische Replikate). Aus den beiden technischen Replikaten wurde für jedes Repellent die mittlere Peakfläche ermittelt, so dass für jede der 12 Proben jeweils eine Peakfläche für jedes Repellent vorlag. Aus den 3 unmittelbar aufgearbeiteten Ansätzen wurde für jedes Repellent die mittlere Peakfläche errechnet und gleich 100 % gesetzt. Für die drei exponierten Aliquote wurde erwartet, dass die Exposition zur Abnahme der im Wasser gelösten Repellentien geführt hatte. Um dies zu quantifizieren, wurde die ermittelte Peakfläche in Relation zu der als 100 % gesetzten Fläche gesetzt, so dass für jedes Repellent aus jeder der drei exponierten Aliquote eine Wiederfindungsrate errechnet wurde. Entsprechend wurden für jedes Repellent drei Wiederfindungsraten für eine Nominalkonzentration von 5 µg/L und drei weitere Wiederfindungsraten für 50 µg/L Nominalkonzentration erhalten. Mittels t-Test wurde für jedes Repellent getestet, ob die Wiederfindungsraten bei 5 µg/L und bei 50 µg/L unterscheidbar waren. Falls kein statistischer Unterschied bestand, wurde aus den insgesamt 6 Wiederfindungsraten eine mittlere Wiederfindungsrate für jedes Repellent berechnet. Diese Rate wurde anschließend verwendet, um, für jedes Repellent separat, alle eingesetzten Nominal- in Effektivkonzentrationen umzurechnen.

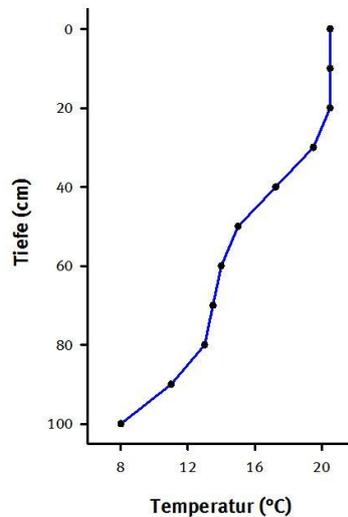
#### 2.1.1.4 GC-MS Analytik der Repellentien

Zur Messung der Repellentien wurde 1 µL splitless in einen Agilent 7890 GC, der an ein Massenspektrometer (Agilent 5975 MSD) gekoppelt war, injiziert. Die Chromatographie erfolgte auf einer HP-5 MS Kapillarsäule (30m Länge; 0,25 mm ID; 0,25 µm Filmdicke) mit folgendem Temperaturprogramm: 2 min bei 80°C, mit 10°C/min auf 185°C; mit 5°C/min auf 210°C; mit 20°C/min auf 260°C, 5 min bei 260°C. Im MSD wurden die Substanzen durch ‚electron impact ionization‘ (EI mode, 70 eV) ionisiert und fragmentiert. Die Peakflächen wurden mit jeweils substanzspezifische Targetionen (m/z 118,95 für DEET, m/z 130,00 für EBAAP, m/z 127,95 für Icaridin) ermittelt. Die Qualifizierung erfolgte jeweils anhand von drei Ionen (DEET: m/z 190,05; 91,00; 191,00; EBAAP: m/z 172,05; 83,91; 86,10; Icaridin: m/z 83,95; 184,10; 57,00).

#### 2.1.2 Effekte auf die Vertikalverteilung von *D. magna*

Um mögliche direkte oder indirekte Effekte der Repellentien auf das Verhalten zu erfassen, wurde die Vertikalverteilung von *D. magna* in stratifizierten Wassersäulen untersucht ('Planktonorgel' nach Von Elert and Pohnert, 2000). In ein Aquarium mit dem gezeigten vertikalen Temperaturprofil (Abbildung 1), das von oben beleuchtet wurde, wurden Glasröhren (100 cm Länge, Volumen je 200 mL) eingebracht, die am unteren Ende mit einem Stopfen verschlossen waren und mit dem jeweiligen experimentellen Wasser befüllt wurden. Dazu wurde zunächst vorgekühltes Wasser in jede Röhre gefüllt, das vorsichtig mit nicht gekühltem Wasser überschichtet wurde. Je nach Ansatz befand sich das Repellent im vorgekühlten Wasser und damit im unteren Teil der Röhre, oder das Repellent wurde mit dem nicht gekühlten Wasser gegeben und befand sich im oberen Teil der Röhre.

Abbildung 2: Temperaturprofil in der 'Planktonorgel'



Jede Röhre wurde mit 5 vier Tage alten *D. magna* besetzt, und es wurde saturierend mit *Chlamydomonas klinobasis* gefüttert. Die Vertikalposition der Tiere wurde zwei Mal täglich ermittelt. Pro Röhre wurde aus vier Ablesungen ein Mittelwert errechnet, so dass jede Röhre als 1 Replikat in die Statistik einging.

### 2.1.3 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien

Um die Effektivkonzentrationen der Repellentien in den Planktonorgel Versuchen zu bestimmen, wurden diese, identisch wie in 2.1.1.3, mit nominellen Konzentrationen von 50 µg/L und von 5 µg/L angesetzt und dann aus den entsprechenden Wasservolumina mittels C18-SPE extrahiert (Bernhard and others 2006). Jeweils drei Aliquote dieser Lösungen wurden unmittelbar aufgearbeitet, während drei weitere Aliquote aufgearbeitet wurden, nachdem sie identisch wie in den Planktonorgel Versuchen mit Futteralgen und Daphnien in Glasröhren mit je 200 mL für 48 h exponiert worden waren. Von den Lösungen mit einer nominellen Konzentration von 50 µg/L wurden Aliquote von 400 mL, von den Lösungen mit nominell 5 µg/L wurden Aliquote von 2 L aufgearbeitet. Durch Filtration über Celluloseacetat-Filter (0,45 µm Porengröße) wurden die Daphnien und die Futteralgen abgetrennt. Dann wurde das Aliquot auf 1 % Methanol eingestellt. Die Repellentien wurden durch lipophile Festphasenextraktion (10 g Sorbens, 60 mL, end-capped, Varian Mega Bond Elut, Agilent Technologies) aus dem Wasser extrahiert und anschließend mit 50 mL Methanol von der Festphase eluiert. Nachdem das Eluat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt worden war, wurde es mit 2 x 1 mL Methanol aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und am Vakuum zur Trockene eingengt und schließlich in 1 mL Methanol aufgenommen.

Es lagen am Ende 12 Proben vor (6 Ansätze mit 5 µg/L, davon 3 nach unmittelbarer Aufarbeitung und 3 nach Exposition; 6 Ansätze mit 50 µg/L, davon 3 nach unmittelbarer Aufarbeitung und 3 nach Exposition). Zur Messung wurde jeweils 1 µL injiziert, und von jeder Probe wurden 2 Messungen durchgeführt (2 technische Replikate). Aus den beiden technischen Replikaten wurde für jedes Repellent die mittlere Peakfläche ermittelt, so dass für jede der 12 Proben jeweils eine Peakfläche für jedes Repellent vorlag. Aus den 3 unmittelbar aufgearbeiteten Ansätzen wurde für jedes Repellent die mittlere Peakfläche errechnet und gleich 100 % gesetzt. Für die 3 exponierten Aliquote wurde erwartet, dass die Exposition zur Abnahme der im Wasser gelösten Repellentien geführt hatte. Um

dies zu quantifizieren, wurde die ermittelte Peakfläche in Relation zu der als 100 % gesetzten Fläche gesetzt, um für jedes Repellent aus jeder der drei exponierten Aliquote eine Wiederfindungsrate zu berechnen. Entsprechend wurden für jedes Repellent drei Wiederfindungsraten für eine Nominalkonzentration von 5 µg/L und drei weitere Wiederfindungsraten für 50 µg/L Nominalkonzentration erhalten. Mittels t-Test wurde für jedes Repellent getestet, ob die Wiederfindungsraten bei 5 µg/L und bei 50 µg/L unterscheidbar waren. Falls kein statistischer Unterschied bestand, wurde aus den insgesamt 6 Wiederfindungsraten eine mittlere Wiederfindungsrate für jedes Repellent berechnet. Diese Rate wurde anschließend verwendet, um, für jedes Repellent separat, alle eingesetzten Nominal- in Effektivkonzentrationen umzurechnen.

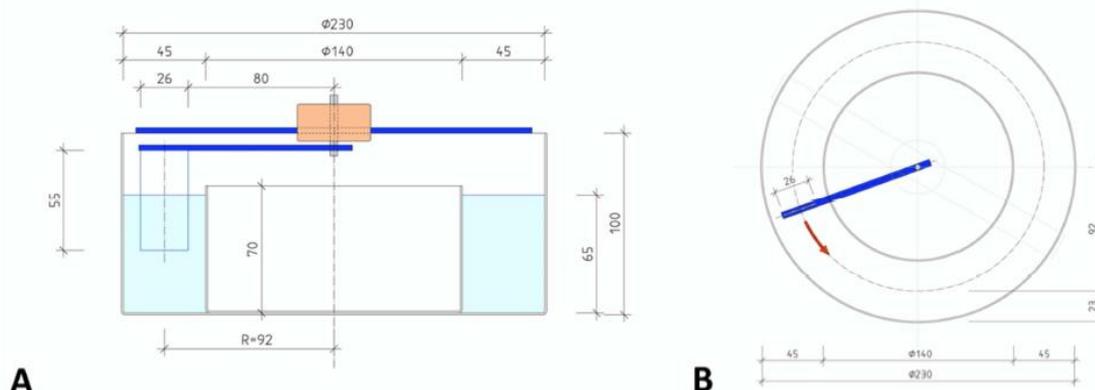
## 2.2 Organismische Drift

Drift ist ein häufiges Verhalten von Fließgewässerinvertibraten als Antwort auf Umweltveränderungen, aber auch auf Konkurrenz oder die Anwesenheit von Prädatoren. Dabei verlassen die Tiere aktiv den relativ strömungsgeschützten Gewässergrund und lassen sich anschließend passiv stromabwärts treiben. Gründe für ein lokal stark ansteigendes Driftverhalten von Invertebraten können neben Änderungen der Strömungsverhältnisse auch Einträge anthropogener Chemikalien sein (Berghahn and others 2012). Es wurde daher geprüft, ob Repellentien durch Scheuchwirkung eine Drift bei Fließgewässerinvertibraten auslösen können.

### 2.2.1 Versuchsaufbau

Um eine mögliche driftinduzierende Wirkung der zu untersuchenden Repellentien zu testen, wurde das von Werth & Marten (2007) etablierte Testsystem zunächst leicht modifiziert (Abbildung 3). Die strömungserzeugende Pumpe wurde durch ein motorbetriebenes Paddel ersetzt und die im Versuchsaufbau von Werth & Marten (2007) vorgeschlagene Lichtschranke zur Quantifizierung der Invertebratendrift durch direkte Beobachtung (mittels der ‚instantaneous sampling‘ Methode) ersetzt. Dadurch waren in dem modifizierten Testsystem außer den Versuchsorganismen nur noch inerte Borosilikatglasoberflächen vorhanden, was Adsorptions- und Memoryeffekte in wiederholten Tests minimieren sollte. In dieser modifizierten Variante des Testsystems konnten immer 6 Testsysteme parallel betrieben werden, so dass pro Durchgang (Versuchstag) je drei Kontroll- und Testansätze durchgeführt werden konnten. Die Versuche wurden mit allen drei zu testenden Repellentien (DEET, EBA-AP und Icaridin) mit zwei verschiedenen aquatischen Invertebraten als Versuchsorganismen (dem Bachflohkrebs *Gammarus pulex* und der Eintagsfliegenlarve *Cloeon dipterum*) durchgeführt.

Abbildung 3: Technische Skizze des Driftmeters (modifiziert nach Werth & Marten, 2007).



Für die Versuche wurden je 20 *G. pulex* bzw. 10 *C. dipterum* Individuen in ein mit 1.7 L filtrierten und vortemperierten Wassers eingebracht und für mindestens 3 Stunden an das Testsystem akklimiert. Anschließend wurde in zwei der Testsysteme entweder eines der Repellentien in der zu testenden Konzentration oder eine Lösemittelkontrolle zugegeben und in der Folge über einen Zeitraum von 30 Minuten ähnlich wie von Berghahn and others (2012) beschrieben das Driftverhalten der Invertebraten erfasst. Danach folgten die nächsten beiden Testsysteme (je ein Repellent- und ein Kontrollansatz) und weitere 30 Minuten später der dritte Block aus zwei Testsystemen. So konnten an einem Versuchstag insgesamt 6 Testsysteme (je drei mit Repellentien und drei Lösemittelkontrollen) beobachtet werden. Da zu jeder zu testenden Konzentration 6 Replikate durchgeführt wurden, waren je zwei Versuchstage pro Versuchsorganismus, Repellent und Konzentrationsstufe erforderlich.

### 2.2.2 Versuchsorganismen

*Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) wurden aus hydrobiologischem Farming (Fischfutter Etzback FEE, Schleiden) bezogen, wo sie laut Züchter artrein in einem natürlichen, fischfreien Bach der Eifel kultiviert werden. Vor Beginn der Verhaltensversuche wurden die Tiere für mindestens drei Tage in einer Klimakammer bei 18°C an die Laborbedingungen akklimiert und während dieser Zeit sowie der weiteren Hälterung *ad libitum* mit gemahlten Fischfutterflocken (TetraMin, Tetra GmbH, Melle) gefüttert. Für die Versuche wurden *G. pulex* Individuen  $\geq 7$  mm verwendet, welche sich nicht in der Präkopula befanden. Kleinere Individuen wurden ausgeschlossen, da sie ein höheres Risiko hatten, passiv von der Strömung im Driftassay mitgerissen zu werden und so die gemessenen Driftraten verfälschen könnten. Da Parasiten das Driftverhalten von Gammariden beeinflussen können (McCahon and others 1991), wurde vor den Versuchen überprüft, dass die verwendeten Gammariden nicht z.B. durch den acantocephalen Parasiten *Pomphorynchus laevis* befallen waren.

Die Funktion des Testsystems wurde wie von Werth & Marten (2007) beschrieben zunächst mit dem Insektizid Cypermethrin validiert. Eine nominelle Cypermethrin-Konzentration von 50 ng/L führte zu einer ca. 16fachen und hochsignifikanten Zunahme der Driftrate von *G. pulex* von ca. 0,5 auf ca. 8,0 Driftereignisse pro Individuum und Stunde, was die Funktionsfähigkeit des modifizierten Testsystems demonstriert. Im Anschluss dazu wurde mit dem Bachflohkrebs *Gammarus pulex* die Drift abhängig von der Repellentkonzentration für alle drei zu testenden Repellentien in einer Konzentrationsreihe von jeweils 5 pg/L bis 50 µg/L (5 pg/L, 50 pg/L, 500 pg/L, 5 ng/L, 50 ng/L, 500 ng/L, 5 µg/L und 50 µg/L, insgesamt 8 Konzentrationen pro Repellent) ermittelt und die beobachtete Drift in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Repellents mittels linearer Regressionsanalyse verglichen.

Abweichend vom Antrag wurde als weiterer Versuchsorganismus neben *Gammarus* sp. keine Trichopteren- oder Libellenlarve, sondern Larven der Eintagsfliege *Cloeon dipterum* (Ephemeroptera, Baetidae) gewählt. Diese Änderung ergab sich als Konsequenz der Projekt-Zwischenbesprechung im August 2013 in Köln aus dem Befund, dass Ephemeropterenlarven im Allgemeinen und *C. dipterum* im Speziellen möglicherweise wesentlich sensitiver auf bestimmte gelöste Toxine reagieren als Gammariden (Roessink and others 2013). Larven von *C. dipterum* wurden im Freiland (aus einem künstlichem Teich im botanischen Garten der Universität zu Köln) gesammelt und bis zum Einsatz in den Verhaltensversuchen wie oben für *G. pulex* beschrieben akklimiert und gehältert. Für die Versuche mit *C. dipterum* waren am Testsystem bzw. der Auswertung kleinere Modifikationen erforderlich, um dem Verhalten der Eintagsfliegenlarven Rechnung zu tragen: Da die Drift der Larven ohne Substrat grundsätzlich (schon vor Repellent-Zugabe) sehr hoch und variabel war, musste ein Substrat in die Testsysteme eingebracht werden, in dessen Strömungsschatten sich die Tiere verstecken konnten.

Da auch hier nur inerte Glasoberflächen zum Einsatz kommen sollten, wurden hierfür Glasperlen mit einem Durchmesser von 10 mm verwendet (100 Stück pro Testsystem). Zudem wurde wegen der höheren Variabilität zwischen replizierten Versuchsansätzen für *C. dipterum* nicht (wie bei *G. pulex*) die Driftrate pro Individuum und Stunde, sondern das Verhältnis der Drift zwischen der Vor-Stimulus-Kontrolle und der Drift nach Zugabe des Repellents bzw. der Lösemittelkontrolle berechnet und dargestellt. Anschließend wurde die Funktion des Testsystems wie oben für *G. pulex* beschrieben mit dem Insektizid Cypermethrin validiert. Für *C. dipterum* waren 10fach höhere Cypermethrin-Konzentrationen erforderlich als für *G. pulex*: So führte eine nominelle Cypermethrin-Konzentration von 500 ng/L zu einer ca. 2,5fachen und hochsignifikanten Zunahme des Driftverhältnisses vor bzw. nach Cypermethrin-Zugabe von *C. dipterum*. Im Anschluss wurde die Drift der Larven in Abhängigkeit von der Repellentkonzentration für alle drei Repellentien in einer Konzentrationsreihe von jeweils 5 pg/L bis 50 µg/L (8 Konzentrationen pro Repellent mit je 6 Replikaten) ermittelt.

### 2.2.3 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien

Alle drei getesteten Repellentien lassen sich mit Hilfe von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS) anhand substanzspezifischer Fragmentionen im Massenspektrometer identifizieren und anschließend über einen internen Standard (IS) quantitativ analysieren (Bernhard and others 2006). Hierzu wurden zunächst Eichungen für die substanzspezifischen Targetionen am GC-MS gegen den internen Standard Atrazin etabliert. Von Atrazin und den drei Repellentien (DEET, EBAAP und Icaridin, gelöst in Methanol) wurden in einem Bereich von 0,5 - 200 ng Standards in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen erstellt und direkt in das GC-MS System injiziert. Nach gaschromatographischer Trennung (Agilent 7890 GC mit einer HP-5 MS Kapillarsäule) wurden die Substanzen in einem Agilent 5975 MSD durch ‚electron impact ionization‘ (EI mode, 70 eV) fragmentiert und ionisiert und die substanzspezifischen Massenfragmente quantifiziert. Daraus wurde für jedes der zu untersuchenden Repellentien eine lineare Eichfunktion der Peakflächen-Verhältnisse (Repellent/IS) gegen die Substanzmengen-Verhältnisse (Repellent/IS) erstellt, um anschließend die Repellentien in den Testsystemen zu quantifizieren.

Um die Effektivkonzentrationen der Repellentien in den Driftmetern zu bestimmen, wurden Driftmeter in exakt derselben Weise wie für die eigentlichen Versuche mit je 1,7 Litern Wasser und den drei getesteten Repellentien in den fünf Konzentrationen 100 ng/L, 500 ng/L, 1 µg/L, 5 µg/L und 10 µg/L und drei unabhängigen Replikaten je Konzentration (insgesamt also 15 Proben) angesetzt und – wie in den eigentlichen Versuchen auch – für drei Stunden inkubiert. Zusätzlich wurde jedem Driftmeter 1 µg/L Atrazin als interner Standard (IS) zugesetzt. Anschließend wurden die Repellentien und der IS aus den entsprechenden Wasservolumina mittels C18-SPE extrahiert (Bernhard and others 2006) und am Rotationsverdampfer eingengt wie oben für die Versuchssysteme mit *D. magna* beschrieben. Die Analytik erfolgte mittels GC-MS wie oben in Kapitel 2.1.1.4 beschrieben. Mittels der linearen Eichgeraden der Peakflächen-Verhältnisse (Repellent/IS) gegen die Substanzmengen-Verhältnisse (Repellent/IS) konnte in jeder der 15 Proben (5 Konzentrationen mit je 3 Replikaten) die effektive Repellent-Konzentration in den Driftmetern bestimmt werden. Aus dem Vergleich der eingesetzten (nominalen) mit den gemessenen (effektiven) Konzentrationen wurden die prozentuale Wiederfindungsraten für jede Repellentkonzentration ermittelt. Aus den Wiederfindungsraten der fünf untersuchten Konzentrationen wurde im Folgenden eine mittlere Wiederfindungsrate für jedes Repellent berechnet, mit deren Hilfe alle eingesetzten Nominal- in Effektivkonzentrationen umgerechnet wurden.

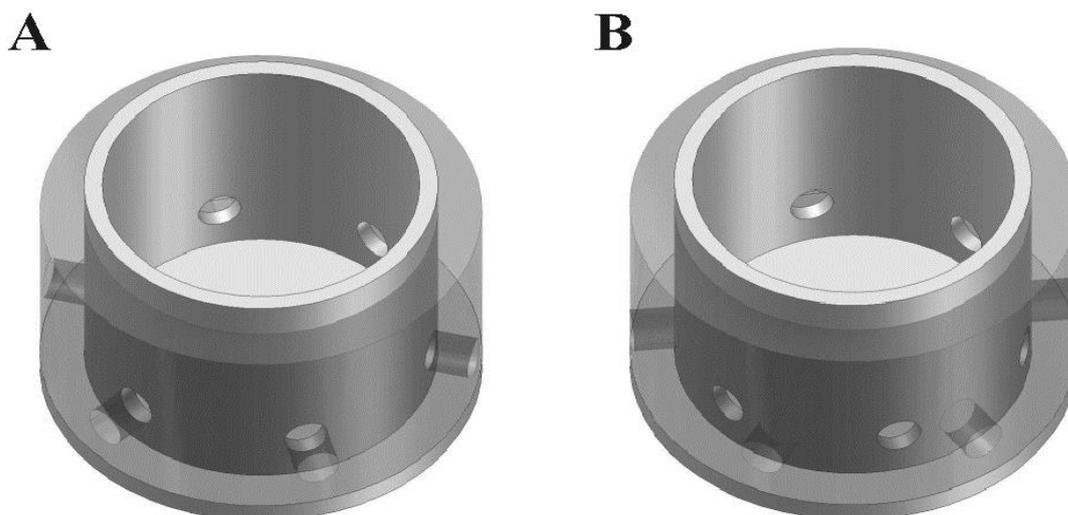
## 2.3 Versuche mit aquatischen Lungenschnecken

Als drittes Testsystem wurde ein bereits in der Arbeitsgruppe gut etablierter Verhaltensbiotest mit aquatischen Lungenschnecken eingesetzt (Fink and others 2006a). Dieser Test war entwickelt worden, um die Chemotaxis der Schnecken auf flüchtige, algenbürtige Signalstoffe zu untersuchen, welche von den Schnecken als Futterfindungssignale genutzt werden (Fink and others 2006a, 2006b, Moelzner and Fink 2014). Es wurde angenommen, dass dieser Test aber auch eine mögliche Abschreckung der Schnecken beziehungsweise eine Störung der bekannten Anlockung der Schnecken durch die algenbürtigen Signalstoffe durch Repellentien erfassen kann. Wie in den früheren Experimenten zur Futterwahl (Moelzner and Fink 2014) wurden diese Experimente mit der Schlamm Schnecke *Lymnaea stagnalis* (Pulmonata, Lymnaeidae) durchgeführt.

### 2.3.1 Versuchsaufbau

Das Testsystem zur Untersuchung des Verhaltens aquatischer Lungenschnecken (Fink and others 2006a) besteht aus einem Aquarium (320 x 170 mm, 180 mm tief, Gesamtvolumen 10 L), welches mit 1 L filtriertem und über mehrere Tage gealtertem Leitungswasser befüllt wurde, wodurch sich ein Wasserstand von ca. 1,5 cm in dem Becken ergab. Das Becken wurde in einem Raum mit konstanter Temperatur (21° C) und gleichmäßiger Ausleuchtung von oben (zur Vermeidung von Präferenzverhalten durch unterschiedliche Beleuchtung/Beschattung) aufgestellt. Speziell entwickelte Lochgefäße (Abbildung 4) dienen als Punktquellen für die Repellentien in den jeweiligen Konzentrationen. Die Lochgefäße bestehen aus zwei ineinanderverschraubenden Plexiglaszylindern mit radialen Bohrungen (5 mm Durchmesser) und einer runden Bodenplatte am inneren Zylinder. Durch Drehung des äußeren Rings bis zur Passung der inneren und äußeren Bohrungen können die Lochgefäße zum Außenmedium hin geöffnet (Abbildung 4A) werden, ohne den Wasserkörper und darin ggf. bestehende Diffusionsgradienten zu stören.

Abbildung 4: Schemazeichnung der Lochgefäße aus den Verhaltensbiotests mit *L. stagnalis* (aus Fink et al. 2006b).



Die Lochgefäße können also durch Rotation des äußeren Rings vom geschlossenen (Abbildung 4B) in den geöffneten Zustand (Abbildung 4 A) überführt bzw. durch umgekehrte Rotation wieder geschlossen werden, um einen Austausch von Substanzen zwischen der Punktquelle im Inneren und der Versuchsarena im restlichen Aquarium zu unterbrechen. Dies führt zur Ausbildung eines Konzentrati-

onsgradienten im gesamten Aquarium innerhalb von ca. 20 Minuten (Fink & Roth, unpubl. Daten). Für die Versuche wurde jeweils ein Lochgefäß in der Mitte der rechten bzw. linken Schmalseite des Aquariums aufgestellt (Abstand 21 cm). Je ein Lochgefäß wurde als Kontrolle mit 7 ml Wasser befüllt, während das gegenüberliegende Lochgefäß mit 7 ml Wasser mit der entsprechenden zu testenden Repellentienkonzentration (bezogen auf das 1 L Gesamtvolumen des Testsystems) befüllt wurde. Durch diese Befüllung waren die Wasserstände inner- und außerhalb der Lochgefäße auch vor dem Öffnen der Gefäße identisch, was ein schwallartiges Aus- oder Eintreten von Wasser in die Lochgefäße bzw. die Versuchsarena ausschließen ließ. Anschließend wurden wie von Moelzner & Fink (2014) etabliert, je 5 juvenile *L. stagnalis* (Gehäusehöhe  $15 \pm 5$  mm) in die Mitte des Aquariums eingesetzt. Nach dem Öffnen der Lochgefäße wurden diese mit je einer runden Glasplatte oben abgedeckt und der Öffnungszeitpunkt der Gefäße als Startzeitpunkt des Verhaltensversuchs betrachtet. Im Folgenden wurde der relative Abstand der Schnecken zu den beiden Lochgefäßen für jedes Individuum nach 5, 8, 11, 14, 17 und 20 Minuten bestimmt und der mittlere relative Abstand der fünf Tiere pro Versuchsansatz zu den beiden Punktquellen berechnet. Der Anfangswert für jedes Individuum (gleicher Abstand zu beiden Lochgefäßen) war somit 0 und die Ablesewerte reichten von -21 (am Nächsten zur Kontrolle) bis +21 (am Nächsten zur Repellent-Quelle). Dabei wurden die fünf Individuen pro Assay nicht als unabhängige Replikate betrachtet, sondern ihre relativen Abstände zu den Lochgefäßen zu jedem Ablesezeitpunkt gemittelt, um die hohe Variabilität des individuellen Verhaltens zu kompensieren (Fink and others 2006a). Ähnlich wie in den oben beschriebenen Driftversuchen wurden auch in diesem Testsystem alle drei zu testenden Repellentien in einem Konzentrationsgradienten von 5 pg/L bis 50 µg/L (8 Konzentrationen mit je 5 Replikaten) eingesetzt, wobei ein Extrakt von natürlichen Signalstoffen aus der Grünalge *U. fimbriata* als Positivkontrolle eingesetzt wurde (Moelzner and Fink 2014). Zudem wurden in einer Serie von Kontrollansätzen ohne Stimulus auf einer der beiden Aquarienseiten ausgeschlossen, dass es eine generelle Präferenz der Lymnaeiden für eine der Seiten der Wahlversuchsarena gab. Im Folgenden wurde die Verteilung der Schnecken in der Versuchsarena (Anlockung bzw. Abschreckung) in Abhängigkeit von der Konzentration des jeweiligen Repellents mittels linearer Regressionsanalyse verglichen.

### 2.3.2 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien

Die Bestimmung der Effektivkonzentrationen erfolgte wie in Kapitel 2.2.3 für die Driftassays beschrieben: Zunächst wurde das System (Aquarium) wie in den Versuchen mit 1 L Wasser befüllt und das Gefäß mit der Repellentquelle mit 100 µl (gelöst in 7 ml Wasser) einer Mischung der drei Repellentien (DEET, EBAAP und Icaridin) befüllt. Anschließend wurde das Ringgefäß mit der Repellentmischung geöffnet und nach 35 Minuten (entspricht dem Ende des Verhaltensversuchs) das Gefäß wieder verschlossen und dem Aquarium entnommen. Das im Testsystem verbleibende Wasser (1 L) wurde aus dem Aquarium entnommen und mit 1 µg des internen Standards (IS) Atrazin versetzt. Anschließend wurden die Repellentien und der IS aus diesem Wasser mittels einer C18 Kartusche (Agilent Bond Elut C18) extrahiert und mit 100 % Methanol von der Kartusche eluiert. Nach dem Abdampfen im Rotationsverdampfer wurde das Eluat in 50 µl reinem Methanol aufgenommen und davon 1 µl zur Analyse in das GC-MS System injiziert. Die Analyse am GC-MS erfolgte wie oben für die Daphnienversuche unter Kap. 2.1.1.4 beschrieben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Effekte auf *Daphnia magna*

Im Rahmen des Projekts sollten Effekte auf das Ausweichverhalten von Daphnien untersucht werden. Dabei ging es zum einen um einen direkten Repellenteffekt und zum anderen um eine mögliche Stö-

zung eines natürlichen Infochemikalien-vermittelten Räubervermeidungsverhaltens durch DEET, EBAAP oder Icaridin.

Das wichtigste Kairomon-induzierte Verhalten im Zooplankton stellt die diurnale Vertikalwanderung (DVM) dar, mittels derer Daphnien das Prädationsrisiko durch planktivore Fische reduzieren. Zur Quantifizierung von DVM wurde ein Bench-Top Testsystem eingesetzt, das es erlaubt, verschiedene replizierte Ansätze gleichzeitig zu untersuchen (Von Elert and Pohnert 2000; Von Elert and Loose 1996; Loose and others 1993). Im vorliegenden Fall erlaubt das Testsystem, direkte Effekte der Repellentien (Induktion von DVM) und Infodisruption (Unterdrückung von DVM bei Anwesenheit von Kairomonen) zu untersuchen.

Im Rahmen der Life-History kommt es bei Daphnien in Gegenwart fischbürtiger Kairomone zu einer adaptiven Ressourcenallokation, die zu einer verminderten Größe bei der ersten Reproduktion (SFR, Size at First Reproduction) führt. Über die ursprünglich beantragten Arbeiten hinaus wurde deshalb auch untersucht, ob es hier zu einer Infodisruption kommt, die dazu führt, dass DEET, EBAAP oder Icaridin diese Verringerung der SFR durch Fischkairomone unterdrücken würden.

Um Effekte der Repellentien auf das Verhalten oder die Life-History von Daphnien von Toxizitätseffekten abgrenzen zu können, wurde zudem auf subletale Effekte der drei Repellentien für *D. magna* getestet, wobei in Life-History Versuchen die für die Fitness relevanten Parameter juveniles Wachstum und Gelegegröße erfasst wurden.

### 3.1.1 Effekte auf Wachstum, Gelegegröße und Size at First Reproduction

Alle unter Kapitel 3.1 beschriebenen Untersuchungen wurden mit demselben experimentellen Aufbau durchgeführt, weshalb für alle diese Ansätze die Effektivkonzentrationen der Repellentien einheitlich bestimmt werden konnten.

#### 3.1.1.1 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien

Die Life-History Versuche wurden mit allen drei Repellentien mit Nominalkonzentrationen von 5 ng/L bis zu 50 µg/L durchgeführt. Um die Effektivkonzentrationen zu ermitteln, wurden für jedes Repellent die Wiederfindungsraten bei den Ansätzen mit den beiden höchsten Konzentrationen bestimmt.

Die mittleren Wiederfindungsraten für DEET betragen bei nominal 5 µg/L 94 % und bei 50 µg/L 81 % (Abbildung 5). Die Wiederfindungsraten waren statistisch nicht unterscheidbar (t-Test,  $P = 0,197$ ). Für EBAAP ergaben sich Wiederfindungsraten von 81 % und 72 %, die statistisch nicht unterscheidbar waren (Abbildung 5) (t-Test,  $P = 0,242$ ). Für Icaridin betragen die entsprechenden Raten 80 % und 85 % (Abbildung 5) und waren ebenfalls nicht statistisch unterscheidbar (t-Test,  $P = 0,348$ ). In allen Fällen waren die Normalverteilung und die Homogenität der Varianzen nicht verletzt.

Da in keinem Fall die Wiederfindungsraten bei 5 µg/L und bei 50 µg/L statistisch unterscheidbar waren, wurde für jedes Repellent aus den insgesamt 6 Wiederfindungsraten eine mittlere Wiederfindungsrate für die Life-History Versuche berechnet (Tabelle 3). Die hier ermittelten Wiederfindungsraten wurden, entsprechend dem täglichen Wasserwechsel während des Life-History Versuchs, nach einer Expositionszeit von 24 h ermittelt.

Abbildung 5: Wiederfindungsraten der Repellentien im Life-History Ansatz.

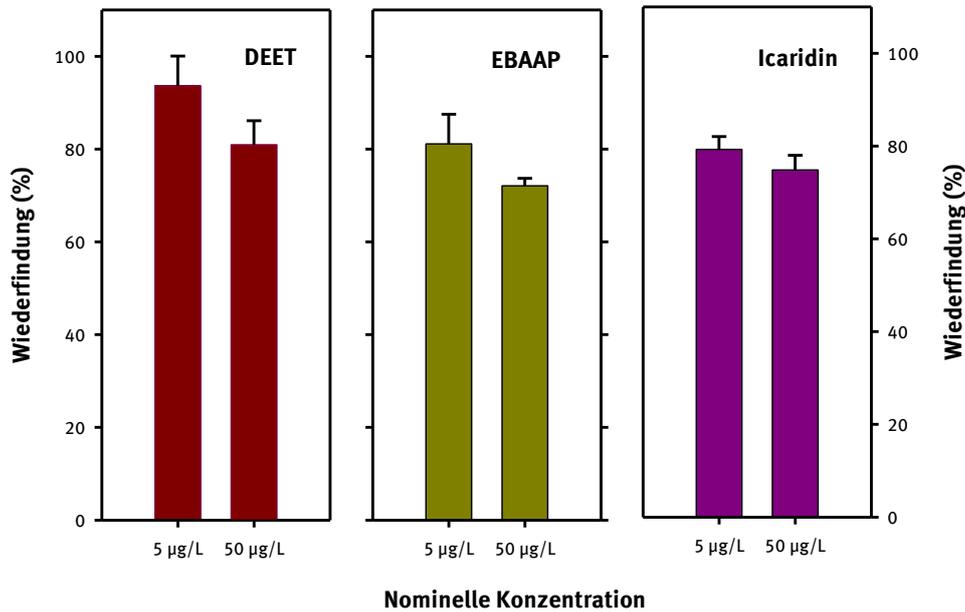


Tabelle 3: Mittlere Wiederfindungsraten (+/- SE) der Repellentien in den Life-History Versuchen

DEET	EBAAP	Icaridin
87,3 +/- 4,7	76,6 +/- 3,6	77,1 +/- 2,1

Diese mittleren Raten wurden anschließend verwendet, um aus allen nominalen Konzentrationen die Effektivkonzentrationen zu berechnen, die im Life-History tatsächlich vorgelegen haben (Tabelle 4).

Tabelle 4: Nominal- und Effektivkonzentrationen der Repellentien in den Life-History Versuchen

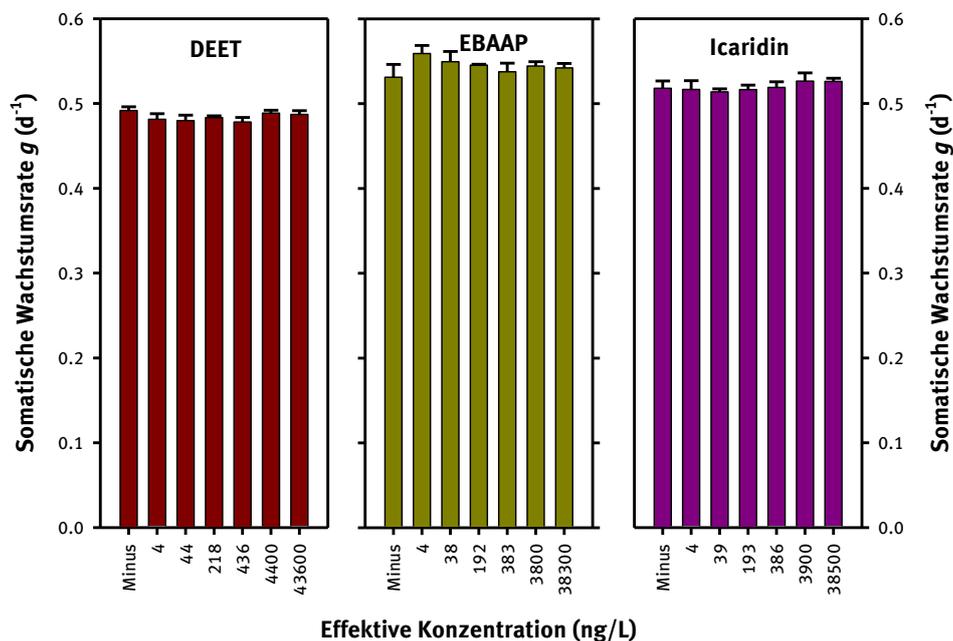
Nominalkonzentration (ng/L)	Effektivkonzentration DEET (ng/L)	Effektivkonzentration EBAAP (ng/L)	Effektivkonzentration Icaridin (ng/L)
5	4.4	3.8	3.9
50	43.6	38.3	38.5
250	218.2	191.5	192.7
500	436.4	382.9	385.3
5000	4400	3800	3900
50000	43600	38300	38500

### 3.1.1.2 Effekte auf das Wachstum

Die Fitness von Daphnien ergibt sich aus Umfang und Zeitpunkt der Reproduktion und kann in erster Näherung aus den somatischen Wachstumsraten abgeschätzt werden (Lampert and Trubetskova 1996).

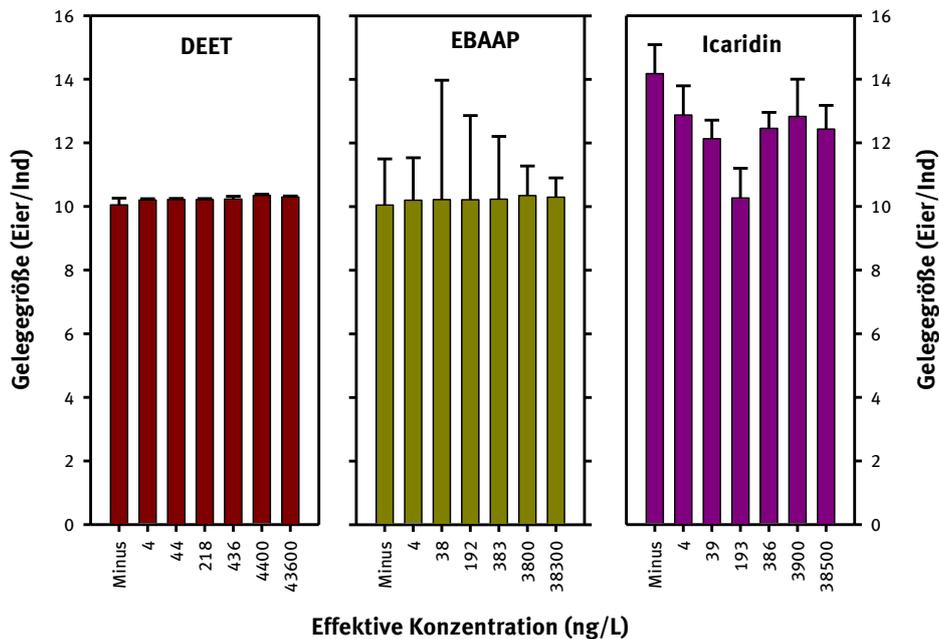
In den Repellent-freien Ansätzen ergaben sich Wachstumsraten von ca.  $0,5 \text{ d}^{-1}$ , so dass diese nahezu maximal möglichen Wachstumsraten darauf hinweisen, dass das Wachstum der Daphnien weder durch Futterquantität noch durch Futterqualität limitiert war (Abbildung 6). Weder für DEET noch für EBAAP oder Icaridin wurde ein signifikanter Effekt auf das somatische Wachstum beobachtet (one-way ANOVA,  $p > 0,05$ ; Abbildung 6).

Abbildung 6: Somatische Wachstumsraten von *D. magna* mit und ohne Repellentien



### 3.1.1.3 Effekte auf die Gelegegröße

In Abwesenheit der Repellentien bewegte sich die Größe des 1. Geleges bei 10-14 Eiern pro Individuum (Abbildung 7), was ebenfalls als Beleg für eine qualitativ und quantitativ gute Futtersituation der Tiere gewertet werden darf. Für keines der Repellentien wurde ein signifikanter Effekt auf die Gelegegröße beobachtet (one-way ANOVA,  $p > 0,05$ ); Abbildung 7).

Abbildung 7: Größe des ersten Geleges von *D. magna* mit und ohne Repellentien.

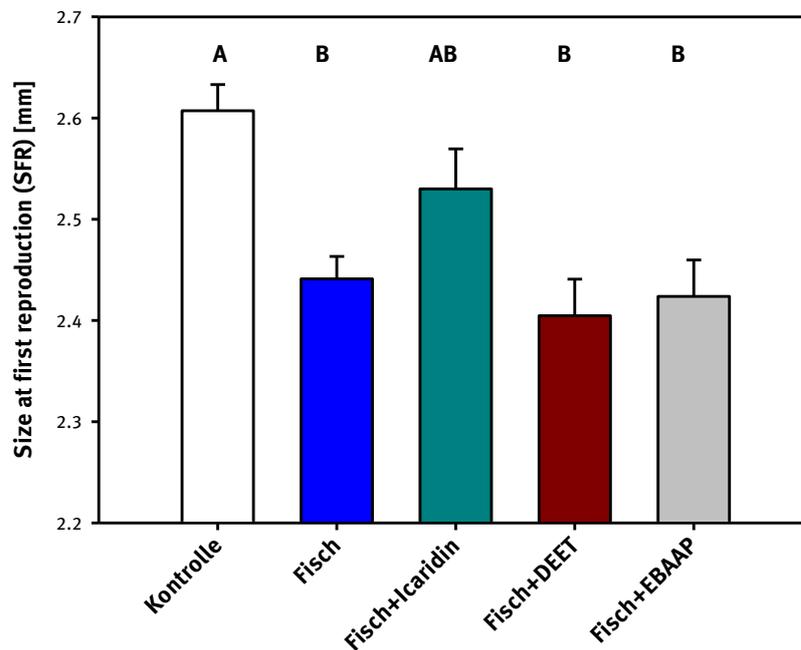
Zusammenfassend trat im Bereich von 4 ng/L bis zu 40 µg/L weder für DEET noch für EBAAP oder Icaridin ein signifikanter Effekt auf das somatische Wachstum oder die Gelegegröße auf, so dass keine Anhaltspunkte für eine subletale Toxizität der Repellentien gefunden wurden.

#### 3.1.1.4 Effekte auf Infochemikalien-vermittelte Life-History Veränderungen

In Gegenwart fischbürtiger Kairomone kommt es bei Daphnien zu einer verringerten Körpergröße bei der ersten Reproduktion ('SFR, Size at First Reproduction) ohne dass die Kairomone das somatische Wachstum beeinflussen (Von Elert and Stibor 2006). Diese, durch Infochemikalien vermittelte Life-History Veränderung ist adaptiv, da sie das Prädationsrisiko durch Fische als visuell orientierte Räuber verringert. Hier sollte untersucht werden, ob dieser Effekt von Fischkairomonen auf die SFR von Daphnien in Gegenwart von DEET, EBAAP oder Icaridin verändert wird.

Mit jedem der drei Repellentien wurde ein getrennter Versuch durchgeführt. In jedem dieser Versuche wurden die Daphnien ohne Fischkairomon (Kontrolle) oder in Gegenwart des Kairomons gehalten. Das Kairomon wurde entweder alleine angeboten oder es wurde dem Kairomon noch eines der Repellentien hinzu gefügt. Die Effektivkonzentrationen der Repellentien betragen 4,4 µg/L (DEET), 3,8 µg/L (EBAAP) und 3,9 µg/L (Icaridin).

In den hier durchgeführten Life-History Versuchen wurde *D. magna* in Gegenwart eines standardisierten Extraktes aus Fischhaltungswasser kultiviert, von dem bekannt ist, dass er eine Verringerung der SFR induziert (Von Elert and Stibor 2006; Effertz and Von Elert 2014). Dieser Effekt auf die SFR konnte im vorliegenden Versuch bestätigt werden, in dem ohne Kairomon eine SFR von 2,60 mm und in Gegenwart von Fischkairomon eine signifikant geringere SFR von 2,44 mm auftrat ( $p < 0,05$ , Tukey Posthoc-Test nach one-way ANOVA, Abbildung 8). Dieser Effekt der Fischkairomone blieb unverändert, wenn DEET, EBAAP oder Icaridin anwesend waren ( $p > 0,05$ , Tukey Posthoc-Test nach one-way ANOVA, Abbildung 8). Somit beeinflussten die Repellentien die Life-History Antwort der Daphnien auf natürliche Kairomone nicht.

Abbildung 8: Größe bei der ersten Reproduktion von *D. magna* mit und ohne fischbürtige Kairomone.

### 3.1.2 Effekte auf die Vertikalverteilung von *D. magna*

Um mögliche direkte oder indirekte Effekte der Repellentien auf das Verhalten zu erfassen, wurde die Vertikalverteilung von *D. magna* in stratifizierten Wassersäulen untersucht ('Planktonorgel' nach Von Elert and Pohnert, 2000). Entsprechend konnte für die Untersuchung der direkten und indirekten Effekte gemeinsam die Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien vorgenommen werden.

#### 3.1.2.1 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien

Die mittleren Wiederfindungsraten für DEET betragen bei nominal 5 µg/L und bei 50 µg/L 100 % (Abbildung 9) und waren statistisch nicht unterscheidbar (t-Test,  $P = 0,429$ ). Für EBAAP ergaben sich Wiederfindungsraten von 83 % und 85 % (Abbildung 9), die statistisch nicht unterscheidbar waren (t-Test,  $P = 0,446$ ). Für Icaridin betragen die entsprechenden Raten 85 % und 89 % (Abbildung 9) und waren ebenfalls nicht statistisch unterscheidbar (t-Test,  $P = 0,521$ ). In allen Fällen waren die Normalverteilung und die Homogenität der Varianzen nicht verletzt.

Da in keinem Fall die Wiederfindungsraten bei 5 µg/L und bei 50 µg/L statistisch unterscheidbar waren, wurde für jedes Repellent aus den insgesamt 6 Wiederfindungsraten eine mittlere Wiederfindungsrate für die Verhaltensversuche in der Planktonorgel berechnet (Tabelle 5). Die hier ermittelten Wiederfindungsraten wurden, entsprechend der Dauer der Verhaltensversuche, nach einer Expositionszeit von 48 h ermittelt.

Abbildung 9: Wiederfindungsraten der Repellentien Plankton-Orgel Versuchen

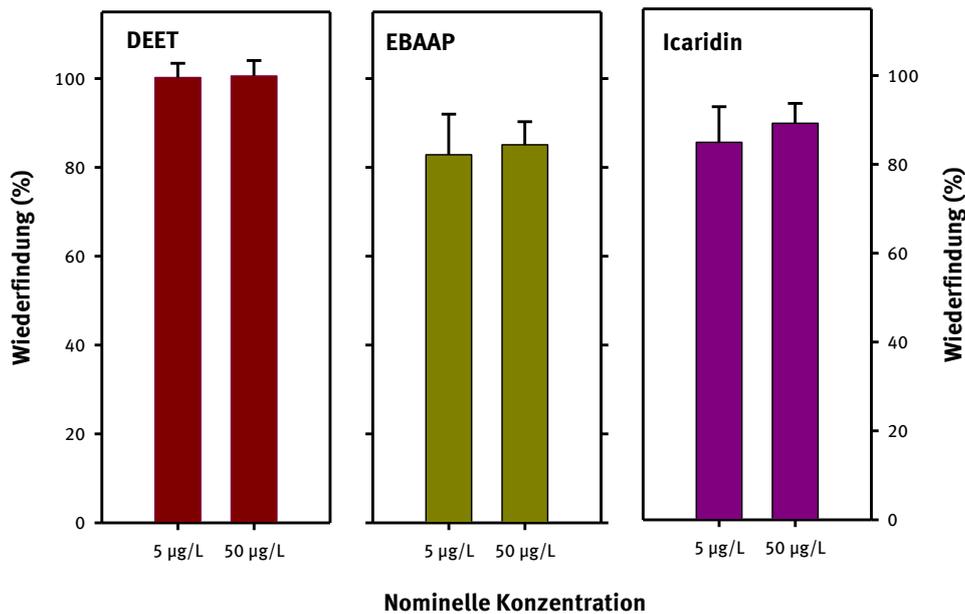


Tabelle 5: Mittlere Wiederfindungsraten (+/- SE) der Repellentien in den Plankton-Orgel Versuchen

DEET	EBAAP	Icaridin
98,1 +/- 1,8	84,6 +/- 5,0	85,9 +/- 4,3

Diese mittleren Raten wurden anschließend verwendet, um aus allen nominalen Konzentrationen die Effektivkonzentrationen zu berechnen, die im Verhaltensversuch in der Planktonorgel tatsächlich vorgelegen haben (Tabelle 6).

Tabelle 6: Nominal- und Effektivkonzentrationen der Repellentien in den Plankton-Orgel Versuchen

Nominalkonzentration (ng/L)	Effektivkonzentration DEET (ng/L)	Effektivkonzentration EBAAP (ng/L)	Effektivkonzentration Icaridin (ng/L)
5	4.9	4.2	4.3
50	49.0	42.3	42.9
250	245.2	211.5	214.7
500	490.4	423.0	429.5
5000	4903.8	4230.3	4294.8
50000	49037.6	42303.5	42948.4

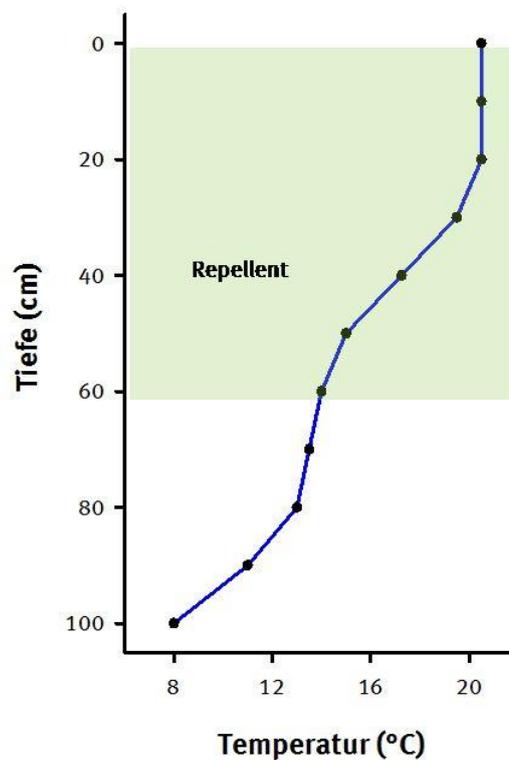
Zu Beginn der Versuche traten Probleme mit Memory-Effekten der verwendeten Röhren auf, die auf eine Verschleppung der Repellentien hindeuteten. Deswegen wurden in langwierigen Vorarbeiten die zunächst verwendeten Plexiglasröhren durch Glasröhren ersetzt und für diese letztlich ein Reini-

gungsprotokoll entwickelt, das aus einer Inkubation in angesäuertem Wasser und einer anschließenden Reinigung in einer entsprechend dimensionierten Pipettenspüle bestand. Durch diese Modifikationen konnten Memory-Effekte im Weiteren vollständig vermieden werden.

### 3.1.2.2 Direkte Effekte auf die Vertikalverteilung

Um zu untersuchen, ob die Repellentien sich direkt auf die Vertikalverteilung der Daphnien auswirken, wurden die zu untersuchenden Repellentien im oberen Teil der geschichteten Wassersäule (Epilimnion) eingebracht, so dass ein Repellent-freies Refugium im Hypolimnion zur Verfügung stand (Abbildung 10). Da Daphnien das kühlere Hypolimnion meiden, sollte ein möglicher Repellenteffekt an einem Aufenthalt der Daphnien im Meta- oder Hypolimnion zu erkennen sein.

Abbildung 10: 'Planktonorgel' zur Erfassung direkter Effekte der Repellentien auf die Vertikalverteilung von *D. magna*.



Entsprechend den Erwartungen hielten sich die Daphnien in den Repellent-freien Ansätzen ('Minus') durchweg im warmen Epilimnion auf (Abbildungen 11 - 13). In Gegenwart von effektiv 4 ng/L bis zu fast 50.000 ng/L Repellentien im Epilimnion kam es weder bei DEET (Abbildung 11) noch bei EBAAP (Abbildung 12) oder bei Icaridin (Abbildung 13) zu einem signifikanten Effekt auf die Aufenthaltstiefe (jeweils: one-way ANOVA,  $p > 0,05$ ), so dass keine Hinweise auf eine Repellentwirkung dieser Substanzen auf *D. magna* in einer geschichteten Wassersäule gefunden wurden.

Abbildung 11: Aufenthaltstiefe von *D. magna* in einer geschichteten Wassersäule mit und ohne DEET

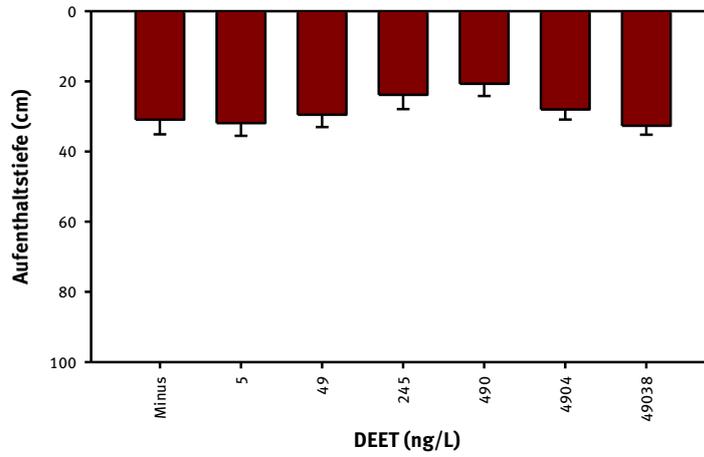


Abbildung 12: Aufenthaltstiefe von *D. magna* in einer geschichteten Wassersäule mit und ohne EBAAP

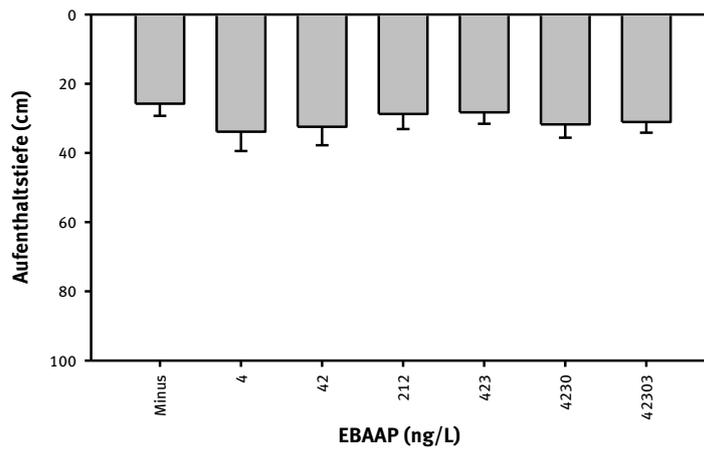
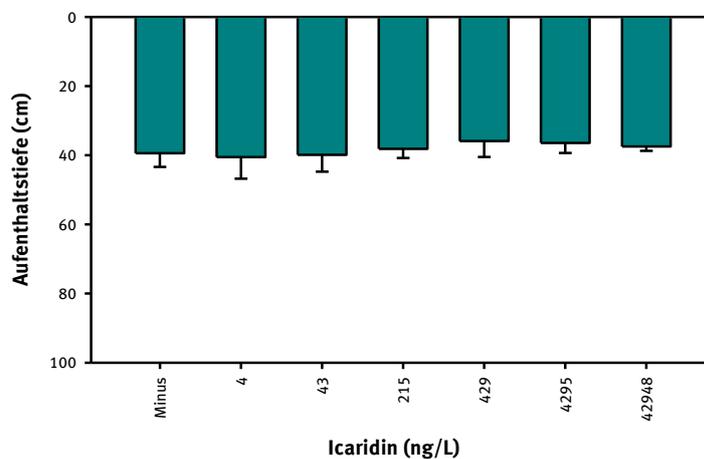


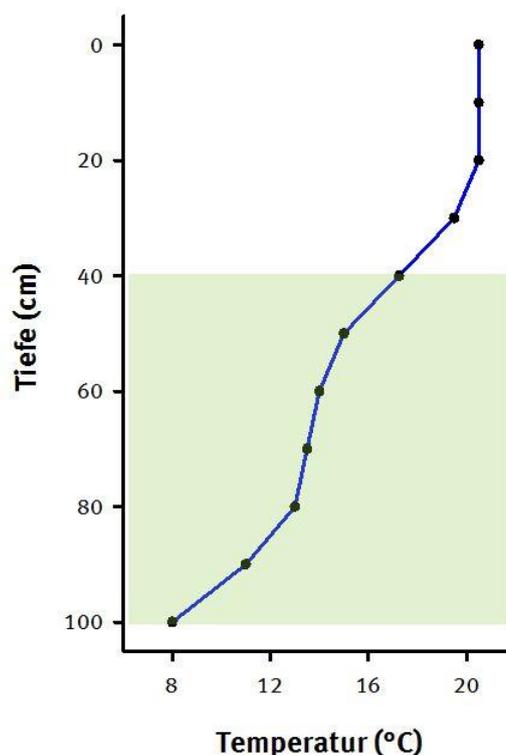
Abbildung 13: Aufenthaltstiefe von *D. magna* in einer geschichteten Wassersäule mit und ohne Icaridin



### 3.1.2.3 Effekte auf Infochemikalien-induziertes Verhalten

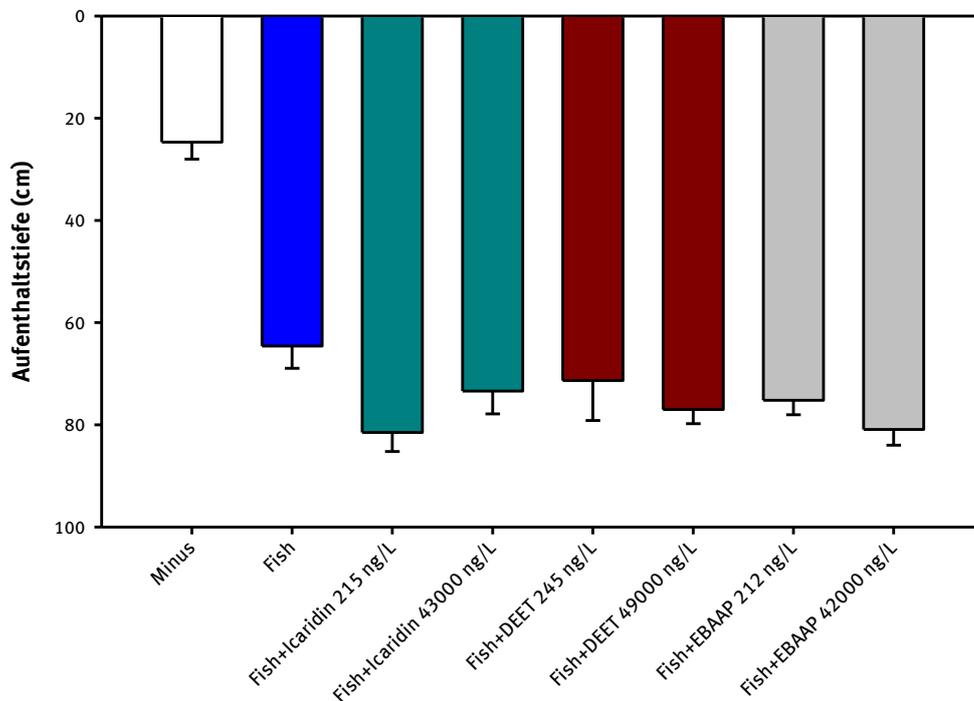
Fischbürtige Kairomone induzieren bei Daphnien diurnale Vertikalmigration (DVM), die sich in einem Aufenthalt der Tiere im kalten Hypolimnion unter Tagesbedingungen und einem Aufenthalt im Epilimnion unter Nachtbedingungen manifestiert. Um einen möglichen Infochemikalieneffekt im Sinne von Klaschka (2008) zu erfassen, wurde untersucht, ob der durch Fischkairomone unter Tagesbedingungen induzierte Aufenthalt der Daphnien im Hypolimnion in Gegenwart von EBAAP, DEET oder Icaridin unterdrückt werden würde. Dazu wurden die Repellentien lediglich im Hypolimnion eingebracht, um so ein Repellent-freies Refugium im Epilimnion zu erzeugen (Abbildung 14). Das Fischkairomon befand sich in den jeweiligen Ansätzen in allen Schichten der Wassersäule.

Abbildung 14: 'Planktonorgel' zur Erfassung der Vertikalverteilung von *D. magna* in einer stratifizierten Wassersäule mit fischbürtigen Kairomonen.



Ohne Fischkairomone hielten sich die Daphnien, wie schon in Abbildung 11 - 13 in den oberen Wasserschichten (Epilimnion) in einer mittleren Tiefe von 25 cm auf (Abbildung 15), während Fischkairomone einen signifikant verschiedenen Aufenthalt in 65 cm Tiefe im Hypolimnion induzierten (Abbildung 15). Wenn zusätzlich zum Kairomon noch Repellentien im Hypolimnion in Konzentrationen von 210-245 ng/L oder von 42-49 µg/L anwesend waren, so führte dies nicht zu signifikant veränderten Aufenthaltstiefen (die Aufenthaltstiefen im 'Minus'-Ansatz waren signifikant von allen anderen Ansätzen verschieden ( $p < 0,05$ , Tukey post-hoc Test nach one-way ANOVA; alle anderen Ansätze waren nicht voneinander verschieden; Abbildung 15). Es wurden somit keine Hinweise für eine Unterdrückung der durch Fischkairomone induzierten Vertikalwanderung durch Icaridin, DEET oder EBAAP gefunden.

Abbildung 15: Aufenthaltstiefe von *D. magna* in einer geschichteten Wassersäule mit fischbürtigen Kairomonen und Repellentien.

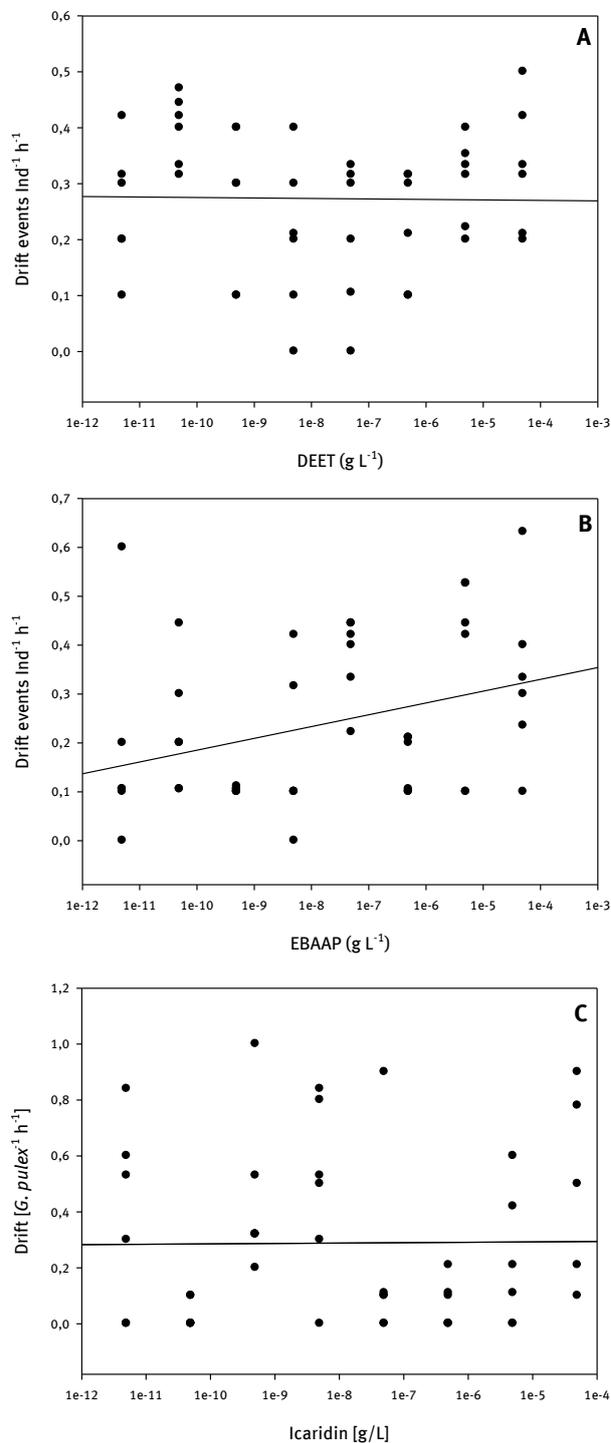


## 3.2 Organismische Drift

### 3.2.1 Versuchsorganismus *Gammarus pulex* (Crustacea, Gammaridae)

Bei keiner der getesteten Repellentienkonzentrationen (weder von DEET, EBAAP noch Icaridin) wurde eine signifikant gegenüber den Kontrollen veränderte Driftrate von *G. pulex* beobachtet (Abbildung 16). Die lineare Regression der Driftraten über die eingesetzten Repellentienkonzentrationen war für keine der drei getesteten Substanzen signifikant, so dass es in einem nominellen Konzentrationsbereich von 5 pg/L bis 50 µg/L keine Hinweise auf ein durch Repellentien verändertes Driftverhalten von *G. pulex* gibt (Abbildung 16).

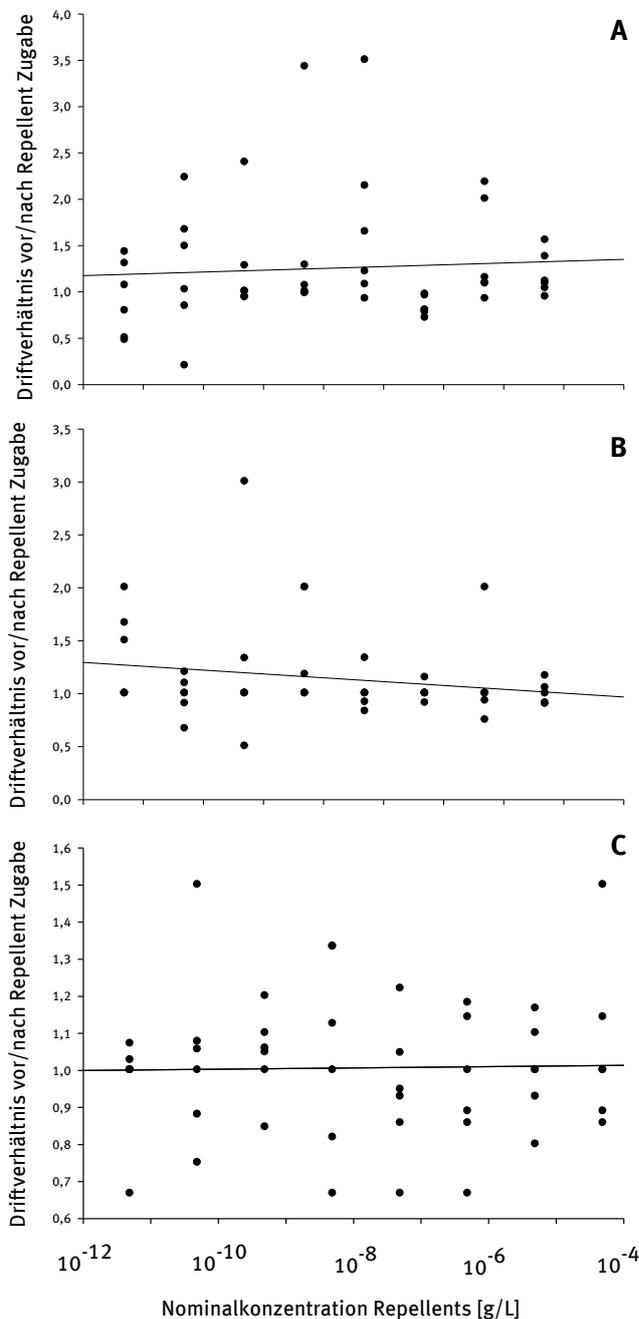
Abbildung 16: Driftrate von *Gammarus pulex* in Abhängigkeit der Konzentration der Repellentien A) DEET, B) EBAAP oder C) Icaridin.



### 3.2.2 Versuchsorganismus *Cloeon dipterum* (Ephemeroptera, Baetidae)

Bei keiner der getesteten Repellentienkonzentrationen (weder von DEET, EBAAP noch Icaridin) wurde eine signifikant gegenüber den Kontrollen verändertes Driftverhältnis von *C. dipterum* beobachtet (Abbildung 17).

Abbildung 17: Driftverhältnis von *Cloeon dipterum* in Abhängigkeit der Konzentrationen der Repellentien A) DEET, B) EBAAP oder C) Icaridin.



Die Regression der Driftverhältnisse über die eingesetzten Repellentienkonzentrationen war für keine der drei getesteten Substanzen signifikant, so dass es in einem nominellen Konzentrationsbereich von 5 pg/L bis 50 µg/L keine Hinweise auf ein durch Repellentien verändertes Driftverhalten von *C. dipterum* gibt (Abbildung 17). Da keine Effekte der Repellentien auf das Driftverhalten beider Invertebratenarten festgestellt werden konnten, wurde auf die ursprünglich geplanten Toxizitätstests zur Bestimmung der  $LC_{50}$  verzichtet. Es sind aber  $LC_{50}$ -Werte für die Toxizität von DEET gegenüber

*Daphnia magna* (75mg/L in 48h) in der Literatur verfügbar, welche weit über den im Freiland nachgewiesenen Konzentrationen liegen (Nendza and others 2013).

### 3.2.3 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien

Die Quantifizierung der Repellentien im Driftmeter-Assay zeigte, dass alle drei Repellentien in einem gut reproduzierbaren Verhältnis zur vorgegebenen nominellen Konzentration in den Driftmetern nachweisbar waren (Abbildung 18). Die gemessenen Effektivkonzentrationen lagen zwar nur bei max. 2/3 der Nominalkonzentrationen (Abbildung 18, Tabelle 7), da der in den drei Testsystemen eingesetzte Konzentrationsbereich von bis zu 50 µg/L um etwa das 10fache über den bisher im Freiland gemessenen Konzentrationen der Repellentien in Oberflächengewässern (Nendza and others 2013) liegt, erlauben die Testsysteme trotz der gegenüber den Nominalkonzentration etwas geringeren Effektivkonzentrationen eine verlässliche Abschätzung möglicher Repellenteffekte in natürlichen Oberflächengewässern.

Abbildung 18: Wiederfindungsraten der Repellentien in den Driftversuchen

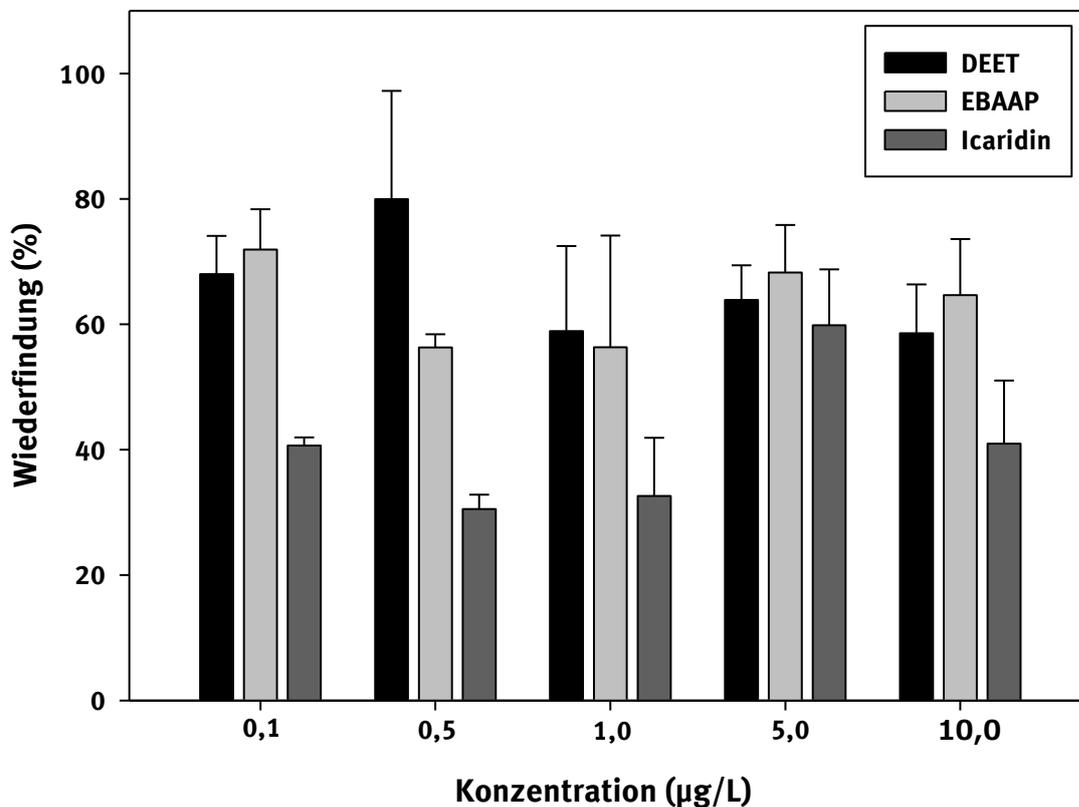


Tabelle 7: Mittlere Wiederfindungsraten (+/- SE) der Repellentien in den Driftversuchen

DEET	EBAAP	Icaridin
65,9 +/- 4,7	63,5 +/- 4,1	40,9 +/- 3,9

Diese mittleren Raten wurden anschließend verwendet, um aus allen nominalen Konzentrationen die Effektivkonzentrationen zu berechnen, die im Verhaltensversuch im Driftassay tatsächlich vorgelegen haben (Tabelle 8).

Tabelle 8: Nominal- und Effektivkonzentrationen der drei Repellentien in den Driftversuchen

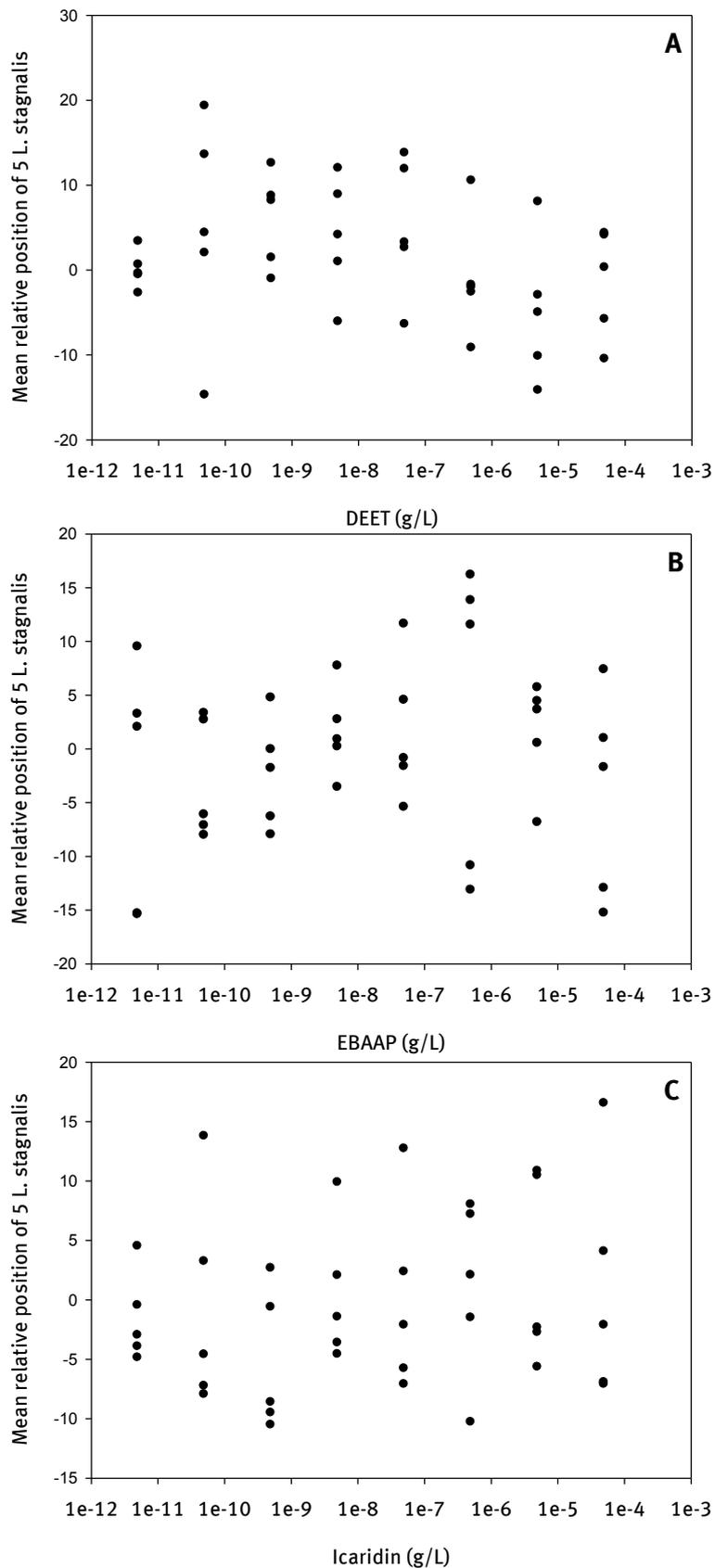
Nominalkonzentration (ng/L)	Effektivkonzentration DEET (ng/L)	Effektivkonzentration EBAAP (ng/L)	Effektivkonzentration Icaridin (ng/L)
0,005	0,0033	0,0032	0,0020
0,05	0,033	0,032	0,020
0,5	0,33	0,32	0,20
5	3,30	3,18	2,05
50	33,0	31,8	20,5
500	329,5	317,5	204,5
5000	3295,0	3175,0	2045,0
50000	32950,0	31750,0	20450,0

### 3.3 Effekte auf das Verhalten einer aquatischen Lungenschnecke

#### 3.3.1 Verhalten von *Lymnaea stagnalis*

Bei keiner der getesteten Repellentienkonzentrationen (weder von DEET, EBAAP noch Icaridin) wurde ein signifikant gegenüber den Kontrollen verändertes Bewegungsverhalten (gemessen als mittlere relative Distanz zur Repellent-Quelle) von *L. stagnalis* beobachtet (Abbildung 19). Die Regression der mittleren Positionen über die eingesetzten Repellentienkonzentrationen war für keine der drei getesteten Substanzen signifikant, so dass es in einem nominellen Konzentrationsbereich von 5 pg/L bis 50 µg/L keine Hinweise auf ein durch Repellentien verändertes Bewegungsverhalten von *L. stagnalis* gibt (Abbildung 19). Da keine Effekte der Repellentien auf die Orientierung der Gastropoden in der Versuchsarena festgestellt werden konnte, wurde davon ausgegangen, dass diese Substanzen für *L. stagnalis* entweder nicht wahrnehmbar oder nicht relevant sind. Daher wurde im Folgenden auf die ursprünglich geplanten Tests auf eine mögliche Interaktion der Repellentien mit algenbürtigen Lockstoffen sowie auf begleitende Toxizitätstests verzichtet.

Abbildung 19: Keine Verhaltensreaktion der Lungenschnecke *Lymnaea stagnalis* auf die Repellentien A) DEET, B) EBAAP oder C) Icaridin.



### 3.3.2 Bestimmung der Effektiv-Konzentrationen der Repellentien

Bei der Quantifizierung der Repellentien im Testsystem für das Verhalten aquatischer Lungenschnecken (in fünf verschiedenen Konzentrationen) zeigte sich, dass die gemessenen effektiven Konzentrationen aller drei Repellentien in einem sehr gut reproduzierbaren Verhältnis zur vorgegebenen nominellen Konzentration der Substanzen stehen, wobei die gemessenen Effektivkonzentrationen um ca. 30 - 50 % unter den Nominalkonzentrationen lagen (Abbildung 20, Tabelle 9). Da der in den drei Testsystemen eingesetzte Konzentrationsbereich von bis zu 50 µg/L um etwa das 10fache über den bisher im Freiland gemessenen Konzentrationen der Repellentien in Oberflächengewässern (Nendza and others 2013) liegt, erlauben die Testsysteme trotz der gegenüber den Nominalkonzentration etwas geringeren Effektivkonzentrationen eine verlässliche Abschätzung möglicher Repellenteffekte in natürlichen Oberflächengewässern.

Abbildung 20: Wiederfindungsraten der Repellentien in den Verhaltensversuchen mit der Lungenschnecke *L. stagnalis*

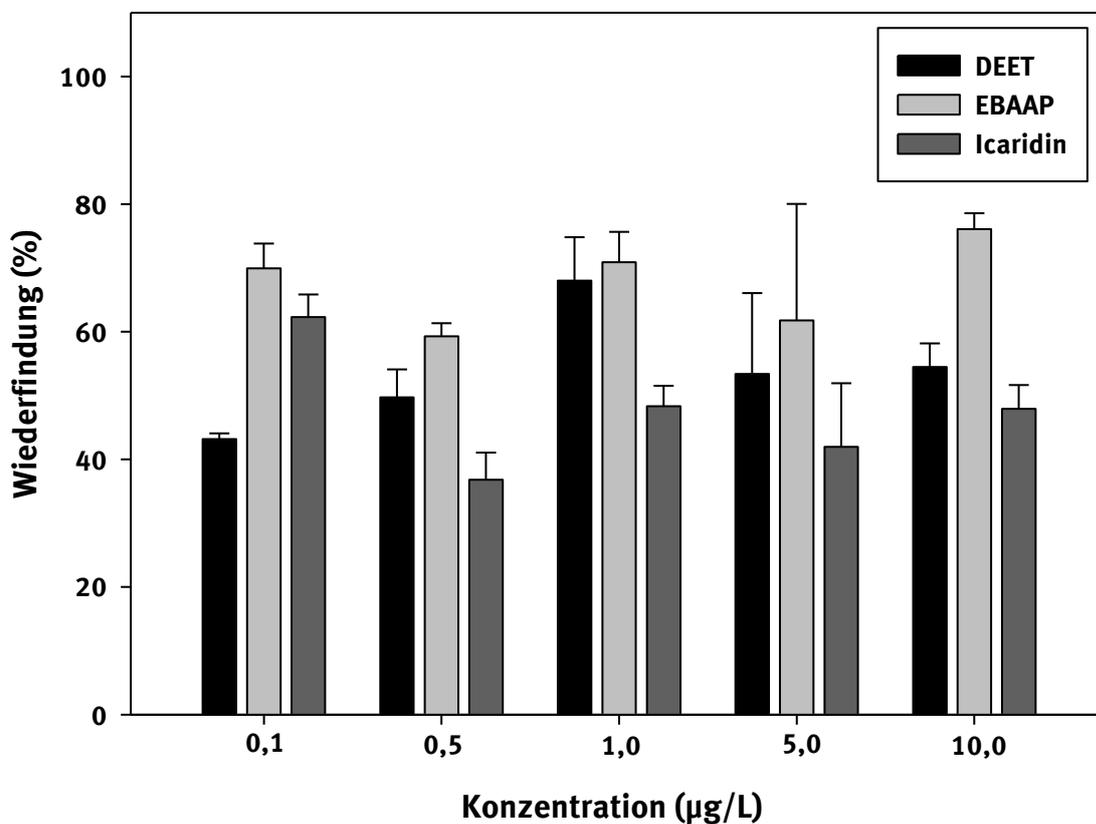


Tabelle 9: Mittlere Wiederfindungsraten (+/- SE) der Repellentien in den Verhaltensversuchen mit der Lungenschnecke *L. stagnalis*

DEET	EBAAP	Icaridin
55,8 +/- 3,3	70,6 +/- 2,3	48,6 +/- 2,9

Diese mittleren Raten wurden anschließend verwendet, um aus allen nominalen Konzentrationen die Effektivkonzentrationen zu berechnen, die im Verhaltensversuch im Driftassay tatsächlich vorgelegen haben (Tabelle 10).

Tabelle 10: Nominal- und Effektivkonzentrationen der drei Repellentien in den Verhaltensversuchen mit der Lungenschnecke *L. stagnalis*

Nominalkonzentration (ng/L)	Effektivkonzentration DEET (ng/L)	Effektivkonzentration EBAAP (ng/L)	Effektivkonzentration Icaridin (ng/L)
0,005	0,0028	0,0035	0,0024
0,05	0,028	0,035	0,024
0,5	0,28	0,35	0,24
5	2,79	3,53	2,43
50	27,9	35,3	24,3
500	279,0	353,0	243,0
5000	2790,0	3530,0	2430,0
50000	27900,0	35300,0	24300,0

## 4 Quellenverzeichnis

- Berghahn, R., S. Mohr, V. Hübner, R. Schmiediche, R. Schmiedling, E. Svetich-Will, and R. Schmidt (2012): Effects of repeated insecticide pulses on macroinvertebrate drift in indoor stream mesocosms. *Aquatic Toxicology* 122-123: 56-66.
- Bernhard, M., J. Müller, and T. R. Knepper (2006): Biodegradation of persistent polar pollutants in wastewater: Comparison of an optimised lab-scale membrane bioreactor and activated sludge treatment. *Water Research* 40: 3419-3428.
- Costanzo, S. D., A. J. Watkinson, E. J. Murby, D. W. Kolpin, and M. W. Sandstrom (2007). Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments? *Science of the Total Environment* 384: 214-220.
- Effertz, C., and E. Von Elert (2014): Light intensity controls anti-predator defences in *Daphnia* – the suppression of life-history changes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 281: 20133250.
- Elliott, J. M. (2002): The drift distances and time spent in the drift by freshwater shrimps, *Gammarus pulex*, in a small stony stream, and their implications for the interpretation of downstream dispersal. *Freshwat. Biol.* 47: 1403-1417.
- Elliott, J. M. (2003): A comparative study of the dispersal of 10 species of stream invertebrates. *Freshwat. Biol.* 48: 1652-1668.
- Fink, P., E. Von Elert, and F. Jüttner (2006a): Oxylipins from freshwater diatoms act as attractants for a benthic herbivore. *Archiv für Hydrobiologie* 167: 561-574.
- Fink, P., E. Von Elert, and F. Jüttner (2006b): Volatile foraging kairomones in the littoral zone: attraction of an herbivorous freshwater gastropod to algal odors. *Journal of Chemical Ecology* 32: 1867-1881.
- Klaschka, U. (2008): The infochemical effect - a new chapter in ecotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research* 15: 452-462.

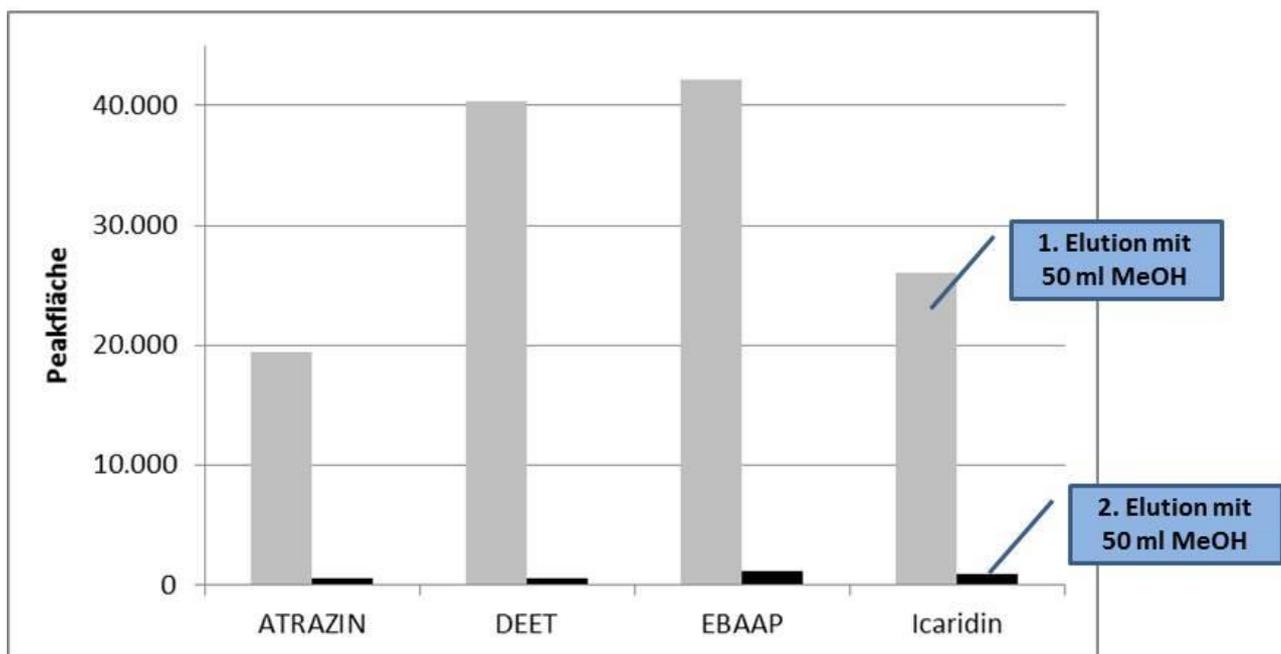
- Klaschka, U. (2009): A new challenge-development of test systems for the infochemical effect. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 370-388.
- Lampert, W., and I. Trubetskova (1996): Juvenile growth rate as a measure of fitness in *Daphnia*. *Functional Ecology* 10: 631-635.
- Loose, C. J., E. Von Elert, and P. Dawidowicz (1993): Chemically induced diel vertical migration in *Daphnia*: a new bioassay for kairomones exuded by fish. *Archiv für Hydrobiologie* 126: 329-337.
- Lürling, M., and M. Scheffer (2007): Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 374-379.
- Moelzner, J., and P. Fink (2014): The smell of good food: volatile infochemicals as resource quality indicators. *Journal of Animal Ecology* 83: 1007-1014.
- Nendza, M., U. Klaschka, and R. Berghahn (2013): Suitable test substances for proof of concept regarding infochemical effects in surface waters. *Environmental Sciences Europe* 25: 21.
- Pohnert, G. (2007): New frontiers in chemical ecology: Conference report of the 23rd annual meeting of the International Chemical Society. *Chembiochem* 8: 2163-2165.
- Roessink, I., L. B. Merga, H. J. Zweers, and P. J. Van den Brink (2013): The neonicotinoid Imidacloprid shows high chronic toxicity to mayfly nymphs. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32: 1096-1100.
- Turner, A. M., R. J. Bernot, and C. Boes (2000): Chemical cues modify species interactions: the ecological consequences of predator avoidance by freshwater snails. *Oikos* 88: 148-158.
- Von Elert, E. (2002): Determination of limiting polyunsaturated fatty acids in *Daphnia galeata* using a new method to enrich food algae with single fatty acids. *Limnology and Oceanography* 47: 1764-1773.
- Von Elert, E. (2012): Information conveyed by chemical cues, p. 19-38. *In* [eds.], C. Brönmark and L. A. Hansson *Chemical ecology in aquatic systems*. Oxford University Press.
- Von Elert, E., and C. J. Loose (1996): Predator-induced diel vertical migration in *Daphnia* - enrichment and preliminary chemical characterization of a kairomone exuded by fish. *Journal of Chemical Ecology* 22: 885-895.
- Von Elert, E., and G. Pohnert (2000): Predator specificity of kairomones in diel vertical migration of *Daphnia*: a chemical approach. *Oikos* 88: 119-128.
- Von Elert, E., and H. Stibor (2006): Predator-mediated life history shifts in *Daphnia*: enrichment and preliminary chemical characterisation of a kairomone exuded by fish. *Archiv für Hydrobiologie* 167: 21-35.
- Werth, C., and M. Marten (2007): Arthropoden-Drift als neue sensitive Messgröße in der Echtzeitüberwachung von Fließgewässern mit kontinuierlichen Biotestverfahren. *Deutsche Gesellschaft für Limnologie (DGL) - Tagungsbericht der Jahrestagung in Dresden 2006*: 564-568.

## 5 Stellungnahmen zu Rückfragen

### 5.1 Elutionsverhalten des IS im Vergleich zu den Repellentien

Für die Quantifizierung der Repellentien in den Driftmetern und den Verhaltensversuchen mit aquatischen Lungenschnecken wurde – wie bereits in der Literatur beschrieben (Bernhard and others 2006) – das Herbizid Atrazin als interner Standard für die Analytik verwendet. Es war die Rückfrage aufgeworfen worden, ob Atrazin ähnlich wie die Repellentien von der C18-SPE-Säule eluiert. Falls Atrazin besser (oder schlechter) eluiert als die Analyten, könnte dies eventuell die Wiederfindungsrate beeinflussen. Deshalb wurden die SPE-Kartuschen nach der Elution der Analyten mit Methanol nochmals mit demselben Volumen Methanol ein zweites Mal eluiert und auch dieses zweite Eluat aufgefangen, genau wie das erste Eluat prozessiert und die Signale von Atrazin und den Repellentien in der Probe des ersten und zweiten Eluats im GC-MS anschließend verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl Atrazin als auch alle drei untersuchten Repellentien bereits nahezu komplett bei der ersten Spülung der C18 Kartusche mit 50 ml Methanol komplett eluiert wurden (Abbildung 21) und sich daher keine Hinweise auf ein unterschiedliches Elutionsverhalten des IS und der Analyten ergaben. Somit ist auch nicht davon auszugehen, dass die Wiederfindungsraten dadurch beeinflusst oder verfälscht wurden.

Abbildung 21: Keine unterschiedliche Elution von Atrazin (IS) und Repellentien von der C18-SPE

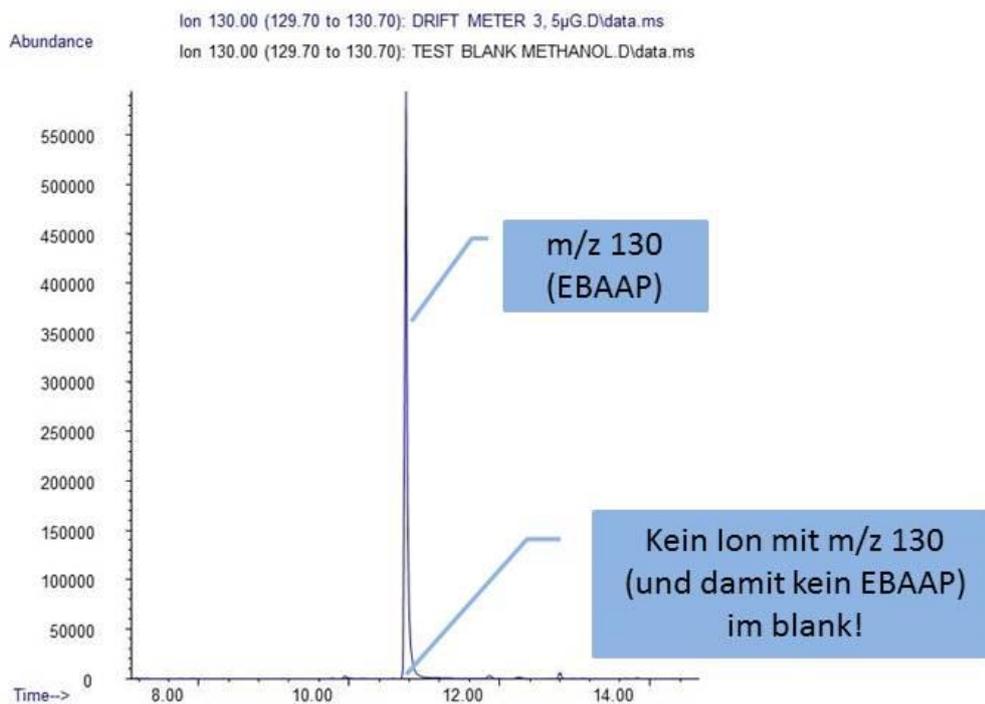


### 5.2 Interferenzen bei Zielionen der Repellentien mit Untergrund und matrixgestützte Standards zur Eichung

Bei der Analytik mittels GC-MS werden sowohl der interne Standard (IS, Atrazin) als auch die Analyten (Repellentien) anhand des Masse-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) charakteristischer Fragmentmassen-Ionen identifiziert. Die zur Identifizierung der Repellentien herangezogenen  $m/z$  von 119 bis 130 (bzw. 200 und 202 für Atrazin) liegen in einem relativ niedrigen  $m/z$  Bereich. In diesem niedrigen Bereich wäre es theoretisch denkbar, dass es leicht zu Interferenzen mit Fragmenten mit gleichem oder ähnlichem  $m/z$ -Verhältnis aus der Matrix oder dem Untergrund kommen könnte. Falls dem so wäre, könnte die Quantifizierung (welche ja auf den extrahierten Ionenspuren der für bestimmte Sub-

stanzen indikativen m/z Ionen beruhen) fehlerhaft sein. Eine mögliche Abhilfe in einem solchen Fall wären Matrix-gestützte Standards, welche für den Effekt ähnlicher m/z Ionen aus Matrix oder Untergrund kompensieren könnten. Daher wurden die Signale der für die Identifizierung und Quantifizierung der Analyten genutzten Zielionen (m/z Verhältnisse) als sogenannte ‚Extracted Ion Chromatogramme‘ extrahiert und für die Repellentien-haltigen Proben mit den Extracted Ion Chromatogrammen entsprechender Blindproben (identischer Aufarbeitung, aber ohne Repellentienzugabe) verglichen (Abbildung 22).

Abbildung 22: Overlay der ‚Extracted Ion Chromatogramme‘ für m/z 130 (Zielion für EBAAP) einer Probe und einer Kontrolle



Die Überlagerung der substanzspezifischen m/z Ionensignale (in Abbildung 22 beispielhaft für m/z 130, das Zielion für EBAAP dargestellt) zeigte, dass keines der Zielionen, welche zur Identifizierung von Atrazin, Icaridin, EBAAP oder DEET verwendet wurden, in den entsprechenden Blindproben detektiert werden konnten. Ein Einfluss von Ionensignalen aus dem Untergrund bzw. der Matrix ist somit auszuschließen und die Verwendung matrixgestützter Standards nicht erforderlich.

### 5.3 Einengen der Proben am Rotationsverdampfer

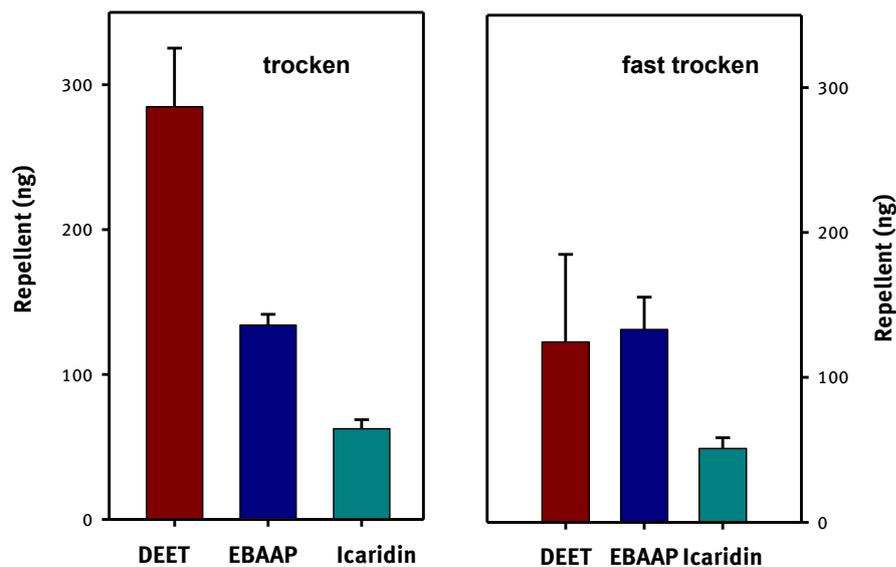
Bei der Quantifizierung der Repellentien wird das methanolische Eluat der C18-Festphasenextraktion am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt, bevor es dann in zwei Mal 1 mL Methanol aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt wird. Dies hatte zu der Anmerkung geführt, dass es evtl. zu einer erhöhten Wiederfindung der Repellentien führen würde, wenn die Probe am Rotationsverdampfer nicht vollständig zur Trockene eingengt würde, bevor sie mit 2 x 1 mL Methanol überführt wird.

Entsprechend wurden identische Proben mit allen drei Repellentien und Atrazin als internem Standard am Rotationsverdampfer vollständig oder nicht vollständig zur Trockene eingengt und an-

schließlich aus dem Verhältnis der Peakflächen von Repellent und internem Standard der Gehalt der Repellentien in der Probe berechnet.

In diesen dreifach replizierten Ansätzen ergab sich, dass für DEET die wiedergefundene Menge von 285 ng auf 125 ng sank, wenn nicht vollständig trocken rotiert wurde (Abbildung 23). Für EBAAP ergab sich kein Effekt (134 ng versus 133 ng) und für Icaridin ein schwächerer Effekt (63 ng versus 50 ng, Abbildung 23).

Abbildung 23: Effekte des Einrotierens auf die Wiederfindung der Repellentien



Wegen der deutlich höheren Verluste für DEET bei nicht vollständigem Einengen zur Trockene wurden alle Proben am Rotationsverdampfer vollständig zur Trockene eingengt. Dieses Vorgehen hatte zudem den Vorteil, dass 'vollständig zur Trockene' einen klarer definierten Endpunkt darstellte und damit die Reproduzierbarkeit höher ist, wie sich aus der tendenziell geringeren Variabilität der Daten beim vollständigen Einengen zur Trockene ergibt.