

UMWELTFORSCHUNGSPLAN DES
BUNDESMINISTERIUMS FÜR UMWELT,
NATURSCHUTZ UND REAKTORSICHERHEIT
- Umweltverträgliche Produkte, Umweltzeichen -

Forschungsbericht 298 28 415
UBA-FB 000239



Ökotoxikologische Prüfung von Pflanzenschutzmitteln hinsichtlich ihres Potenzials zur Grundwassergefährdung

von

Christoph Schäfers
Andrea Wenzel
Thomas Lukow
Irina Sehr

Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie,
Schmallenberg

in Zusammenarbeit mit

Edgar Egert

Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese TEXTE-Veröffentlichung kann bezogen werden bei
Vorauszahlung von DM 15,- (7,67 Euro)
durch Post- bzw. Banküberweisung,
Verrechnungsscheck oder Zahlkarte auf das

Konto Nummer 4327 65 - 104 bei der
Postbank Berlin (BLZ 10010010)
Fa. Werbung und Vertrieb,
Ahornstraße 1-2,
10787 Berlin

Parallel zur Überweisung richten Sie bitte
eine schriftliche Bestellung mit Nennung
der **Texte-Nummer** sowie des **Namens**
und der **Anschrift des Bestellers** an die
Firma Werbung und Vertrieb.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr
für die Richtigkeit, die Genauigkeit und
Vollständigkeit der Angaben sowie für
die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in der Studie geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: 030/8903-0
Telex: 183 756
Telefax: 030/8903 2285
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet IV 1.3
Dr. Bernd Stein

Berlin, Dezember 2001

Berichts – Kennblatt

1. Berichtsnummer UBA – FB 000239	2.	3.
4. Titel des Berichts Ökotoxikologische Prüfung von Pflanzenschutzmitteln hinsichtlich ihres Potentials zur Grundwassergefährdung		
5. Autor(en): Name(n), Vorname(n) Schäfers, Christoph; Egert, Edgar; Lukow, Thomas; Sehr, Irina; Wenzel, Andrea		8. Abschlussdatum 19.10.2001
6. Durchführende Institution (Name, Anschrift) Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie (IUCT) Postfach 1260 57392 Schmallenberg		9. Veröffentlichungsdatum
7. Fördernde Institution (Name, Anschrift) Umweltbundesamt Bismarckplatz 1 14193 Berlin		10. UFOPAN – Nr. 298 28 415
		11. Seitenzahl 88
		12. Literaturangaben 61
		13. Tabellen und Diagramme 12
		14. Abbildungen 30
15. Zusätzliche Angaben		
16. Kurzfassung Ziel des Projekts war der Vergleich der Empfindlichkeitsspektren der akuten Toxizität zwischen systematisch und physiologisch vergleichbaren Organismen aus Grundwasser und Oberflächengewässern. Die mikrobiologischen Untersuchungen umfassten funktionelle (Enzymaktivitäten) sowie strukturelle (genetische Diversität) Untersuchungen von Auswirkungen auf die mikrobiellen Lebensgemeinschaften. Für den metazoischen Teil wurden zunächst typische Vertreter der Grundwasser-Lebensgemeinschaft nach systematischer Repräsentativität für die bedeutendsten Organismengruppen ausgewählt. Die Tiere wurden aus Grundwasserkörpern im Ruhrtal und im Maintal bei Aschaffenburg gewonnen. Sie wurden bei ca. 10 °C im Dunkeln gehalten und getestet. Es wurden folgende Wirkstoffe ausgewählt: Cyprodinil, ein Fungizid, welches den Aufbaustoffwechsel hemmt; lambda-Cyhalothrin, ein neurotoxisches Insektizid; Bromoxynil-Octanoat, ein Herbizid mit vor allem narkotischer Wirkung als Octanoat. Die Wirkstoffe wurden in handelsüblichen Formulierungen eingesetzt. Die gemessenen Enzymaktivitäten der mikrobiellen Grundwasser-Lebensgemeinschaft werden durch die Wirkstoffe nicht stärker betroffen als die der Oberflächengewässer. Die Wirkung tritt temperaturbedingt später auf. Mögliche strukturelle Veränderungen waren mit den angewandten Methoden (noch) nicht messbar. Die Inhibition des metazoischen Aufbaustoffwechsels durch Cyprodinil scheint im Grundwasser 5-10fach verlangsamt. Die im Wesentlichen akute Wirkung von lambda-Cyhalothrin ist abhängig von der Nervenstruktur und Aktivität und betrifft die Niederen Krebse in Grund- und Oberflächenwasser ähnlich. Höhere Krebse sind durch ihre Nervalstruktur und die in Oberflächengewässern besonders hohe Aktivität stärker betroffen. Syncarida sind nerval anfällig und an die Grundwasserlebensweise maximal adaptiert: ihre Reaktionsnorm ermöglicht weniger Flexibilität, die Empfindlichkeit entspricht in etwa der der Oberflächengewässer-Organismen, ist jedoch 5-10fach verlangsamt. Die narkotische Wirkung von Bromoxynil-Octanoat ist unabhängig von der Lebensweise in Grund- oder Oberflächenwasser nach vergleichbaren Zeiträumen gleich stark. Die Lebensgemeinschaft des Grundwassers ist durch das Empfindlichkeitsspektrum der Organismen aus Oberflächengewässern ausreichend repräsentiert. Es gibt keine Hinweise auf physiologisch bedingte höhere Empfindlichkeiten von Grundwasserorganismen. Die Praxis der Risikobewertung anhand der bestehenden Standard-Testverfahren bietet nach gegenwärtigem Kenntnisstand genügend Sicherheit auch für die Grundwasser-Lebensgemeinschaften, wenn bei Hinweisen auf Auswirkungen auf Höhere Krebse neben <i>Daphnia magna</i> ein höherer Krebs (z.B. <i>Gammarus</i> , <i>Asellus</i> , <i>Hyalella</i>) getestet wird, um die begrenzte Reaktionsnorm der Syncarida abzubilden.		
17. Schlagwörter Grundwasser, Pflanzenschutzmittel, Lebensgemeinschaft, Empfindlichkeit, Crustacea, Prüfstrategie		
18. Preis	19.	20.

Report Form

1. Report No. UBA – FB 000239	2.	3.
4. Report Title Ecotoxicological testing of pesticides with respect to their potential of endangering groundwater communities		
5. Author(s): Family Name(s), First Name(s) Schäfers, Christoph; Egert, Edgar; Lukow, Thomas; Sehr, Irina; Wenzel, Andrea		8. Report Date 19.10.2001
6. Performing Organisation (Name, Address) Fraunhofer-Institut for Environmental Chemistry and Ecotoxicology (IUCT) P.O. Box 1260 57392 Schmallenberg Germany		9. Publication Date
		10. UFOPAN – Ref. No. 298 28 415
		11. No. of Pages 88
		12. No. of References 61
		13. No. of Tables, Diagrams 12
7. Sponsoring Agency (Name, Address) Umweltbundesamt Bismarckplatz 1 14193 Berlin		14. No. of Figures 30
15. Supplementary Notes		
16. Abstract <p>The major objective of the presented work was the comparison of the sensitivity of physiologically / taxonomically comparable species from groundwater or surface water in acute toxicity studies with the same substances.</p> <p>Microbiological investigations comprised of functional (enzymatic activities) and structural (genetic diversity) investigations of effects on microbial communities of ground- and surface water samples. Concerning the metazoan community, the sensitivities of groundwater organisms to three pesticides were investigated and compared with those of taxonomic relatives from surface waters in long-term toxicity tests. The organisms were selected reflecting taxonomic representativity and taken from groundwater bodies in the Ruhr and Main valleys. They were held and tested at about 10 °C in the dark. The following pesticides were selected: the fungicide Cyprodinil inhibiting anabolism, the neurotoxic insecticide lambda-Cyhalothrin, and the herbicide Bromoxynil-Octanoat which is mainly cytotoxic due to the unpolar narcotic action of the Octanoat. The active ingredients were tested using commercially available single a.i. formulations, the concentrations were analytically controlled.</p> <p>The effects of the active ingredients were not measured to be more pronounced in microbial groundwater communities compared to the surface water communities. Additionally, the effects were retarded due to lower temperatures. Potential structural changes could not (yet) be observed by the methods used. Anabolic inhibition effects in groundwater organisms seem to be retarded by Cyprodinil 5-10 times compared to surface water species. The mainly acute effect of lambda-Cyhalothrin ist due to the nerve structure and activity, affecting lower crustaceans of ground- and surface waters in a similar way. Higher crustaceans in general exhibit more sensitive nerve structure and – in surface water – higher activity. Thus, groundwater higher crustaceans seem to be less sensitive. Syncarida, however, are highly adapted to the constant groundwater conditions and less flexible towards additional stress compared to <i>Niphargus fontanus</i>, resulting in retarded, but similar sensitivity as surface water higher crustaceans. The narcotic effects of Bromoxynil-Octanoat seem to be similar in ground- and surface water organisms after comparable exposure durations, irrespectively of the way of living.</p> <p>The sensitivity distribution of lethal toxicity to groundwater species can be represented by taxonomically and physiologically comparable species of surface waters. No hints to a physiologically higher sensitivity of groundwater organisms could be observed. Risk assessment based on standard organisms at the actual state of knowledge seems to be sufficiently protective also for groundwater communities. If there are concerns about potential effects to higher crustaceans, a representative species (e.g. <i>Gammarus</i>, <i>Asellus</i>, <i>Hyalella</i>) should be tested in order to be protective regarding the shallow norm of reaction of Syncarida.</p>		
17. Keywords groundwater, pesticides, community, sensitivity, Crustacea, testing strategy		
18. Price	19.	20.

Ausführliche Zusammenfassung

Erst in jüngerer Zeit wird eine Grundwassergefährdung nicht mehr ausschließlich unter dem Aspekt der Gefährdung von Ressourcen für menschliches Trinkwasser gesehen. Unter dem Eindruck der Beschreibung einer großen Zahl verschiedenster grundwassertypischer Arten aus vielen taxonomischen Gruppen stellte sich im Rahmen der Zulassung von Pflanzenschutzmitteln die Frage, ob die Praxis der Risikobewertung anhand der bestehenden Standard-Testverfahren genügend Sicherheit auch für die Grundwasser-Lebensgemeinschaften bietet.

Ziel des Projekts war der Vergleich der Empfindlichkeitsspektren der akuten Toxizität zwischen systematisch und physiologisch vergleichbaren Organismen aus Grundwasser und Oberflächengewässern. Möglicherweise abweichende Antwortmuster auf bestimmte Wirktypen, die sich mit grundwassertypischen Eigenschaften erklären lassen, sollten identifiziert und interpretiert werden. Es wurden sowohl Mikroorganismen als auch Metazoen untersucht.

Material und Methoden

Die mikrobiologischen Untersuchungen umfassten funktionelle Prüfungen (Enzymaktivitäten) an Laborkulturen von *Pseudomonas putida* (Standard-Testorganismus) und an mikrobiellen Lebensgemeinschaften aus Grundwasser- und Oberflächenwasserproben, sowie strukturelle Untersuchungen der mikrobiellen Lebensgemeinschaften (genetische Diversität) mittels RFLP und T-RFLP.

Für den metazoischen Teil wurden zunächst typische Vertreter der Grundwasser-Lebensgemeinschaft identifiziert. Da die trophischen Ebenen weniger differenziert sind als in Oberflächengewässern, wurde vor allem nach systematischer Repräsentativität für die bedeutendsten Organismengruppen ausgewählt. So wurden vor allem Vertreter der Crustaceen einbezogen: Harpacticoida (Copepoda, Ruderfußkrebse), Amphipoda (Flohkrebse) und Syncarida (Brunnenkrebse). Die Tiere wurden aus Grundwasserkörpern im Ruhrtal (Langsamsandfilter der Gelsen Wasser AG bei Echthausen/Ruhr, Kontakt zu Oberflächenwasser, echte Grundwasserbewohner ca. 20 %) und im Maintal bei Aschaffenburg (isolierter Wasserkörper, echte Grundwasserbewohner ca. 95 %) gewonnen. Sie wurden bei ca. 10 °C im Dunkeln gehalten und getestet. Eine Zucht oder die Durchführung chronischer Tests war wegen der um den Faktor 5-10 verlangsamten Lebensleistungen nicht möglich.

Wichtigstes Kriterium bei der Auswahl der drei zu prüfenden Pflanzenschutzmittel war ein möglichst unterschiedlicher Wirkmechanismus. Dann sollte eine hohe Toxizität gegenüber Crustaceen gegeben, sowie die Verfügbarkeit von Vergleichsdaten bezüglich Organismen aus Oberflächengewässern gewährleistet sein. Die Relevanz der Mittel für eine Grundwasserbelastung spielte indes keine Rolle. Nach Absprache mit dem Umweltbundesamt wurden folgende Wirkstoffe ausgewählt: Cyprodinil, ein Fungizid, welches durch Inhibition der Methionin-Biosynthese den Aufbaustoffwechsel hemmt; lambda-Cyhalothrin, ein Insektizid (Pyrethroid) mit extrem hoher Toxizität gegenüber höheren Krebsen, welches durch Wirkung auf das axonische Nervensystem die entsprechende Aktivität hemmt (deshalb nicht mit Mikroorganismen getestet); Bromoxynil-

Octanoat, ein Herbizid, welches vor allem durch seine narkotische Wirkung als Octanoat die Zellfunktion beeinträchtigt und daher eher als Repräsentant unspezifischer unpolarer Chemikalien gelten kann. Die Wirkstoffe wurden in handelsüblichen Formulierungen eingesetzt.

Folgende Prinzipien für die Ableitung von Effektkonzentrationen wurden eingehalten: Die mittleren Konzentrationen pro Konzentrationsstufe (bei lambda-Cyhalothrin unter Addition der Isomere) wurden gemessen. Wenn die analytischen Messergebnisse mindestens 80 % der nominalen Werte ergaben, wurde der Bezug auf nominale Konzentrationen vorgenommen. Bei akuter Wirkung und schnellem Abbau (Bromoxynil-Octanoat) wurde der Bezug auf Initialkonzentrationen vorgenommen. Bei täglicher Bonitur betrug die Versuchsdauer 3-4 Wochen, wenn die Kontrollsterblichkeit höchstens 20 % betrug (Ausnahme: Bromoxynil-Octanoat). Da subletale Effekte im Verlauf letal wurden oder sich Wiedererholung einstellte, wurden nur letale Effekte betrachtet. Bei unklaren Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen wurde eine Auswertung bei der höchsten Konzentration ohne Sterblichkeit begonnen. Die Effektkonzentrationen eines Mittels gegenüber einer Art über verschiedene Zeiträume wurden im Rahmen eines einzigen Tests gewonnen.

Ergebnisse und Diskussion

Die gemessenen Enzymaktivitäten der mikrobiellen Grundwasser-Lebensgemeinschaft werden durch die Wirkstoffe Cyprodinil und Bromoxynil-Octanoat nicht stärker betroffen als die der Oberflächengewässer. Die Wirkung tritt temperaturbedingt später auf. Mögliche strukturelle Veränderungen waren mit den angewandten Methoden (noch) nicht messbar.

Für die Metazoen wurde mit Cyprodinil ein LC50-Wert nach einer mit Standardtests vergleichbaren Expositionsdauer von 2430 µg/l bei Höheren Krebsen (*Niphargus fontanus*, Amphipoda) und 1320 µg/l bei Niederen Krebsen (*Chappuisius inopinus*, Harpacticoida) bestimmt. Nach verlängerter Exposition (5-10fache Dauer von Standardtests) sank der Wert für den Amphipoden auf 940 µg/l und für den Harpacticoiden auf 170 µg/l. Damit erwies sich der Niedere Krebs erst nach 5-10facher Expositionsdauer als mit *Daphnia magna* vergleichbar empfindlich (Faktor 1,7). Der Höhere Krebs war auch nach 10facher Expositionsdauer um zwei Größenordnungen unempfindlicher als der Standardorganismus *Mysidopsis bahia*. Fazit: Die Inhibition des Aufbaustoffwechsels durch Cyprodinil scheint im Grundwasser 5-10fach verlangsamt. Amphipoden scheinen durch ihren besonders hohen Umsatz in Oberflächengewässern stärker betroffen.

Mit lambda-Cyhalothrin wurde die LC50 nach vergleichbarer (und in Klammern 5-10 verlängerter) Expositionsdauer für *Niphargus fontanus* mit 880 (150) ng/l, für *Antrobathynella stammeri* (Syncarida) mit 300 (42) ng/l, für *Chappuisius inopinus* mit 1040 (800) ng/l, für Copepodite von *Phyllognathopus vigueri* (Harpacticoida) mit 600 (86) ng/l und für *Pseudocandona zschokkei* (Ostracoda) mit 2080 (15) ng/l bestimmt. Für die Grundwassermilbe *Lobohalacarus weberi* ergab sich eine LC50 von 280 (110) ng/l. Die Empfindlichkeitsverteilungen bei Grundwasserorganismen nach mit Standardtests vergleichbarer und 5-10fach verlängerter Expositionsdauer werden beide von der Empfindlichkeitsverteilung systematisch grob vergleichbarer Oberflächengewässerarten

abgedeckt. Fazit: Die im Wesentlichen akute Wirkung von lambda-Cyhalothrin ist abhängig von der Nervenstruktur und Aktivität und betrifft die Niederen Krebse in Grund- und Oberflächenwasser ähnlich. Höhere Krebse sind durch ihre Nervalstruktur und die in Oberflächengewässern besonders hohe Aktivität stärker betroffen. Syncarida sind nerval anfällig und an die Grundwasserlebensweise maximal adaptiert; ihre Reaktionsnorm ermöglicht weniger Flexibilität als die von *Niphargus fontanus*. Die Empfindlichkeit entspricht in etwa der Oberflächengewässer-Organismen, ist jedoch 5-10fach verlangsamt. Milben sind im Grundwasser durch geringere Aktivität etwas unempfindlicher als in Oberflächengewässern.

Bei Bromoxynil-Octanoat zeigten sich geringe Empfindlichkeitsunterschiede zwischen den systematischen Einheiten und eine hohe Übereinstimmung der Empfindlichkeit von Grundwasserformen und Oberflächengewässer-Organismen nach ähnlichen Expositionszeiträumen (Faktor um 1); die Expositionsdauer ist weniger entscheidend, da sich im statischen Test die Testsubstanz schnell abbaut. Die Vertreter der Harpacticoida und Ostracoda weisen LC50 nach 48 h von 109 bzw. 160 µg/l gegenüber 110 µg/l von *D. magna* auf. Der Empfindlichkeitsverlauf über die Zeit des Vertreters der Syncarida ist im Vergleich zu dem des Standardorganismus *Mysidopsis bahia* beinahe deckungsgleich. Wieder tendiert *Niphargus fontanus* dazu, unempfindlicher zu sein. Fazit: Die narkotische Wirkung von Bromoxynil-Octanoat ist unabhängig von der Lebensweise in Grund- oder Oberflächenwasser nach vergleichbaren Zeiträumen gleich stark.

Schlussfolgerungen

Das Empfindlichkeitsspektrum der akuten Toxizität ist in systematisch/physiologisch vergleichbaren Organismen aus Grund- und Oberflächengewässern grundsätzlich ähnlich. Werden Leistungen des Aufbaustoffwechsels oder der Aktivität betroffen, reagieren Grundwasserorganismen deutlich (um den Faktor 5-10) später oder sind unempfindlicher. Es gibt keine Hinweise auf physiologisch bedingte höhere Empfindlichkeiten von Grundwasserorganismen. Die Lebensgemeinschaft des Grundwassers ist durch das Empfindlichkeitsspektrum der Organismen aus Oberflächengewässern ausreichend repräsentiert. Die Praxis der Risikobewertung anhand der bestehenden Standard-Testverfahren bietet nach gegenwärtigem Kenntnisstand genügend Sicherheit auch für die Grundwasser-Lebensgemeinschaften, wenn folgende Aspekte beachtet werden: Die Prüfung von Lysimeter-Sickerwässern ist durch den Einsatz von *Daphnia magna* in der Regel repräsentativ. Wenn eine Exposition von Grundwasser abzusehen ist, sollte besonders auf die Toxizität gegenüber Crustaceen geachtet werden. Bei Hinweisen auf Auswirkungen auf Höhere Krebse sollte neben *Daphnia magna* ein höherer Krebs (z.B. *Gammarus*, *Asellus*, *Hyaella*) getestet werden, um die begrenzte Reaktionsnorm der Syncarida abzubilden. Die Populationsdynamik der Grundwasserorganismen ermöglicht nur sehr langsame und geringe Wiedererholung, sowohl intrinsisch (sehr geringe Reproduktionsraten), als auch durch Wiederbesiedlung (geringe Migrationsraten).

Ecotoxicological testing of pesticides with respect to their potential of endangering groundwater communities

Executive summary

In recent years the threat of chemical pollution to groundwater is no longer regarded as a concern for human drinking water resources only. With growing information on the complexity of the biological ground water community the groundwater ecosystem is regarded as a good of protection in its own right. Risk assessment for aquatic systems so far is restricted to surface waters and is based on standard aquatic test results. The question is raised whether the common practice of risk assessment is also protective to groundwater communities.

The major objective of the presented work was the comparison of the sensitivity of physiologically / taxonomically comparable species from groundwater or surface water in acute toxicity studies with the same substances. Where possible, hints to chronic toxicity should be derived. Potential deviations of specific responses should be identified and interpreted in the light of properties specific for groundwater habitats. The investigations were addressed to microorganisms as well as to metazoan species.

Methods

Microbiological investigations comprised of functional tests (enzymatic activities) with a laboratory strain of the standard organism *Pseudomonas putida* and microbial communities of ground- and surface water samples, as well as of structural investigations of the microbial communities (genetic diversity) by RFLP and T-RFLP.

Concerning the metazoan community, the sensitivities of groundwater organisms to three pesticides were investigated and compared with those of taxonomic relatives from surface waters in long-term toxicity tests. As crustaceans represent the most important groundwater taxa, copepod (Harpacticoida) and amphipod species were selected as well as Syncarida, a group only present in groundwater. The specimen were taken from groundwater bodies in the Ruhr and Main valleys. They were held and tested at about 10 °C in the dark. Breeding or the performance of chronic tests were not possible because of the life performances being retarded by a factor of 5–10 compared with surface water organisms.

The pesticides were selected according to their toxicity to crustaceans, to the availability of comparative data sets and mainly to the differences of modes of action: the fungicide Cyprodinil inhibits anabolism, the pyrethroid lambda-Cyhalothrin is extremely toxic to higher crustaceans due to the inhibition of the activity mediated by the axonic system (therefore not used in microbiological tests), and the herbicide Bromoxynil-Octanoat is mainly cytotoxic due to the unpolar narcotic action of the Octanoat. The active ingredients were tested using

commercially available single a.i. formulations, the concentrations were analytically controlled.

The effects were related to mean measured concentrations (lambda-Cyhalothrin: isomeres summed up), nominal concentrations (if analyses did not deviate by more than 20 %), or initial concentrations (Bromoxynil-Octanoat because of fast dissipation and acute mode of action). The specimen were observed daily. Test duration was terminated by control mortality above 20 %, but did not exceed 3–4 weeks (shorter duration with Bromoxynil-Octanoat).

Only lethal effects were assessed. The evaluation used concentrations above the highest concentration without mortality.

Results and Discussion

The effects of the active ingredients Cyprodinil and Bromoxynil-Octanoat were not measured to be more pronounced in microbial groundwater communities compared to the surface water communities. Additionally, the effects were retarded due to lower temperatures. Potential structural changes could not (yet) be observed by the methods used.

In lower crustaceans, Cyprodinil caused lethal effects of the same sensitivity in surface water as in groundwater, when exposure duration was 5–10fold higher. The groundwater amphipod *Niphargus fontanus*, even when exposed for the 10fold duration, was by two orders of magnitude less sensitive than the standard higher crustacean *Mysidopsis bahia*. Anabolic inhibition effects in groundwater organisms seem to be retarded 5-10 times compared to surface water species. Amphipods seem to be much more sensitive in surface waters, probably because of the extreme differences in metabolic turnover rates.

The distribution of sensitivity to lambda-Cyhalothrin for surface water organisms covered the distributions of groundwater organisms after short term exposure as well as after 5–10fold exposure duration. Lower crustaceans from ground- and surface water exhibit similar sensitivity, whereas groundwater higher crustaceans showed lower sensitivity compared to surface water higher crustaceans, which have been tested to be most sensitive to pyrethroids. Syncarida seem to be as sensitive as surface water higher crustaceans when exposed for a 5-10fold duration. The mainly acute effect of lambda-Cyhalothrin is due to the nerve structure and activity, affecting lower crustaceans of ground- and surface waters in a similar way. Higher crustaceans in general exhibit more sensitive nerve structure and – in surface water – higher activity. Thus, groundwater higher crustaceans seem to be less sensitive. Syncarida, however, are highly adapted to the constant groundwater conditions and less flexible towards additional stress compared to *Niphargus fontanus*, resulting in retarded, but similar sensitivity as surface water higher crustaceans.

With Bromoxynil-Octanoat hardly any differences in sensitivity between taxonomic groups or between groundwater and surface water organisms after short term exposure could be observed: Representatives of Harpacticoida and Ostracoda had similar LC50s after 48 hours compared with the *D. magna* EC50; the development of the LC50 value over time was nearly

identical in the representative of groundwater Syncarida and the standard higher crustacean *Mysidopsis bahia*. Because the substance dissipated quickly from the water even at groundwater temperatures, comparisons with static long-term exposure are neither possible nor necessary. Again, *Niphargus fontanus* tended to be less sensitive. Narcotic effects seem to be similar in ground- and surface water organisms after comparable exposure durations, irrespectively of the way of living.

Conclusions

The sensitivity distribution of lethal toxicity to groundwater species can be represented by taxonomically and physiologically comparable species of surface waters. Inhibition of the anabolism or the activity affect groundwater organisms less or clearly retarded as compared to surface water organisms. No hints to a physiologically higher sensitivity of groundwater organisms could be observed. Risk assessment based on standard organisms at the actual state of knowledge seems to be sufficiently protective also for groundwater communities. If there are concerns about potential effects to higher crustaceans, a representative species (e.g. *Gammarus*, *Asellus*, *Hyaella*) should be tested in order to be protective regarding the shallow norm of reaction of Syncarida (as shown with lambda-Cyhalothrin). The population dynamics of groundwater species allows only very slow and insufficient recovery, in terms of reproduction as well as migration.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Ausführliche Zusammenfassung	1
Executive summary	4
Inhaltsverzeichnis	7
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Kurzer Abriss der geschichtlichen Entwicklung der Grundwasserökologie (Edgar Egert).....	12
1.2 Der Lebensraum Grundwasser und die Adaptation seiner Bewohner (Edgar Egert)	13
1.2.1 Die Bedeutung der geologischen und physikalischen Faktoren für den Lebensraum Grundwasser	14
1.2.2 Anpassung von Grundwasserorganismen	16
1.2.3 Grundwassertiere und Trinkwassergewinnung	19
1.3 Ökosystemeigenschaften	19
1.4 Fragestellungen und Lösungsansätze des Vorhabens	20
1.4.1 Mikrobiologie (mikrobieller Abbau)	20
1.4.2 Makrobiologie	21
1.4.3 Auswahl der Pflanzenschutzmittel	23
1.4.4 Beiträge zu einer Prüf- und Bewertungsstrategie	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Mikrobiologische Untersuchungen	25
2.1.1 Beschaffung und Bereitung der Wasserproben	25
2.1.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten	25
2.1.3 Untersuchungen zur Struktur: genetische Diversität mittels RFLP und T-RFLP	29
2.2 Makrobiologische Untersuchungen	35
2.2.1 Beschaffung der Grundwasserorganismen	35
2.2.2 Hälterung	36
2.2.3 Testansatz	36
2.2.4 Prinzipien für die Ableitung von Effektkonzentrationen	37
2.3 Analytik	38
2.3.1 Probenahme	38
2.3.2 Analysenmethoden	38
2.4 Auswerteverfahren	40
3 Ergebnisse	41
3.1 Vergleich der Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften in Grund- und Oberflächenwasser	41
3.2 Wirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf die Struktur und Leistungen mikrobieller Lebensgemeinschaften	46
3.2.1 Cyprodinil	46
3.2.2 Bromoxynil-Octanoat	48
3.3 Wirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Grundwasser-Arthropoden	55
3.3.1 Cyprodinil	55
3.3.2 Lambda-Cyhalothrin	57
3.3.3 Bromoxynil-Octanoat	68
4 Diskussion	70
4.1 Cyprodinil	70
4.1.1 Mikroorganismen	70
4.1.2 Crustaceen	70

4.2	Lambda-Cyhalothrin.....	71
4.2.1	Höhere Krebse	71
4.2.2	Niedere Krebse	71
4.2.3	Acari	72
4.3	Bromoxynil-Octanoat	73
4.3.1	Mikroorganismen.....	73
4.3.2	Crustaceen	73
4.4	Allgemeine ableitbare Tendenzen	73
4.5	Vergleich von Literaturdaten.....	75
4.6	Durchführbarkeit ökotoxikologischer Untersuchungen an Grundwasserorganismen	77
4.6.1	Hälterung / Kultivierung.....	77
4.6.2	Beschaffung	77
4.6.3	Testung	77
4.6.4	Vergleich mikrobieller Lebensgemeinschaften	78
5	Schlussfolgerungen.....	81
5.1	Potential von Pflanzenschutzmitteln zur Grundwassergefährdung	81
5.2	Methodik zum Vergleich von mikrobiellen Lebensgemeinschaften	82
6	Ausblick.....	83
7	Literatur	84
8	Hinweis.....	87
9	Danksagung	87

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Standorte und Tierzahlen der Probennahmen 1999.....	36
Tabelle 2: Phylogenetische Zuordnung der sequenzierten Klone (Grundwasser).....	42
Tabelle 3: Phylogenetische Zuordnung der sequenzierten Klone (Oberflächenwasser).....	42
Tabelle 4: Phylogenetische Zuordnung der auf LB-Medium isolierten Grundwasserorganismen...	43
Tabelle 5: Phylogenetische Zuordnung der auf LB-Medium isolierten Oberflächenwasserorganismen.....	43
Tabelle 6: Wirkung von Cyprodinil und Bromoxynil-octanoat auf Summenparameter für mikrobielle Stoffumsetzungen bei <i>Pseudomonas putida</i>	46
Tabelle 7: Effekt Konzentrationen (EC ₅₀ -Werte) von Cyprodinil auf Summenparameter für mikrobielle Stoffumsetzungen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften aus Grund- und Oberflächenwasser.....	47
Tabelle 8: Effekt Konzentrationen (EC ₅₀ -Werte) von Bromoxynil-octanoat auf Summenparameter für Stoffumsetzungen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften aus Grund- und Oberflächenwasser.....	48
Tabelle 9: LC50-Werte von Cyprodinil gegenüber Krebsen aus Grundwasser und Oberflächengewässern.....	55
Tabelle 10: LC50-Werte von lambda-Cyhalothrin gegenüber Arthropoden aus Grundwasser (Daten im Rahmen des Vorhabens erhoben) und Oberflächengewässern (Maund et al. 1998).....	58
Tabelle 11: LC50-Werte von Bromoxynil-Octanoat gegenüber Crustaceen aus Grundwasser (Daten im Rahmen des Vorhabens erhoben) und Oberflächengewässern.....	69
Tabelle 12: Vor- und Nachteile der Prüfung von Grundwasserorganismen in ökotoxikologischen Tests.....	78
Abbildung 1: RFLP-Analyse der Mikroorganismen des beprobten Grund- und Oberflächenwassers.....	41
Abbildung 2: Phylogenetische Einordnung von Umweltklonen und Isolaten des unbelasteten Grundwassers.....	44
Abbildung 3: Phylogenetische Einordnung von Umweltklonen und Isolaten des unbelasteten Oberflächenwassers.....	45
Abbildung 4: RFLP-Analyse der Mikroorganismen im <u>Grundwasser</u> während 3-wöchiger Inkubation mit Cyprodinil (17 mg/L nominal).....	47
Abbildung 5: RFLP-Analyse der Mikroorganismen im <u>Oberflächenwasser</u> während 3-wöchiger Inkubation mit Cyprodinil (17 mg/L nominal).....	48
Abbildung 6: Typischer Verlauf der Bromoxynil-Octanoat Konzentrationen während eines Inkubationsversuches.....	49
Abbildung 7: T-RFLP Fragment-Muster nach MSPI Verdau von 4 unabhängigen Aufarbeitungen einer Gewässerprobe.....	51
Abbildung 8: T-RFLP Fragment-Muster nach HAE III Verdau von Grundwasserproben (GW) nach 7tägiger Inkubation mit 80 µg/L Bromoxynil-Octanoat (Buctril).....	52
Abbildung 9: T-RFLP Fragment-Muster nach HAE III Verdau von Grundwasserproben (GW) nach 14-tägiger Inkubation mit 40 bzw. 80 µg/L Bromoxynil-Octanoat (Buctril).....	53
Abbildung 10: T-RFLP Fragment-Muster nach RSA I Verdau von Grundwasserproben (GW) nach 14-tägiger Inkubation mit 80 µg/L Bromoxynil-Octanoat (Buctril).....	54
Abbildung 11: Effektkonzentrationen von Cyprodinil gegenüber <i>Niphargus fontanus</i>	56
Abbildung 12: Effektkonzentrationen von Cyprodinil gegenüber <i>Chappuisius inopinus</i>	56
Abbildung 13: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber <i>Niphargus fontanus</i> (Amphipoda).....	59

Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber <i>Niphargus fontanus</i> (Amphipoda) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 27 Tagen ...	59
Abbildung 15: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber <i>Antrobathynella stammeri</i> (Syncarida).....	60
Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber <i>Antrobathynella stammeri</i> (Syncarida) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 20 Tagen.	60
Abbildung 17: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber <i>Chappuisius inopinus</i> (Copepoda).	62
Abbildung 18: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber <i>Chappuisius inopinus</i> (Copepoda) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 17 Tagen	62
Abbildung 19: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber Copepoditen von <i>Phyllognathopus vigueri</i> (Copepoda).....	63
Abbildung 20: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber Copepoditen von <i>Phyllognathopus vigueri</i> (Copepoda) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 20 Tagen	63
Abbildung 21: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber <i>Pseudocandona zschokkei</i> (Ostracoda)	64
Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber <i>Pseudocandona zschokkei</i> (Ostracoda) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 21 Tagen.	64
Abbildung 23: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber <i>Lobohalacarus weberi</i> (Acari).....	65
Abbildung 24: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber <i>Lobohalacarus weberi</i> (Acari) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 28 Tagen.....	65
Abbildung 25: Empfindlichkeitsverteilung miteinander verglichener Taxa in Grund- und Oberflächenwasser nach Solomon et al. (1996).	67
Abbildung 26: Empfindlichkeitsverteilung miteinander verglichener Taxa in Grund- und Oberflächenwasser nach Aldenberg und Slob (1993).	67
Abbildung 27: Effektkonzentrationen von Bromoxynil-Octanoat gegenüber <i>Antrobathynella stammeri</i> (Syncarida) im Vergleich zu <i>Mysidopsis bahia</i>	69
Abbildung 28: Vergleich akuter Toxizitäten für Organismen aus Oberflächengewässern mit Toxizitäten für Grundwasserorganismen nach gleich langer (li) und verlängerter (re) Exposition. Gestrichelt: Faktor 2.....	74
Abbildung 29: Vergleich akuter Toxizitäten eines unpolaren Narkotikums für Organismen aus Oberflächengewässern mit denen für Grundwasserorganismen. Gestrichelt: ± 20 %.....	75
Abbildung 30: Vergleich der LC50-Werte von Metallen und Pflanzenschutzmitteln gegenüber Organismen aus Grundwasser und Oberflächengewässern (zumeist Standardtests).....	76

Ökotoxikologische Prüfung von Pflanzenschutzmitteln hinsichtlich ihres Potentials zur Grundwassergefährdung

1 Einleitung

Grundwasser ist als absolutes Schutzgut in seiner Gesamtheit der Gesundheit von Mensch und Tier gleichgestellt (§15 Abs. 1 Nr. 3a des Pflanzenschutzgesetzes (PflSchG) - entspr. Art. 4 Abs. 1b (iv) der Richtlinie 91/414/EWG). Als schädliche Auswirkungen auf das Grundwasser sind somit solche Verunreinigungen anzusehen, die das Grundwasser als wichtigste Grundlage für die Trinkwasserversorgung unbrauchbar machen, aber eben auch diejenigen, die seine zentrale Bedeutung für sämtliche Lebensvorgänge in der Umwelt beeinträchtigen (VG Braunschweig, 6A 6009/90 und 6A 61195/90 vom 12.12.1990, S.18 ff).

Die bisherigen diesbezüglichen Vorschriften (Zulassungskriterien des Anhangs VI der EG-Richtlinie 91/414/EWG, Einheitliche Grundsätze) sind ausschließlich auf die menschliche Gesundheit bezogen. Im Rahmen der Vorsorge gegenüber möglicherweise eintretende Schäden der Umwelt kommt dem Grundwasser jedoch auch in seiner zentralen Funktion für den Wasserhaushalt und für die Lebensgemeinschaften der Ökosysteme im Grundwasserleiter und vom Grundwasser abhängiger Ökosysteme eine umfassende Schutznotwendigkeit zu. Ökosysteme im Grundwasserleiter und besonders deren Beeinträchtigung durch Pflanzenschutzmittel sind allerdings bisher erst wenig erforscht.

So beschränken sich Untersuchungen der Toxizität von Pflanzenschutzmitteln auf Mikroorganismen auf solche, die unter nahrungsreichen, landwirtschaftlichen Verhältnissen vorkommen. Informationen über Effekte von Pflanzenschutzmitteln auf Mikroorganismen in oligotrophen Ökosystemen, wie das Grundwasser, sind praktisch nicht vorhanden. Keine der äußerst seltenen wissenschaftlichen Untersuchungen über die Empfindlichkeit von mehrzelligen Grundwasserorganismen gegenüber Pflanzenschutzmitteln bezieht chronische Toxizitäten mit ein. So wird derzeit davon ausgegangen, dass Wirkungsdaten für Standardtestorganismen aus Oberflächengewässern hinreichend repräsentativ für die Empfindlichkeit von Grundwasser-Lebensgemeinschaften sind, basierend auf der generellen Annahme, dass keine fundamentalen Unterschiede zwischen den physiologischen, toxikologischen und ökologischen Prinzipien bestehen, die für Organismen in Oberflächengewässern und im Grundwasser gelten. Eine empirische und daher belastbare Nachweisführung steht hierfür jedoch noch aus, was eine deutliche Bewertungsunsicherheit bezüglich der Grundwasserorganismen begründet.

Zweck des Vorhabens ist es, einen wesentlichen Beitrag zur Minimierung dieser Unsicherheit zu leisten, schädliche Auswirkungen auf das Grundwasser infolge des fachgerechten Einsatzes der Pflanzenschutzmittel auszuschließen. Dazu ist eine intensive Beschäftigung mit der Ökologie der Grundwasser-Lebensgemeinschaft notwendig.

1.1 Kurzer Abriss der geschichtlichen Entwicklung der Grundwasserökologie (Edgar Egert)

Die Beschäftigung mit Tieren aus unterirdischen Gewässern, wie sie in marinen Sanden oder dem Lebensraum Grundwasser (Stygon) zahlreich gefunden werden können, wurde befruchtet aus verschiedenen Wissensgebieten, wie der Biospeleologie (Erforschung der Lebewesen in Höhlen) oder der Limnologie (Seenkunde). Als Einführung in das Thema wird hier ein kurzer historischer Überblick gegeben.

Die Erforschung von Organismen aus marinen und Süßwassersedimenten beginnt schon seit dem mittleren 19. Jahrhundert. Zu dieser Zeit sind taxonomische Beschreibungen subterranean benthischer Organismen veröffentlicht worden. Dujardin entdeckte die marin-benthischen Kinoryncha 1851 (zitiert bei Giere 1993). Schiödte beschrieb den subterranean Amphipoden *Niphargus stygius* aus der Adelsberger Grotte 1849 und *Niphargus aquilex* 1855 aus England (zitiert bei Schellenberg 1932 c). Bate beschrieb 1859 die beiden Arten *Niphargus fontanus* und *Niphargus kochianus* aus einem Brunnen in Ringwood in England (zitiert bei Schellenberg 1932 c). Diese frühen Autoren untersuchten die Vertreter verschiedener Taxa in phylogenetischer Beziehung zu ihren Oberflächenverwandten. Weiterführende Untersuchungen zu ökologischen Fragen oder physiologischen Anpassungen, gar zur Populationsökologie, waren zu dieser Zeit noch nicht Gegenstand der Forschung. Der Bestandsaufnahme der Tierwelt im Sinne der Erweiterung von naturkundlichen Sammlungen gebührte der Vorrang.

Seit dieser frühen Zeit veränderte sich der Forschungsansatz in Deutschland mit den Arbeiten Thienemanns und später Remanes. Thienemann wandte sich einer Gesamtbetrachtung der subterranean Lebensgemeinschaft zu; ein Ansatz den wir heute in die Populationsökologie einordnen würden. In „Die Binnengewässer Mitteleuropas, Band 1 1925“ schreibt er auf S. 25: „Unter Grundwasser verstehen wir alles in der äußersten Erdrinde zirkulierende, unter der Erdoberfläche befindliche WasserEs erfüllt Klüfte und Spalten der Gesteine, größere und kleinere Höhlungen der Felsen aber auch alle lockeren und losen Ablagerungen und kann auch in ihnen gewaltige zusammenhängende Wassermassen ... bilden“. (zitiert bei Botosaneanu 1986).

Remane verdanken wir die Monographie „Verteilung und Organisation der benthonischen Mikrofauna der Kieler Bucht“ (1933). In dieser Schrift prägte der Autor den Begriff „Sandlückenfauna“ und beschrieb die Ansammlung der vorgefundenen Arten nicht als bloße Aggregation, sondern darüber hinaus als Biozönose. So werden Artengemeinschaften verstanden, deren Tiere nicht nur in Anzahl und Anwesenheit wesentlich in Erscheinung treten, sondern die als Lebensgemeinschaft in Form und Funktion ein höheres Ganzes bilden. Remanes Anregung zur Erforschung dieser Fauna folgten damals nicht nur deutsche, sondern auch zahlreiche internationale Wissenschaftler. 1952 prägte Remane den Begriff „Lebensformtypus“. Mit diesem Begriff wird die Vorstellung von Organismen als synökologischen Funktionseinheiten repräsentiert.

In Großbritannien prägte Mare 1942 (zitiert bei Giere 1993) den Ausdruck „Meiofauna“ um die Ansammlungen kleiner haptosessiler und mobiler Tiere aus marinen benthischen Sedimenten von der Makrofauna, also größeren Tieren, zu unterscheiden. Heute ist der Begriff auch für Grundwasserorganismen des Süßwassers gebräuchlich. Die von vielen Forschern vorher verwendete Bezeichnung Mikrofauna ist heute vorrangig für einzellige Protozoen vorgesehen. Meiofauna wird demnach nach oben durch Siebe der Maschenweite 500µm (1000µm) begrenzt, nach unten durch Netze der Weite 42µm. Selbstverständlich sind diese Werte bei faunistischen Untersuchungen nicht bindend, wenn einmal interessante mehrzellige Organismen sich als etwas kleiner herausstellen sollten, wie es bei einigen Rotatorien oder Nematoden der Fall ist. Das selbe gilt vice versa für größere Bewohner des Grundwassers, wie z.B. Amphipoden oder Isopoden.

Heutzutage ist der Kenntnisstand von der Artenvielfalt der hypogäischen Meiofauna schon sehr weit fortgeschritten. Das Grundwasser erweist sich als sehr artenreich. Bereits 1978 führt Illies 1.013 bekannte Spezies in der „Limnofauna Europeaea“ auf, in Oberflächengewässern beträgt der Artenbestand 3.105 Spezies. Da noch nicht im entferntesten alle Grundwässer faunenmäßig erfasst sind, dürfte noch eine wesentlich höhere Artenzahl erwartet werden können, zumal sich der Lebensraum Grundwasser als wesentlich vielgestaltiger erwiesen hat, als bisher angenommen wurde (Hahn et al. 1999).

In Deutschland verdient der Lebensraum Grundwasser besondere Aufmerksamkeit, weil er sich als über lange Zeiträume besonders bewahrend für die taxonomische Ordnung der Syncarida erwiesen hat. Syncarida sind aus dem Karbon in vielen Fossilien erhalten und haben zu jener Zeit epigäische Salz- und Süßgewässer bewohnt. Durch Konkurrenz aus ihren ursprünglichen Biotopen verdrängt, haben sie die Veränderungen der oberen Welt im Grundwasser überdauert (Schminke 1986, 1996). Eine weitere Besonderheit, die aus marinen Gewässern vor langer Zeit ins Grundwasser eingewandert ist, ist *Troglochaetus beranecki*. Hierbei handelt es sich um den einzigen Süßwasserpolychaeten, der in Deutschland im Grundwasser gefunden werden kann (Husmann 1956, Westheide 1996).

Heute wird ökologischen und physiologischen Fragen neben der Bestandserfassung mehr Aufmerksamkeit gewidmet. Es wurden u.a. Aquifere in Frankreich (Rhône; Dole-Olivier et al. 1994), U.S.A. (Flathead; Stanford et al. 1994; Ward et al. 1994), Österreich (Donau; Danielopol 1989) über längere Zeiträume untersucht. Die Ergebnisse dieser Forschungen beziehen sich auf verschiedene Felder, wie biotischer Austausch und Genfluss, Populationsdynamik, Wassergeochemie oder mikrobielle Ökologie, sowie spezielle physiologische Anpassungen der Grundwassertiere, wie ihr Verhalten bei unterschiedlichem Sauerstoffangeboten (Ginet 1960; Malard & Hervant 1999, Rumm 2000).

1.2 Der Lebensraum Grundwasser und die Adaptation seiner Bewohner (Edgar Egert)

Welches sind die morphologischen, physiologischen und ökologischen Charakteristika der Grundwassertiere, die sie von den Bewohnern der Oberflächengewässer unterscheiden?

Und lassen sich diese womöglich auf den besonderem Lebensraum in den Wasser gefüllten Hohlräumen des Interstitials zurückführen? Im folgenden werden die besonderen Merkmale des Lebensraums Grundwasser und die Anpassungen der Grundwasserfauna (Stygofauna) beschrieben. Schließlich wird auf die ökologischen Rolle der Stygofauna und auf die von den Grundwassersystemen abhängigen Lebensräume wie Moore, Quellen und Fließgewässer eingegangen.

1.2.1 Die Bedeutung der geologischen und physikalischen Faktoren für den Lebensraum Grundwasser

Weltweit sind etwa 2,7% des vorhandenen Wassers Süßwasser. Etwas mehr als 2% oder knapp 30 Millionen Kubikkilometer sind im Eis der Pole und Gletscher gefroren. Etwa 0,6% oder 8,5 Millionen Kubikkilometer sind Grundwasser, weniger als 0,02% oder 230000 Kubikkilometer sind Oberflächenwasser (Klee 1991). Grundwasser stellt damit ein riesiges unterirdisches Wasservorkommen dar, das weit mehr Wasser enthält, als unsere gesamten Flüsse und Seen zusammen.

Der Aufbau der Erdrinde mit ihren Gesteinen ist einem ständigen Auf- und Abbau unterworfen. Seit der Entstehung des Lebens traten neben die geologischen auch biologische Prozesse. Die Erosion und andere aktive Kräfte sorgten schon früh für eine Durchlöcherung des Substrats, so dass Wasser in Lückensysteme eindringen konnte. In Windischeschenbach in der Oberfalz konnte in einem geologischen Forschungsprojekt in 9101 Meter Tiefe solch altes Grundwasser nachgewiesen werden (Gierig 2001). Durch derartige Tiefenbohrungen ist auch nachgewiesen worden, dass Grundwasser hemmende und Grundwasser leitende Schichten einander ablösen. So entstehen verschiedene Grundwasserstockwerke übereinander. Ob Leben in tiefen Grundwässern existiert, ist in erster Linie von der Sauerstoffversorgung abhängig, wenn man einmal von anoxischen Mikroorganismen absieht. In Spanien wurde ein lebender Rotator noch in 900 Metern Tiefe vorgefunden (mündl. Mitt. Martinez Arbizu). In größeren Tiefen wird die Erdwärme der Biologie eine Grenze setzen. Die Abwesenheit von Licht, die fehlende Primärproduktion, wenn man einmal von der Möglichkeit zur Energieversorgung chemoautotropher Bakterien absieht, und geringe Temperaturschwankungen, die sich im regionalen Jahresmittel bewegen und in größerer Entfernung von der Oberfläche immer gleichförmiger bleiben, sind weitere wichtige Merkmale. Dazu kommt die Begrenzung des Lückensystems selbst, was die Fließgeschwindigkeit des Grundwassers einschränkt und auch einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Biozönose hat. Je nach geologischer Situation finden wir Lückenräume, die enger oder weiter sind.

Die geologische Gestaltung der Grundwassersysteme wird in die drei folgenden Kategorien eingeteilt:

1. Porengrundwasserleiter mit geringen Fließgeschwindigkeiten (wenige Zentimeter pro Tag) in sandig kiesigen Substraten,

2. Kluftgrundwasserleiter mit größeren Lückenräume für Grundwasserfauna und höheren Fließgeschwindigkeiten (Zentimeter bis Meter pro Tag), z.B. in durch Erosion zerklüfteten granitischen Gesteinen,
3. Karstgrundwasserleiter mit Fließgeschwindigkeiten, die denen von Flüssen vergleichbar sind (ein bis mehrere Meter pro Tag) in stark zerklüfteten Gesteinen, wie in Kreidefelsen.

Der Vorstellung, dass der räumliche Platzbedarf die faunistische Gemeinschaft in der Weise reguliert, dass in den Karstgrundwasserleitern die größten Grundwasserorganismen zu finden sind und in den Porengrundwasserleitern die kleinsten, trifft zu. Als besonders bekannter Repräsentant für weite Lückenräume kann der Grottenolm *Proteus aguinus* gelten, der im jugoslawischen Karst lebt. Für die kleinräumigen Sande der norddeutschen Tiefebene sind winzige Harpacticoidaarten wie *Canthocamptus staphylinus minutus* mit 0,69-0,71 mm Körperlänge repräsentativ.

Bei aller Gleichförmigkeit der Bedingungen wie ewige Dunkelheit und relative Temperaturkonstanz bestehen neben Unterschieden in der Fließgeschwindigkeit weitere zum Teil kleinräumig vorhandene Differenzierungen bezüglich abiotischer Faktoren, gerade in Porengrundwässern. Diese führen zu einer vielgestaltigen und in ihren ökologischen Ansprüchen unterschiedlichen Fauna. So zeigen Untersuchungen des Sauerstoffgehalts in einem Aquifer aus Sand und Kies anoxische, suboxische ($< 0,3 \text{ mg/l O}_2$) und oxische ($> 3 \text{ mg/l O}_2$) Zonen, die teilweise im Zentimeterbereich von einander getrennt liegen (Malard & Hervant 1999) und außerdem im Redoxpotential, pH-Wert, Partialdruck, Konzentrationsgradienten und Adsorptionsgradienten noch zusätzlich variieren. So entstehen Mikrohabitate, in denen vom Bakterium bis zum größten Makroinvertebrat, das noch Platz findet, für jedes die geeigneten Ansprüche erfüllt werden (Husmann 1988).

Die Adaptation der Organismen an das Leben im Untergrund folgt zahlreichen Strategien und Mustern entsprechend der geologischen und physikalischen Heterogenität. Thienemann (1925) schlug die Einordnung der im unterirdischen Süßwasser lebenden Fauna mit dem Sinnbild des griechischen Flusses Styx vor, der die Unterwelt von der Oberwelt trennt und nur vom Fährmann Charon überquert werden kann. Seitdem gibt es die Bezeichnungen stygophil, stygobiont und stygoxen.

- Stygoxen meint alle epigäischen Organismen, die nur zufällig im Grundwasser angetroffen werden. Ihren eigentlichen Lebensbereich haben sie verlassen und sind nicht in der Lage im Grundwasser den eigenen Lebenszyklus zu vollenden.
- Mit stygophil werden alle Organismen bezeichnet, die einen Teil ihres Lebenszyklus im Grundwasser vollziehen können, entweder Teile des Larvenstadiums oder den gesamten juvenilen Lebensabschnitt. Unter diesen Begriff werden auch diejenigen Tiere gezählt, die als Adulte komplett im Grundwasser überleben können, die aber ebenso häufig in Oberflächengewässern angetroffen werden. Die Stygophilie beschreibt somit das breiteste Spektrum an Möglichkeiten, unter denen Organismen im Stygal angetroffen werden können.

- Echte Grundwasserorganismen werden stygobiont genannt und vollziehen ihren gesamten Lebenszyklus im Subterran. Einige Autoren zählen hierzu heute auch die Höhlenbewohner, die Racovitza noch als Troglobionte bezeichnete (Camacho 1992).

1.2.2 *Anpassung von Grundwasserorganismen*

Bei Betrachtung der Grundwasserorganismen unter dem Binokular fallen zunächst die morphologischen Merkmale auf, die um Wesensmerkmale bei der Beobachtung der lebenden Tiere ergänzt werden können. Die Anpassungen lassen sich durch die besonderen physikalischen Bedingungen des Lebensraumes Grundwasser erklären: Die Abwesenheit von Licht bedingt die typische Pigmentlosigkeit der Grundwassertiere. Diese sind selbst bei Beleuchtung nicht in der Lage Pigmente zu bilden, ganz im Gegensatz zu eigentlich epigäischen Spezies, z.B. Fischen oder Krebsen, von denen Populationen auch in unterirdischen Gewässern angetroffen werden und die unter Licht die ihrer Art entsprechende Körperfarbe regenerieren (*Gammarus minus*, Kane et al. 1994). Grundwassertiere sind daher stets milchig und durchsichtig. Auffällig ist ebenfalls die Rückbildung der Augen (Microphthalmie, Anophthalmie) und die besondere Entwicklung alternativer sensorischer Organe: Die z.T. zahlreichen Körperanhänge tendieren oft zu enormer Länge und sind mit chemischen und mechanischen Rezeptoren besetzt (Gibert et al. 1994). Einige Verhaltensweisen sind mit diesen besonderen Organen korreliert. Hierzu gehört das Vermeiden von Beleuchtung (Hautlichtsinn, negative Phototaxis), das Verbergen unter Substrat (Thigmotaxis) und der besonders fein entwickelte chemische Sinn für Nahrungspartikel (Ästhetasken an den ersten Antennen der Crustacea). Eigene Beobachtungen an *Niphargus fontanus* zeigen, dass sich die Tiere auch in einem größeren Gefäß schnell um einen Brocken Fleisch versammeln, den sie ja optisch nicht wahrnehmen können.

Im Vergleich mit Oberflächenverwandten sind die Körperformen oft verlängert, wurmförmig (vermiform) oder gedrunken kompakt. Andere sind wieder klein genug, um in den Lückenräumen genügend Platz zum Schwimmen zu finden. Viele Autoren berichten von einer generellen Übereinstimmung der Körperformen für ganz verschiedene Taxa („Lebensformtyp“ Remane 1952, Botosaneanu 1986, Husmann 1988). Vermiforme Körper finden sich bei Vertretern der Annelida, Planaria oder Crustacea. Gedrunken kräftige Körper finden sich speziell bei den Amphipoden und Ostracoden, die damit kräftig genug sind, sich durch feineres Sediment hindurchzuwühlen. Nematoden, Rotatorien und Cyclopoiden sind besonders klein und fangen entweder schwimmend (letztere) oder fest geheftet ans Substrat (Rotatorien und Nematoden besitzen Klebdrüsen am Schwanzende) Nahrungspartikel aus dem vorüberfließenden Wasser.

Als Anpassung an ihren Lebensraum sind bei Grundwassertieren besondere Fähigkeiten entwickelt, um bei geringen Sauerstoffkonzentration zu überleben (<3 mg/l). Es zeigte sich, daß *Proasellus slavus* bei sehr niedrigen Sauerstoffkonzentrationen (0,1 mg/l) den ohnehin schon hohen Pleopodenschlag (die Pleopoden am hinteren Körper befördern frisches Wasser in Richtung der Kiemen am mittleren Körperabschnitt, dem Mesosom) noch steigert und dabei eine

charakteristische aufwärts gebogene Körperhaltung einnimmt. Danielopol et al.(1994) vermuten, dass durch die Streckung eine größere Körperoberfläche erreicht wird, was die Sauerstoffaufnahme optimiert. Die Wanderaktivität nach geeigneter Nahrung wurde bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen ganz eingestellt. Malard & Hervant (1999) konnten nachweisen, dass Grundwasserkrebse sehr viel resistenter gegen niedrige Sauerstoffkonzentrationen sind als Oberflächenarten. Konzentrationen von 0,01 mg/l gelöstem Sauerstoff erzeugten aber auch bei ihnen eine Letalität für 50 % der Population in 46,7 bis 61,7 Stunden. Für keine der untersuchten Arten konnten Stoffwechselwege mit hohem ATP-Verbrauch festgestellt werden. Niedrigen Sauerstoffraten wird durch eine Kombination dreier verschiedener Mechanismen begegnet: Einlagerung einer hohen Reservemenge an Nährstoffdepots (Glykogen und Phosphagen), eine niedrige Stoffwechselrate unter normaler Sauerstoffkonzentration, eine weitere Erniedrigung der metabolischen Rate durch Bewegungsreduktion und Reduktion der Atmungsbewegungen (Pleopodenschlag). Eine weitere physiologische Anpassung an die typischen reduzierten Sauerstoffraten in subterranean Sedimenten ist die besonders hohe Erholungsrate nach langer suboxischer Situation (Reservenanlage durch Glykogenbildung). So ist zu erklären, dass auch in temporär sauerstofffreien Grundwässern Tiere angetroffen werden können.

Die knappe Nährstoffversorgung schlägt sich z.B. in der enormen Hungerfähigkeit des Amphipoden *Niphargus fontanus* nieder: Rumm (2000) testete 30 Tiere unter standardisierten Bedingungen. Nur 50% der Tiere starben bis zum 115 Tag. Das letzte Tier starb am 202 Tag.

Die Anpassung an vergleichsweise konstante Temperaturen um 10 °C und Nahrungsmangel hat dazu geführt, dass verschiedene Lebensprozesse verlängert sein können. So wurde nachgewiesen, dass einige Grundwassertiere im Vergleich zu verwandten epigäischen Tieren sehr alt werden. *Parastenocaris vicesima*, ein harpacticoider Copepode aus Sandstränden der Flüsse, die in die Nord- oder Ostsee fließen, wurde bei Temperaturen um 10°C im Labor gehalten und erreichte ein Lebensalter von mindestens 3 ½ Jahren (Schminke 1982). *Canthocamptus staphylinus*, ebenfalls ein harpacticoider Copepode, der epigäisch in allen kleinen Binnengewässern Deutschlands vorkommt, erreicht ein Alter von 10 – 15 Monaten (Smyly 1958, zitiert bei Janetzky et al. 1996). Während der Ontogenese können ein oder mehrere Larvenstadien, aber auch das fortpflanzungsfähige Adultstadium verlängert sein.

Als Antwort auf die begrenzte Ressourcenkapazität im Habitat folgt die Populationsentwicklung oft der sogenannten A-Strategie, wie sie Greenslade 1983 als Sonderform der K-Strategie abgeleitet hat. Merkmale hierfür sind lange Lebensdauer, späte Reproduktionsphase, lange Entwicklungsdauer und niedrige Reproduktions- und Wachstumsrate. Die Reproduktionsstrategie ist teilweise den wechselnden Umweltbedingungen angepasst; so kann bei einigen Populationen in guten Nährstoffsituationen K-Strategie ausgeprägt sein. Wenn sich die Situation verschlechtert, etwa bei erniedrigter Niederschlagsmenge mit abnehmender Nährstoffzufuhr, können einige Populationen auf eine r-Strategie wechseln (höhere Fruchtbarkeit ähnlich wie bei epigäischen Populationen, höhere Wachstumsraten, größere Populationsdichten). Diese Variabilität in der Reaktion auf die Umweltsituation drückt sich in einer teilweisen Überlappung der drei Strategien r, K und A aus (zitiert bei Gibert et al. 1994).

Nach Husmann (1988) ist das Grundwasser ein hochkompartimentierter Lebensraum, der eine Vielzahl verschiedener Habitate beinhaltet, die von jeweils speziellen Lebensgemeinschaft besiedelt werden. Temperatur, pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit oder Redoxpotential variieren nur in engen Grenzen und bewegen sich im Bereich des Jahresmittels. Die Gestaltung der Habitate ist durch die strukturelle und chemische Zusammensetzung der Gesteine bestimmt. Husmann: „Die Zusammensetzung der Organismengesellschaft (Biozönose) in einem Habitat ist Folge der Milieubedingungen, die jedoch ihrerseits durch die ablaufenden biochemischen Prozesse ständig geändert werden können. Durch die sich ändernden Lebensbedingungen können Sukzessionen bestimmter Organismen auftreten, die an die jeweiligen Milieubedingungen angepasst sind“. Nach dieser Auffassung verhalten sich die Grundwasserorganismen passiv und bewegen sich nur in engen Grenzen. Sie sind daher nur bedingt in der Lage, sich auf verändernde Lebensbedingungen einzustellen oder bei einem Schadstoffeintrag womöglich auszuweichen.

Danielopol et al. (1994) platzierte wiederholt eine Kamera im Donauaquifer nahe Wien (Eberschüttwasser) und beobachteten die Aktivitäten der Biozönose. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigte im Gegensatz zu Husmanns Auffassung eine hochaktive dynamische Fauna. So waren Isopoden der Art *Proasellus slavus* durchaus in der Lage den wesentlich größeren carnivoren Niphargusarten auszuweichen und engräumigere Lücken aufzusuchen. Ihre Tagesaktivität zeigte eine hohen Frequenz im beständigen Umherwandern zur Ausnutzung aller Nahrungsangebote auch über größere Strecken.

Culver (1994) berichtet, dass bisher keine Untersuchungen zu den Nahrungsnetzen in Ökosystemen des Grundwassers vorliegen. Der Vergleich mit Daten aus vom Grundwasser abhängigen Gewässern, wie Quellen und Höhlengewässern, zeigt, dass die Zahl der trophischen Ebenen niedrig ist, die Zahl der einzelnen Interaktionen verschiedener Arten höher und Omnivorität vorliegt. Konkurrenz und Kommensalismus sind ebenfalls nachgewiesen. Kommensalismus ist besonders erleichtert durch „sloopy feeding“, wie Rumm (2000) für *Niphargus fontanus* aufgezeigt hat. Demnach fungiert der Amphipode als Zerkleinerer und bewirkt durch die Fress- und Bewegungsaktivität eine Umschichtung des Substrats (Bioturbation). Für die Metabolisierung der organischen Nahrung im Gesamtsystem spielt *Niphargus fontanus* nur eine untergeordnete Rolle, seine Assimilationsrate ist zu gering. Der hohe Grunddurchsatz fördert jedoch die anwesende Mikrofauna. Es werden täglich 4-5 Kotballen produziert, die unter ihrer peritrophischen Membran schon reich mit Mikroorganismen bewachsen sind.

Die vergleichsweise hohe Konstanz ihrer Umwelt erlaubte den Grundwasserspezies seit geologisch langen und sehr langen Zeiträumen zu bestehen. Sie sind ausgesprochene K-Strategen und in ihrem Lebensraum äußerst konkurrenzfähig. Die neueren Untersuchungen zeigen jedoch auch, dass entgegen früherer Auffassung der Grundwasserlebensraum durchaus differenzierte Umwelteigenschaften aufweist. So sind Arten, die in unterschiedlichen Grundwässern weiter verbreitet sind, als euryök zu bezeichnen; Spezies mit empfindlichen Reaktionen auf den Wechsel biotischer und abiotischer Faktoren sind als stenök einzuordnen.

1.2.3 Grundwassertiere und Trinkwassergewinnung

Drei Viertel des Trinkwassers entstammen in Deutschland dem Grundwasser. Grundwasserlebewesen gestalten die Lückenräume mit und halten sie offen (Bioturbation). Die Abundanz von Bakterien fressenden Grundwasserorganismen übt Fraßdruck auf die Mikroorganismen aus und hält diese in ständigem exponentiellem Wachstum. Dadurch werden die Abbauleistung organischer Frachten aus dem nachströmenden Neubildungswasser erhöht (Schminke 1997, Schminke et al. 1998).

Der Ausbau von wassertechnischen Anlagen mit Regulierung von Bächen und Flüssen in früheren Jahren war nicht immer von gutem Einfluss auf die Grundwasseraquifere und die von ihnen abhängigen Biotope. Tieferes Grundwasser ist davon weniger betroffen worden als Grundwasser in höheren Schichten mit einem geringen Flurabstand. Allgemein gilt, dass eine Senkung des Grundwasserspiegels für nachgeschaltete abhängige Biotope schädlich ist. Hierzu zählen Flachmoore, Bachgewässer, oder Flusstalauen mit ihren zugehörigen wasserdurchflossenen Sedimenten (Hyporheion). Zahlreiche empfindliche Arten der Oberflächengewässer sind durch eine Schädigung des Grundwassers ebenfalls betroffen. Bleiben Überstauungen durch das Grundwasser aus und ist der Boden nicht mehr mit Wasser gesättigt, wird in der Folge organisches Bodenmaterial mineralisiert. Die Bodenoberfläche sackt ab und der Untergrund verdichtet sich. Die Folge ist eine stetige Verringerung des Wasservolumens, welche irreparabel ist. Die Erhaltung gesunder Grundwasseraquifere wird gefördert durch eine nachhaltige Wasserwirtschaft, die Entnahmen nur in der Menge der Neubildungsrate vornimmt, und eine rücksichtsvolle und vernünftige Wasserbaupolitik.

1.3 Ökosystemeigenschaften

Der Schutz von Ökosystemen umfasst deren Strukturen und Funktionen. Beide Aspekte stehen in Wechselwirkung: Funktionen können nur innerhalb bestimmter Grenzen von Umweltbedingungen aufrecht erhalten werden, in denen ökosystemare Selbstregulation möglich ist. Die Ausprägung dieser Selbstregulation wird durch die Struktur der Lebensgemeinschaften mitbestimmt. Gleichzeitig ist die mit der Struktur gegebene Biodiversität die Voraussetzung für die Elastizität und Wiedererholbarkeit und damit selbst als Funktion zu betrachten.

Da in Grundwasserökosystemen wegen der Abwesenheit von Licht die Funktion der (Primär-) Produktion entfällt, ist der Kreislauf von Stoffabbau und Stoffaufbau unterbrochen, und die Bedeutung im Rahmen der Stoffkreisläufe im Vergleich zu anderen Ökosystemen verschoben. Grundwasserökosysteme beziehen ihre Nährstoffe im Wesentlichen aus oberen Bodenhorizonten und Oberflächengewässern. Besonders die Kohlenstoffversorgung ist deshalb der limitierende Faktor bei der Sekundärproduktion der Grundwasserökosysteme. Andererseits ist wegen des gewaltigen Ausmaßes der Grundwasserkörper die quantitative Bedeutung der Systeme bei der

Stoffmineralisation trotz der verringerten Umsatzgeschwindigkeit nicht zu vernachlässigen. Dies gilt insbesondere für den Abbau von anthropogenen Einträgen wie Dünge- und Pflanzenschutzmitteln.

1.4 Fragestellungen und Lösungsansätze des Vorhabens

Bei einem im Wesentlichen abbauenden Ökosystem stehen die prokaryotischen Mikroorganismen im Fokus des Interesses. Die meisten Pflanzenschutzmittel sind jedoch im Hinblick auf ihre Wirksamkeit gegenüber Eukaryoten (Unkräuter, Pilze, Arthropoden) entwickelt und optimiert worden. So bestand die zentrale Aufgabe des Vorhabens darin, die Wirkung von Pflanzenschutzmitteln auf die Strukturen der von Arthropoden dominierten makrozoischen Lebensgemeinschaft zu ermitteln. Wegen der Bedeutung der abbauenden Mikroorganismen wurde jedoch auch diese Ebene einbezogen.

Die etablierte aquatische Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln gründet sich auf eine Wirkungsabschätzung mit Hilfe von Toxizitätstests an für Oberflächengewässer repräsentativen Organismen und eine Expositionsabschätzung mit Hilfe akzeptierter Expositionsszenarien. Die zentrale Frage des Vorhabens bestand darin, ob die bestehende Praxis der aquatischen Risikobewertung ausreichend protektiv auch für die Lebensgemeinschaft des Grundwassers ist, oder ob Modifikationen bis hin zur Einbeziehung neuer Testorganismen oder abweichender Bewertungsstrategien notwendig sind. Zu diesem Zweck wurde die Arbeitshypothese überprüft, dass es abweichende Antwortmuster auf bestimmte Wirktypen von Pflanzenschutzmitteln gibt, die sich mit grundwassertypischen Eigenschaften erklären lassen.

1.4.1 Mikrobiologie (mikrobieller Abbau)

Hinsichtlich der Beeinträchtigung der abbauenden Funktion von Grundwasserökosystemen ergibt sich als wesentliche Frage:

- Werden Stoffwechselleistungen der mikrobiellen Lebensgemeinschaft des Grundwassers durch den Eintrag von Pflanzenschutzmitteln stärker betroffen als die von Oberflächengewässern?

Dies kann direkt durch funktionelle Tests (Enzymaktivitäten) beantwortet werden. Die Ergebnisse sind jedoch von vielen weiteren Parametern wie Wassertemperatur und Nährstoffsituation abhängig. So sollten die möglichen Ergebnisse durch strukturelle Hinweise auf eine Selektion gestützt werden:

- Wird die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft des Grundwassers durch Pflanzenschutzmittel stärker verändert als die von Oberflächengewässern?

Beide Fragestellungen erfordern allerdings die Einbeziehung der Gesamtheit / eines großen Teils der mikrobiellen Lebensgemeinschaft. Dies wurde durch zwei grundsätzliche Schwierigkeiten unmöglich gemacht, von denen von Beginn an feststand, dass sie im Rahmen des Vorhabens nicht überwunden werden konnten:

1. Die Beschaffung eines repräsentativen Querschnitts der Mikroorganismen aus den für Grundwasserökosystemen charakteristischen und möglicherweise spezifischen Biofilmen
2. Die Isolierung und Kultivierung einzelner für Grundwasser typischer Arten

Als Herangehensweise zur Gewinnung erster Hinweise auf eine mögliche grundwasserspezifische Beeinflussung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft durch Pflanzenschutzmittel wurde die Entnahme von Wasserproben mit sofort anschließender Exposition und Testung durch enzymatische und molekularbiologische Methoden gewählt.

1.4.2 Makrobiologie

Hinsichtlich der Beeinträchtigung der spezifischen Struktur makrozoischer Lebensgemeinschaften von Grundwasserökosystemen ergibt sich als wesentliche Frage:

- Ist das Empfindlichkeitsspektrum der akuten Toxizität zu dem von systematisch/physiologisch vergleichbaren Organismen aus Oberflächengewässern ähnlich?

Im Rahmen der Untersuchungen sollten weitere ökotoxikologisch bedeutsame Informationen gewonnen werden:

- Sind die chronischen Toxizitäten (u.U. der frühen Lebensstadien) vergleichbar?
- Sind Hinweise auf populationsdynamische Auswirkungen ableitbar?

Diese Fragestellungen sind nur exemplarisch zu untersuchen. Deshalb wurden Organismen aus verschiedenen Grundwasserkörpern gewonnen, taxonomisch bestimmt und im Hinblick auf ihre Repräsentativität für Grundwasser-Lebensgemeinschaften bewertet. Vertreter der ausgewählten Arten wurden unter grundwassertypischen Bedingungen gehalten und toxikologisch getestet.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Grundwassersysteme beprobt. Um eine möglichst große Repräsentanz für verschiedene Aquifere zu erreichen, wurden drei verschiedene Standorte in Tälern unterschiedlicher Flusssysteme (Weser, Ruhr, Main) ausgesucht, an denen Grundwassertiere in größeren Mengen gefunden werden und die gleichzeitig geologische Unterschiede aufweisen:

- Sandstedt an der Weser liegt in der norddeutschen Tiefebene (Geest und Marsch) und repräsentiert den Lebensraum Hyporheion (uferbegleitendes Grundwasser). Flussbegleitende Sandstrände pleistozänen Ursprungs bilden einen Porengrundwasserleiter mit seiner speziellen Lückenfauna. Als Leitart gilt *Parastenocaris germanica*.
- Bei Echthausen fließt die Ruhr in einem Flusstal, das seine Entstehung der starken Verwitterung des rheinischen Schiefergebirges während der Eiszeiten verdankt. Lehmige Ablagerungen des Holozäns überdecken die älteren Schotter und schaffen so einen geschützten Aquifer, aus dem Grundwasser zur Trinkwasserbereitung entnommen werden kann. Hier ist der Grundwasserleiter heterogen zwischen Poren- und Kluftgrundwasser ausgebildet. Im Langsandsandfilter Becken Nr. 8 des Wasserwerkes Echthausen stehen neun Peilrohre, aus denen geprobt werden kann. Sie erreichen fünf Meter Tiefe, wo das Grundgestein eine wasserundurchlässige Schicht bildet. Dieser künstliche Grundwasserhorizont zeigt eine Vergesellschaftung epi- und hypogäischer Arten. Als Leitarten für die dort vertretene

Grundwasserfauna des rheinischen Schiefergebirges gelten *Niphargus fontanus* und *Phyllognathopus vigueri*.

- Das Wasserwerk Aschaffenburg gewinnt sein Grundwasser aus einer ehemaligen Abbaugrube für Sande und Kiese. Hier wurde das Flusstal des Mains wie an der Ruhr während der letzten Eiszeiten gebildet. Die Gesteinsart, welche an der rechten Flussseite vorherrscht, ist der rote Bundsandstein. An der linken Flussseite finden wir Lockergesteine mit partiell kalkigen Anteilen. Es ist ein Klufgrundwasserleiter ausgebildet. Die Mächtigkeit des Aquifers ragt hier tiefer hinab als an der Ruhr. Die beiden Peilrohre, aus denen die Proben gezogen wurden, sind 11 und 13 Meter tief. Als Leitarten gelten hier *Antrobathynella stammeri*, *Pseudantrobathynella husmanni* und *Chappuisius inopinus*.

Letztendlich wurden die Organismen der zwei deutlich unterschiedlichen Grundwassersysteme mit wasserwirtschaftlichen Entnahmestellen genutzt. Der Standort Sandstedt wurde nicht weiter beprobt, da von den in größeren Abundanzen erhofften Grundwasserkrebse *Parastenocaris germanica* und *P. phyllura* nur 40 Individuen gefunden wurden, ein Anteil von 0,5%. Die Standorte Echthausen und Aschaffenburg waren für die Gewinnung von Stygobionten weitaus ergiebiger. Der Anteil der Stygobionten betrug in Echthausen (Langsamsandfilter der Gelsen-Wasser AG mit Kontakt zu Oberflächenwasser) 27%, in Aschaffenburg (relativ isolierter Grundwasserkörper) 99,5%.

Die trophischen Beziehungen im Grundwasser sind derzeit noch wenig erforscht (Culver 1994). Es wird angenommen, dass der Aufbau subterranean Lebensgemeinschaften anders strukturiert ist als der epigäischer Lebensräume. Wahrscheinlich sind die trophischen Ebenen nicht so klar getrennt. Nährstoffknappheit zwingt die Metazoen zur Omnivorität. Die meisten ernähren sich von Detritus/Bakterien, Saprophagie ist generell zu finden, Carnivorie bei Gelegenheit. Daraus folgt, dass repräsentative Leitarten für diskrete Trophieebenen schwer zu beschreiben sind.

So richtete sich die Auswahl der vorgefundenen Arten nach vorwiegend taxonomischen Repräsentativitätskriterien. So wurde wegen der Wichtigkeit der Crustaceen für alle Substanzvergleiche ein Vertreter der Copepoden (Harpacticoida, zumeist *Chappuisius inopinus*) und der Amphipoden (*Niphargus fontanus*) als Repräsentanten Niederer und Höherer Crustaceen herangezogen, da für die meisten Pflanzenschutzmittel Vergleichsdaten zu *Daphnia sp.* (Niederer Krebs) und *Mysidopsis bahia* bzw. *Gammarus sp.* (Höherer Krebs) aus Oberflächengewässern vorliegen. Vertreter der grundwassertypischen Gruppe der Syncarida (Brunnenkrebse) wurden ebenfalls untersucht, um ein spezifisches Gefährdungspotential auszuschließen. Weitere Arten wurden nur bei der Prüfung der Mittel einbezogen, für die ein entsprechender Vergleichsdatensatz bezüglich Organismen aus Oberflächengewässern zur Verfügung stand.

1.4.3 Auswahl der Pflanzenschutzmittel

Da Langzeitstudien durchgeführt wurden, konnten nur drei Pflanzenschutzmittel geprüft werden. Die Auswahlkriterien wurden von zwei Aspekten bestimmt:

1. Vergleichbarkeit der Toxizität gegenüber vergleichbaren repräsentativen Organismen der Lebensgemeinschaften aus Grund- und Oberflächenwasser
2. Verallgemeinerbarkeit der Ergebnisse auf alle Pflanzenschutzmittel

Deshalb musste sich vor allem der Wirktyp der Mittel möglichst unterscheiden und eine maximale Bandbreite abdecken. Wegen der Bedeutung der Crustaceen für Grundwasserökosysteme wurden nur Mittel mit einer relativ hohen Toxizität gegenüber Crustaceen ausgewählt. Ein weiteres Kriterium war die Verfügbarkeit von Vergleichsdaten bezüglich Organismen von Oberflächengewässern. Die Relevanz für Grundwasserbelastung spielte indes keine Rolle, da diese weniger für die intrinsische Toxizität als vielmehr für die Exposition von Bedeutung ist.

Nach Absprache mit dem Umweltbundesamt fiel die Wahl auf folgende Wirkstoffe:

- Cyprodinil, ein fungizider Wirkstoff (CAS 121552-61-2; log P_{OW} 4,0), welcher über die Inhibition der Methionin-Biosynthese (Angabe des Herstellers) den Aufbaustoffwechsel hemmt
- Lambda-Cyhalothrin, ein insektizider Wirkstoff (Pyrethroid) mit extrem hoher Toxizität gegenüber Höheren Krebsen, welcher über die Beeinträchtigung des axonischen Nervensystems die nervöse Regulation des Organismus hemmt. Dieser Wirkstoff wurde nicht für die Prüfung der Auswirkungen auf die mikrobielle Funktion und Struktur verwendet.
- Bromoxynil-Octanoat, ein herbizider Wirkstoff (CAS 1689-99-2; log P_{OW} 6,1) welcher über seine narkotische Wirkung als Octanoat eine hohe Toxizität gegenüber Crustaceen aufweist, und damit weniger in seiner Eigenschaft als Wirkstoff auf Photosyntheseeigenschaften sondern vielmehr als Repräsentant für allgemeine Chemikalien gewählt wurde. So ergab die Anwendung einer QSAR-Modellrechnung für unpolare Narkotika einen akuten EC50-Wert für *Daphnia magna* von 35 µg/l, was nahezu exakt dem auf gemessenen Konzentrationen bezogenen Versuchswert entspricht. Die anhand des Verteilungskoeffizienten Octanol/Wasser errechnete Toxizität auf Grund unpolar narkotischer Wirkungen beschreibt daher hinreichend genau den vorliegenden Wirktyp gegenüber Crustaceen.

Für alle Prüfungen wurden zur Minimierung von Lösungsproblemen handelsübliche Formulierungen mit nur einem Wirkstoff verwendet (Unix, Karate, Bucril).

1.4.4 Beiträge zu einer Prüf- und Bewertungsstrategie

Die durch das Vorhaben erzielten Ergebnisse sollten der weiteren Entwicklung und Optimierung eines abgestuften Prüf- und Bewertungskonzepts grundwassergängiger Pflanzenschutzmittel dienen. Neben den ungeklärten Fragen der Repräsentativität ergeben sich die Unsicherheit

verstärkende prüfungstechnische Probleme: So erweist sich die ökotoxikologische Testung von Lysimeter-Sickerwässern mit Oberflächengewässer-Organismen im Labor, besonders mit Algen, aufgrund der komplexen Matrix der Gemische häufig als relativ schwierig. Wenn notwendig und möglich sollten Empfehlungen für mögliche Prüfverfahren gegeben werden, die die Spezies, Art und Umfang der Prüfung, sowie die Einbindung der Ergebnisse in ein Bewertungskonzept betreffen.

2 Material und Methoden

2.1 Mikrobiologische Untersuchungen

Folgende Organismen wurden für die Untersuchung herangezogen

- Laborkultur von *Pseudomonas putida* (Herkunft DSM Braunschweig) als Standard-Testorganismus
- Mikroorganismen aus Grundwasserproben
- Mikroorganismen aus Oberflächenwasserproben

2.1.1 Beschaffung und Bereitung der Wasserproben

Die Grundwasserproben wurden auf dem Gelände des Wasserwerkes Giesen in Echthausen, Gemeinde Wischede (Nordrhein-Westfalen), aus einem Grundwasserbrunnen genommen. Die Temperatur des Grundwassers betrug 9,8 °C. Die Grundwasserprobenahmen erfolgten am 19. April 2000 und 30. November 2000. Es wurden zuerst 100 l abgenommen, verworfen und dann jeweils 15 l pro sterile braune Glasflaschen abgefüllt. Diese wurden anschließend kühl und dunkel über Nacht gelagert.

Die Oberflächenwasserprobenahmen erfolgten aus dem Oberlauf der Wenne oberhalb Schmallenberg-Wormbach (Nordrhein-Westfalen), am 3. Mai 2000. Die Wassertemperatur war 14 °C. Die Proben wurden direkt aus dem Bach mit sterilen Glasflaschen entnommen und anschließend kühl und dunkel über Nacht gelagert.

2.1.2 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Zur Charakterisierung der funktionellen mikrobiologischen Kenngrößen wurden Summenparameter für mikrobiologische Stoffumsetzungen herangezogen:

- ◆ *Elektronen-Transport-System (ETS)*: NADH-abhängige Dehydrogenasen des Elektronen-Transport-Systems, das in die energiespeichernde oxidative Phosphorylierung mündet, geben Aufschluss über den grundlegenden Aktivitätszustand der Biomasse und eignen sich für erste orientierende Voruntersuchungen.
- ◆ *Esterase-Aktivität*: Bestimmung der Aktivität der unspezifischen Esterasen mit Fluoresceindiacetat als Summenparameter für die allgemeine heterotrophe Abbauaktivität. Unspezifische Esterasen stellen einen großen Teil der Enzyme, die extrazellulär ausgeschieden werden (Spaltung von Esterbindungen beim Abbau von polymeren Proteinen, Lipiden usw.). In Kombination mit der Aktivitätsbestimmung ETS kann eine Überblick über die mikrobielle Umsatzaktivität in der zu untersuchenden Probe geschaffen werden.
- ◆ *Phosphatase-Aktivität*: Phosphatasen, die zur Gruppe der Esterasen gehören, setzen die im Stoffwechsel häufig vorkommenden Phosphomonoester um. Sie eignen sich als allgemeiner Aktivitätsparameter für den mikrobiellen Stoffwechsel.

2.1.2.1 Inkubation

Laborkultur

Pseudomonas putida wurde in Medium 1 kultiviert (5 g Pepton und 3 g Fleischagar / 1 l Aqua dest.). Die Bakterien wurden 1 Tag in reinem Medium angezogen, anschließend wurden 100 ml der Vorkultur mit 100 ml testsubstanzhaltigem Medium vermischt und bis zu 6 Tagen bei 25 °C unter Schütteln inkubiert. Pro Testkonzentration wurde 3 Parallelen angesetzt. Zum Einstellen der abgestuften Konzentration (5 Stufen) wurden entsprechende Volumina aus acetonischen Stammlösungen der Pflanzenschutzmittel in das Kulturmedium gegeben. Die Konzentrationen der Testsubstanzen wurden zu Beginn und am Ende der Inkubationszeit analytisch überprüft (s. Kapitel 2.3).

Grund- und Oberflächenwasser

In einem Teil der Wasserproben wurde in sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben mit einer Aceton-Stammlösung der Pflanzenschutzmittel die höchste Testkonzentration eingestellt und durch Verdünnen mit unbehandelten Wasserproben die gewünschten Abstufungen (5 Konzentrationen) hergestellt. Pro Konzentrationsstufe wurden 3 Parallelen angesetzt. Die Proben wurden bei 10 °C (Grundwasser) und 15 °C (Oberflächenwasser) inkubiert. Für die Untersuchung der Funktionsparameter wurden die mikrobiellen Lebensgemeinschaften aus den Wasserproben direkt eingesetzt oder abfiltriert, entsprechend den jeweiligen Methoden. Die Konzentrationen der Testsubstanzen wurden zu Beginn und am Ende der Inkubationszeit analytisch überprüft (siehe Kapitel 2.3).

2.1.2.2 Bestimmung der Aktivität des Elektronen-Transport-Systems (ETS)

Methode:

Die Bestimmung der Aktivität der NADH-abhängige Dehydrogenasen des Elektronen-Transport-Systems erfolgte nach Obst und Holzapfel-Pschorn (1988) mit INT (Iodnitrotetrazoliumchlorid):
 $\text{INT} + \text{NAD(P)H} \Rightarrow \text{Formazan (reduzierte Form)} + \text{NAD(P)}^+$

0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5:	7,1 g Na ₂ HPO ₄ und 6,81 g KH ₂ PO ₄ /500 ml Aqua dest.
ETS-B-Lösung:	9,25 MgSO ₄ , 750 mg Polyvinylpyrrolidon und 1 g Triton-X-100 ad 500 ml Phosphatpuffer, pH 7,5.
ETS-Substrat-Lösung	50 mg NADPH, 290 mg NADH, 0,92 g Triton-X-100 in 460 ml Phosphatpuffer lösen. Portioniert Einfrieren.
INT-Lösung:	200 mg Iodnitrotetrazoliumchlorid/100 ml Aqua dest.
Quench-Lösung:	1 M Phosphorsäure

Probenvorbereitung:

Für Grund- und Oberflächenwasserproben wurden zur Anreicherung der Mikroorganismen 100 ml Originalprobe durch Membranfilter filtriert (Polyvinylidenfluorid, 0,2 µm, GVWP 04700, Fa. Millipore). Das Filter wurde zusammengerollt in einem Zentrifugenröhrchen mit 5 ml ETS-B-Lösung 10 min in einem Ultraschallbad aufgeschlossen und anschließend 15 min bei 20000 U/min zentrifugiert.

Im Falle der *Pseudomonas putida* – Kulturen wurde 1 ml *P. putida* Kultur mit 9 ml ETS-B-Lösung versetzt, 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen und anschließend 10 min bei 20000 U/min abzentrifugiert.

Testdurchführung:

1 ml Überstand, 3 ml ETS-Substrat-Lösung und 1 ml INT-Lösung wurden gut vermischt, Gewässerproben wurden 1 h, *P. putida* Proben wurden 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und danach mit 1 ml Quench-Lösung versetzt. Die photometrische Messung erfolgte bei 490 nm gegen den Blindwert mit ETS-B- Lösung anstelle des Probenüberstandes.

Als Maß für die Aktivität der Proben wurde die gemessene Extinktion in Prozent der Kontrollen angegeben.

2.1.2.3 Bestimmung der Esterase-Aktivität:

Methode:

Die Bestimmung der Aktivität der unspezifischen Esterasen mit Fluoresceindiactetat erfolgte nach Obst und Holzappel-Pschorn (1988).

Substratlösung: 20 mg Fluoresceindiactetat in 10 ml Aceton p.a. lösen, bei –18 °C aufbewahren.

NaCl-Lösung: 0,14 M, 8,18 g NaCl / 1000 ml aqua dest.. Autoklavieren und kühl aufbewahren.

Für die Eichkurve wurden 100 µl Substratlösung in 1 ml 1 N NaOH gegeben und unter Testbedingungen verdünnt.

Testdurchführung:

Aus den Grund- und Oberflächenwasserproben wurden 10 ml Originalprobe mit 40 µl Substratlösung in einem Reagenzglas vermischt und 5 h (Oberflächenwasser) bzw. 24 h (Grundwasser) bei max. 25 °C geschüttelt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Konzentration des Reaktionsproduktes photometrisch bei 400 nm gegen den Blindwert bestimmt. Blindwert: 10 ml aqua dest. und 40 ml Substratlösung. Die Proben aus den *Pseudomonas putida*-Kulturen wurden wie die Grund- und Oberflächenwasserproben behandelt. Als Maß für die Aktivität der Proben wurde die gemessene Extinktion in Prozent der Kontrollen angegeben.

2.1.2.4 Bestimmung der Phosphatase-Aktivität

Methode:

Die Bestimmung erfolgte nach Obst und Holzappel-Pschorn (1988).

Substratlösung: 10 mg 4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz / 10 ml 0,14 M NaCl-Lösung (steril). Frisch ansetzen und bis zum Gebrauch kühl lagern, max. 24 h.

Natriumcarbonatlösung: 1 M

Die Eichkurve wird mit 4-Nitrophenol (MM 139,1) unter Testbedingungen erstellt.

Testdurchführung:

Im Falle der *Pseudomonas putida* –Kulturen wurden 1 ml *P. putida* Kultur und 1 ml Substratlösung in einem Reagenzglas geschüttelt. Die Ansätze wurden 15 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml NaCO₃-Lösung wurde die Reaktion abgestoppt und ein alkalisches Milieu eingestellt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und die Konzentration des Reaktionsproduktes im klaren Überstand wurde photometrisch bei 400 nm gegen den Blindwert (1 ml 0,14 M NaCl-Lösung und 1 ml Substratlösung) bestimmt.

Im Falle der Grund- und Oberflächenwasserproben wurden 1 ml Originalprobe und 1 ml Substratlösung in einem Reagenzglas geschüttelt. Die Ansätze wurden 6 h bei 30 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml NaCO₃-Lösung wurde die Reaktion abgestoppt und ein alkalisches Milieu eingestellt. Die Konzentration des Reaktionsproduktes wurde photometrisch bei 400 nm gegen den Blindwert (1 ml 0,14 M NaCl-Lösung und 1 ml Substratlösung) bestimmt.

Als Maß für die Aktivität der Proben wurde die gemessene Extinktion der in Prozent der Kontrollen angegeben.

2.1.3 Untersuchungen zur Struktur: genetische Diversität mittels RFLP und T-RFLP

2.1.3.1 Chemikalien und Lösungen:

Für die vorliegende Arbeit wurden, soweit nicht anders angegeben, die Chemikalien folgender Hersteller verwendet: Eppendorf (Hamburg), Life Technologies (Schottland), Macherey-Nagel (Düren), Merck (Darmstadt), MWG Biotech GmbH (Ebersberg), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Sigma (Steinheim).

Lösungen

Blaumarker	Glycerin	5,0 ml
	EDTA (0,5 M)	1,5 ml
	Bromphenolblau	20 mg
	H ₂ O bidest.	3,5 ml

Ethanol 100%

Ethidiumbromid 10 mg/ml

Längenstandard	1 kb Ladder	50 µl
	Blaumarker	50 µl
	H ₂ O	400 µl

LB-Medium Hefeextrakt 5 g
 Pepton/Casein, tryptisch verdaut 10 g
 NaCl 5 g H₂O dest. ad 1 l
 Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Für die Herstellung von Agar-Platten wurden 15 g/L Agar zugesetzt. Die Medien wurden 20 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert.
 Bei Bedarf wurden nach dem Autoklavieren 2 ml X-Gal (20 mg/ml), 0,5 ml Ampicillin (100 mg/ml) und 0,25 ml 1 M IPTG auf 1 l zugegeben.

Natriumacetat-Puffer 3 M, pH 5,3

Phosphatpuffer 6,8 ml NaH₂PO₄ 1 M + 13,2 ml 1 M Na₂HPO₄ ad 1 l Aqua dest., pH 8.

Restriktionsenzyme und entsprechende DNA-Schnittstellen

MSP I	5' C ^v CGG 3'
	3' GGC _^ C 5'
RSA I	5' GT ^v AC 3'
	3' CA _^ TG 5'
Hae III	5' GG ^v CC 3'
	3' CC _^ GG 5'

SDS-Lösung 10% Natriumdodecylsulfatlösung in Aqua dest.

TAE-Puffer (10 x)	Tris-HCl (0,4 M), pH 7,5	48,45 g
	Natriumacetat (0,2 M)	27,22 g
	EDTA (10 M)	3,72 g H ₂ O dest. ad 1 L.

Tris-Puffer 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

2.1.3.2 Inkubation

Je 2 l der Wasserproben wurden mit 17,3 mg/l Cyprodinil versetzt und dann auf 2 sterile 2l-Erlenmeyerkolben zu gleichen Teilen aufgeteilt. Daraufhin wurden die Proben eine, zwei bzw. drei Wochen bei 10 °C (Grundwasser) bzw. 14 °C (Oberflächenwasser) inkubiert und dabei mit 100 U/min geschüttelt. Zur Kontrolle wurden jeweils 2 l ohne Pflanzenschutzmittel inkubiert.

2.1.3.3 Aufarbeitung und DNA-Isolierung

Unmittelbar nach der Probennahme und am Ende der jeweiligen Inkubationszeiten wurden aus jedem Kolben 100 ml für die chemische Analyse der Testsubstanzen entnommen. Die restliche Wasserprobe wurde unter der Sterilbank durch ein steriles Membranfilter (0,22 µm, Durapore Membran, Millipore) filtriert und das Filtrat verworfen.

Das Filter wurde in 50 ml Kunststoffröhrchen überführt und mit 2,2 ml Phosphatpuffer versetzt. Die Mischung wurde 10 min mit Hilfe eines Vortex auf höchster Stufe durchmischt, um die Bakterien von dem Filter zu lösen. 200 µl wurden zur Kultivierung (s. Kapitel Anreicherung und Isolierung von Bakterien) verwendet.

Die Bakteriensuspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 13000 U/min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in neues Reaktionsgefäß überführt und zur Sicherheit bei -20 °C aufbewahrt.

Für die DNA-Isolierung wurde das Pellet mit 500 µl Phosphatpuffer und 100 µl 10% SDS-Lösung versetzt und anschließend 10 min bei 65 °C inkubiert. Zum Aufschließen der Zellen wurden 0,5 g Glasperlen (0,1 mm Silicabeads, Ciconia) hinzugegeben und die Mischung mit dem Fastprep (Biosavant) 20 sec auf Stufe 4, oder 15 min auf einem Vortex auf höchster Stufe durchmischt. Nach Zentrifugation bei 13000 U/min für 30 min wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 600 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24+1 v/v) durch einminütiges Schütteln per Hand vermischt. Danach wurde 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert und die wässrige, obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Mischung mit Chloroform/Isoamylalkohol und anschließender Zentrifugation wurde noch zweimal wiederholt. Der wässrige Überstand (=1 Volumeneinheit) wurde mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat-Puffer und 2,5 Vol 100% Ethanol versetzt und zum Fällen der DNA über Nacht bei 4 °C stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde die Probe bei 30 min 13000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 500 µl 70-prozentigen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend an der Luft getrocknet und danach in 100 µl 10 mM Trispuffer, pH 8, aufgenommen.

2.1.3.4 RFLP: Restriktionfragment-Längenpolymorphismus

Die hier beschriebene Methodik wurde von Sehr (2000) angewandt:

PCR der genomischen 16S rDNA

Primer:	27F	5`-GAG TTT GAT C(A/C)T GGC TCA G-3`
	125F	5`-AC(G/T) GCT CAG TAA CAC GT-3`
	519R	5`-G(A/T)A TTA CCG CGG C(G/T)G CTG-3`
	907R	5`-CCG TCA ATT C(A/C)T TT(A/G) AGT TT-3`
	915R	5`-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3`
	1100R	5`-AGG GTT GCG CTC GTT G-3`
	1378R	5`-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3`
	E4F	5`-CTG GTT GAT TCT GCC AGT-3`
	E1628R	5`-CGA CGG GCG GTG TGT A-3`
	M13F	5`-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3`
	M13R	5`-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3`

Folgende Primerkombinationen wurden für die 16S rDNA der Bakterien bzw. 18S rDNA der Eukaryonten verwendet:

	<u>Forward Primer</u>	<u>Reverse Primer</u>
Bakterien:	27F	1378R
Archaea:	125F	915R
Eukaryonten:	E4F	E1628R
Klone:	M13F	M13R

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Ansatz:	H ₂ O dest. (DNase- und RNase-frei)	76,5 µl
	10x Puffer (containing 15 mM MgCl ₂ , vom Hersteller)	10,0 µl
	dNTPs (2 mM/Nukleotid)	10,0 µl
	Forward Primer (30 µM)	1,0 µl
	Reverse Primer (30 µM)	1,0 µl
	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µL)	0,5 µl

Für eine Probe wurden 99 µl in einen PCR-Cup gegeben und 1 µl der Probe zupipettiert.

Die PCR-Cups werden in einen Thermocycler (Primus 25/96, MWG Biotech, Ebersberg) gegeben, mit dem folgendes Temperaturprogramm durchlaufen wurde:

<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Erklärung</u>
94 °C	90 sec	Denaturierung
94 °C	30 sec	Denaturierung —————↓
48-55 °C*	60 sec	Annealing 25 – 35 Zyklen
72 °C	120 sec	Polymerisation —————↑
72 °C	8 min	Polymerisation
20 °C	∞ Ende	abkühlen

* Bakterien: 48 °C, Archaea: 52 °C, Eukaryonten: 55 °C, Klone: 55 °C

Zur Kontrolle des PCR-Produktes werden 10 µl auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

Isolierung der PCR-Produkte

Die Isolierung erfolgte mit Nucleo Spin Extract 2 in 1 (Macherey-Nagel, Düren) leicht verändert nach Herstellerangaben. In ein Eppendorf-Cup wurden 400 µl NT 2 vorgelegt und 90 µl der Probe zugegeben, anschließend wurde die Probe für 1 min bei 6.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es erfolgte die Zugabe von 600 µl NT 3. Der Ansatz wurde nun für 1 min bei 11.000xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und 200 µl NT 3 zugegeben. Dann wurde die Probe für 2 min bei 11.000xg zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 40 °C getrocknet, 30 µl NE zugegeben und 1 min bei 20.800xg abzentrifugiert. Die 30 µl Überstand wurden bei 4 °C gelagert.

Durchführung der RFLP

Restriktionsverdau: Die amplifizierte 16S rDNA bzw. 18S rDNA wurden mittels Restriktionsenzymen (Restriktions-Endonucleasen) geschnitten. 8 µl der Probe (nach der Säulenaufreinigung) wurden mit 1 µl Puffer (Kit-Bestandteil) und 1 µl Restriktionsenzym versetzt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Für Restriktionsenzym *MspI* wurde Puffer B eingesetzt, bei den Restriktionsenzymen *RsaI* und *HaeIII* jeweils Puffer C. Die durch den Restriktionsverdau erhaltenen Restriktionsfragmente wurden in einem 2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Gelelektrophorese: Für ein 1%iges Gel wurde 0,5 g Agarosepulver in 50 ml TAE-Puffer (1x) gelöst und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht und nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 50 °C 1,25 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Es wurden 10 µl der Proben (mit Blaumarker) bzw. 5 µl des Längenstandards (1 kb DNA Ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde ca. 30 min bei 120 V durchgeführt und anschließend unter UV-Licht (Gel Doc 2000, BioRad) ausgewertet.

Erstellung einer 16S rDNA-Klonbibliothek

Bei der Klonierung wird ein DNA-Fragment des zu identifizierenden Organismus in einen Vektor eingeführt, der die Vervielfältigung dieser DNA ermöglicht. Entscheidend hierbei ist, den richtigen Vektor für die Klonierung auszuwählen. Hierbei wurde der pGEM-T Vektor eingesetzt. Zunächst wurde mit der durch DNA-Extraktion aufgeschlossenen DNA die PCR (Primerpaar 27F und 1378R, 28 Zyklen) und die Säulenaufreinigung durchgeführt.

Ligation: Die Ligation ist die Verknüpfung des Vektormoleküls mit der DNA. Das Enzym, welches diese katalysiert, wird als DNA-Ligase bezeichnet. In einem Ligationsansatz wurden die unten aufgeführten Substanzen zusammen pipettiert. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert:

H ₂ O dest. (DNase- und RNase-frei)	2 bzw. 0	µl
2 x Rapid Ligation Buffer	5	µl
pGEM-T Vektor (50 ng/µl)	1	µl
T4 DNA Ligase (3 U/µl)	1	µl
PCR-Produkt	1 bzw. 3	µl
Insgesamt	10	µl

Transformation: Unter der Transformation versteht man die Übertragung von genetischem Material durch freie, lösliche DNA, die aus einem Spender-Bakterium freigesetzt oder daraus extrahiert worden ist, auf ein Empfänger-Bakterium. Eine spezielle Form der Transformation ist die Elektroporation. Hierbei werden die Zellen einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt, der vorübergehend Poren in der Zellmembran entstehen lässt, so dass die DNA-Moleküle ins Zellinnere gelangen können.

1 µl Ligations-Produkt wurden in einem Reaktionsgefäß auf Eis mit 40 µl elektrokompetenten Zellen (DH 10B) vermischt und die Elektroporation durchgeführt (E. coli Pulser, BioRad). Danach wurde der Mix mit 800 µl Medium versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension (20 bis 100 µl pro Platte) auf LB-Platten (mit Ampicillin, IPTG und X-Gal) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf dem Medium wuchsen über Nacht weiße und blaue Kolonien. Von den weißen Kolonien (hierin ist ein DNA-Fragment) wurden 48 abgenommen und jeweils auf Platte und in 1 ml Flüssigkultur (LB-Medium + Ampicillin) aufgenommen. Diese wurden wiederum über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus der Flüssigkultur wurden 400 µl abgenommen, für 5 min bei 20.800 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 55 µl Tris-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 100 °C erhitzt. Danach wurde die Probe für 5 min bei 20.800 x g zentrifugiert, der Überstand (50 µl) abgenommen und das Pellet verworfen. Die restlichen 600 µl werden mit Glycerin zu gleichen Teilen gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

Anreicherung und Isolierung von Bakterien: Zweimal 100 µl der in NaP-Puffer aufgenommenen Mikroorganismen-Proben wurden auf Agarplatten ausgestrichen (LB-Medium, Verdünnung 1:10) und bei 10 °C (Grundwasser) bzw. 14 °C (Oberflächenwasser) inkubiert. Durch mehrmaliges Überimpfen (Verdünnungsausstrich) wurden Reinkulturen erhalten. Diese wurden in 50 µl Tris-Puffer aufgenommen, 15 min bei 100 °C gekocht und 10 min bei 20.800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen.

Sequenzanalyse: Für die Sequenzanalyse wurde jeweils mit den Klonen und den Reinkulturen eine PCR (Primer M13F und M13R bzw. 27F und 1378R, 25 Zyklen) und anschließend mit dem PCR-Produkt eine Säulenaufreinigung durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde folgender Ansatz hergestellt:

H ₂ O dest. (DNase- und RNase-frei)	9 µl
Primer (519R, 907R bzw. 1100R)	5 µl
Probe	1 µl
BigDye (Premix)	2 µl
Puffer	3 µl

Die Ansätze wurden in einen Cyler (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems) mit folgendem Temperaturprogramm gegeben: 1) 10 sec 96 °C; 2) 10 sec 50 °C; 3) 30 sec 60 °C. Die Schritte 2 und 3 wurden 25 mal wiederholt.

Anschließend wurde eine Fällung mit 5 µl Natriumacetat (3 M), 30 µl H₂O und 175 µl 100 %igem Ethanol durchgeführt. Danach wurde der Ansatz zweimal mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und dann in 15 µl H₂O resuspendiert. Die Probe wurde in den Sequenzierer (ABI PRISM 3700 DNA Analyzer, Perkin Elmer) gegeben.

2.1.3.5 T-RFLP: Terminaler Restriktionfragment-Längenpolymorphismus

Aufarbeitung und DNA-Isolierung

Für die PCR der genomischen 16S rDNA (= SSU rDNA) wurden folgende Primer rDNA von Bakterien verwendet:

27 forward (fwd) FAM markiert: 5'-GAG TTT GAT C(A/C)T GGC TCA G-3'
1378 reverse (rev): 5'-CGC TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'

Ansatz:	H ₂ O dest. (DNase- und RNase-frei)	76,5 µl
	PCR-Puffer	10,0 µl
	dNTP-Mix 10 µM	10,0 µl
	Forward Primer (27 fwd FAM)	1,0 µl
	Reverse Primer (1378 rev)	1,0 µl
	Taq DNA-Polymerase (5 U/µl, Promega in MgCl ₂)	0,5 µl

Für eine Probe wurden 99 µl in einen PCR-Cup gegeben und 1 µl der Probe zupipettiert.

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt (Thermocycler MWG Biotech primer 96 plus):

Temperatur	Zeit	Erklärung	
94 °C	3 min	Denaturierung	
94 °C	30 sec	Denaturierung	—————↓
48 °C	60 sec	Annealing	28 Zyklen
72 °C	120 min	Polymerisation	—————↑
72 °C	8 min	Polymerisation	
20 °C	∞ Ende	abkühlen	

Zur Kontrolle des PCR-Produkts wurden 10 µl auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

Isolierung der PCR-Produkte

Zur Isolierung der PCR-Produkte wurden die PCR Produkte mit dem Quiagen-Purification Kit nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Anschließend wurde jedes PCR-Produkt jeweils mit den 3 Restriktionsenzymen MSP-I, RSA-I und Hae-III (s.o.) 3 h bei 37 °C inkubiert: 8 µl PCR Produkt plus 1 µl Puffer B und 1 µl MSPI, bzw. 1 µl Puffer C und 1 µl RSAI bzw. 1 µl Puffer C und 1 µl HaeIII.

Durchführung der T-RFLP

Für die Messung im Gerät wurden 10 µl des Restriktionsverdau mit 9 µL Formamid (Template Suppression Reagent, Applied Biosystems) und 1 µl „Gene-Scan™ – 2500 TAMRA™ Size Standard“ (Applied Biosystems) vermischt. Die Messung erfolgte mit dem ABI PRISM Gene-Scan™ –2500 und die Auswertung mit der Software 310 Gene Scan 3.1.2 von Applied Biosystems.

2.2 Makrobiologische Untersuchungen

2.2.1 Beschaffung der Grundwasserorganismen

In Anlehnung an die Methode von Bou und Rouch (1974) wurde das Grundwasser in Echthausen an der Ruhr und in der Kiesgrube bei Aschaffenburg mittels einer mechanischen Pumpe aus Peilrohren gefördert. Die Peilrohre haben einen Durchmesser von 1,5 - 2 Zoll und sind aus verzinktem Stahl oder V2a-Stahl gefertigt. Die Enden der Rohre sind mit einer Spitze verschraubt und tragen im Anschluss auf einer Länge von 0,5 - 1 m Filterschlitz einer Weite von 3 – 15 mm (Auskunft der Werkstatt der Stadtwerke Aschaffenburg und der Wassergewinnungsanlage Echthausen).

In Echthausen wurde eine Pumpausrüstung bestehend aus einer Motorpumpe (1,5 KW, HONDA), einem vakuumstabilen Schlauch (Weite 1 ¼ Zoll) und einem Vorfilter mit einem Planktonnetz (Maschenweite 42µm) verwendet. Bevor das Grundwasser die Pumpe passiert, wurde es durch den Vorfilter geleitet und die Tiere in einem an das Netz geschraubten Sammelbehälter gesammelt. Die Peilrohre in Echthausen sind von 20 cm unter der Filtersandschicht bis in 5,3 m Tiefe über dem Grundwasserstauer im Langsamsandfilter versenkt. Aus jedem der 9 Peilrohre wurden 300 l Wasser in 30 Minuten gefördert. 10 derartiger Probennahmen wurden im Verlauf des Projektes durchgeführt (Juni, August, September, Oktober 1999 und März, April, Juni, Juli, August, September 2000). Die Temperatur im Langsamsandfilter verläuft im Jahresgefälle, ist aber doch merklich gedämpft (Rumm 2000). Sie schwankte im Untersuchungszeitraum zwischen 8,9°C (April 1999) und 20,7°C (Juni 2000). Durch die geringen Verweilzeiten des infiltrierten Wassers war auch eine geringe Streuung der Temperaturwerte zwischen den Peilrohren im oberen und unteren Bereich zu verzeichnen.

In Aschaffenburg wurden 2 Peilrohre (Peilrohre 63 und 66) beprobt, die in 11 und 13 m Tiefe im Grundwasserhorizont stecken. Um eine möglichst große Zahl Organismen zu sammeln, wurden 500 l Wasser pro Peilrohr gefördert. Als Pumpausrüstung wurde die Anlage der Stadtwerke genutzt: Die Tauchpumpe, eine Spezialanfertigung für die Stadtwerke, wird mit einer regelbaren Gleichstromausrüstung betrieben und kann Wasser bis in 30 m Höhe fördern. Das Wasser wurde durch ein Planktonnetz mit 42µm Maschenweite geleitet und die Tiere mit einer Wasserspritzflasche in einen Kautexbehälter gespült. Die Temperatur dieses Standortes ist sehr gleichmäßig im Sommer wie im Winter und liegt bei 11°C.

Für den Transport der Tiere wurden Haushaltskühltaschen mit Kühlelementen verwendet.

Tabelle 1: Standorte und Tierzahlen der Probennahmen 1999

Probennahmeterminale	Aschaffenburg	Echthausen
	1 2 Peilrohre	4 9 Peilrohre
Acari	19	120
Amphipoda		119
Isopoda		1
Syncarida	98	
Harpacticoida (ohne Chappuisius)		5786
Chappuisius	5221	
Cyclopoida		606
Ostracoda		285
Gastropoda		59
Oligochaeta		75
Polychaeta		23
Turbellaria		310
Rotifera	>1000	

2.2.2 Hälterung

Nach der Probennahme wurden die Tiere nach Arten sortiert und in Gefäße überführt, die mit Verdünnungswasser gefüllt waren¹. Die Gefäße wurden im Dunkeln bei 10-12 °C aufbewahrt. In mehrwöchigen Abständen wurden die Organismen mit kleinen Mengen Erlenlaub und - im Falle der Amphipoden - mit geringen Mengen frischen Hackfleischs gefüttert. Erfahrungen der Universität Oldenburg belegen eine erfolgreiche Hälterung von Amphipoden (*Niphargus fontanus* aus dem Langsamsandfilter Echthausen) über 2 Jahre.

2.2.3 Testansatz

Einen Tag vor Ansatz des Tests wurden die Organismen nach Größe und Fitness sortiert. Es wurden grundsätzlich Konzentrationsreihen mit fünf Konzentrationen und unbelasteter Kontrolle in 2 oder 3 Parallelen gefahren. Pro Gefäß wurden, je nach Verfügbarkeit der Organismen, zwischen 3 und 10 Tiere eingesetzt.

Für die größeren Arten (Amphipoden) wurden 50 ml Bechergläser verwendet, die mit je 5 Glasperlen (Durchmesser: 5 mm) ausgestattet wurden, um ein Lückensystem ansatzweise zu simulierten. Alle anderen Arten wurden in Mikroskopiernäpfe (Gläser mit halbkugelförmiger

¹ Verdünnungswasser ist aktivkohlegefiltertes, belüftetes und über Kalkstein geleitetes Leitungswasser der Stadt Schmallingenberg

Vertiefung, Durchmesser 32 mm, Fassungsvermögen: 3 ml) eingesetzt. Die Gefäße wurden mit Glasplatten abgedeckt.

Um die Bedingungen im Grundwasser zu simulieren, wurden alle Tests im Dunkeln in einem Kühlbrutschrank bei etwa 10°C durchgeführt. Das für die Bonituren benutzte Binokular wurde aus den gleichen Gründen gekühlt.

Die Pflanzenschutzmittel wurden in Aceton vorgelöst. Daraus wurden für jede Konzentration acetonische Stammlösungen hergestellt, die derart konzentriert waren, dass 100 µl dieser Lösungen zu einem Liter Wasser gegeben werden konnten, um die gewünschte Endkonzentration zu erhalten. Diese Testlösungen wurden am Tag vor Versuchsbeginn angesetzt und auf 10 °C temperiert.

2.2.4 Prinzipien für die Ableitung von Effektkonzentrationen

Zur Ableitung der Effektkonzentrationen wurden die mittlerem gemessenem Konzentrationen der Wirkstoffe pro Konzentrationsstufe herangezogen. Im Falle von lambda-Cyhalothrin wurden die beiden Enantiomere addiert. Falls die analytischen Messergebnisse mindestens 80 % der nominalen Werte ergaben (Cyprodinil, z.T. lambda-Cyhalothrin), wurde der Bezug auf nominale Konzentrationen vorgenommen. Falls die analytischen Messergebnisse unter 80 % der nominalen Werte lagen (z.T. lambda-Cyhalothrin), wurde der Bezug zu den mittleren gemessenen Konzentrationen hergestellt. Da im Falle von Bromoxynil-Octanoat die Wirkung akut auftritt und die Substanz verhältnismäßig schnell abbaut, wurde für vergleichende Betrachtungen zunächst der Bezug zu Initialkonzentrationen gewählt. Wenn bei den verglichenen Standardorganismen auf gemessene Konzentrationen bezogene tägliche LC50-Werte vorhanden waren, wurden über eine Anpassung einer abklingenden e-Funktion 1. Ordnung an die Messwerte an Tag 0 und 7 die entsprechenden Tageskonzentrationen geschätzt und auf der Basis dieser Schätzungen tägliche Effektkonzentrationen berechnet.

Es erfolgte eine tägliche Bonitur. Da subletale Effekte im Verlauf letal wurden oder sich Wiedererholung einstellte, wurden im Wesentlichen nur letale Wirkungen bewertet. Zum Zeitpunkt der Ermittlung von Effektkonzentrationen durfte die Kontrollsterblichkeit maximal 20 % betragen. Wenn es die Überlebensrate der Kontrollen zuließ, wurde der Versuch über drei (Niedere Krebse) oder vier bis sechs (Höhere Krebse) Wochen fortgeführt. Dies gilt wegen der initialen Wirkung nicht für die Versuche mit Bromoxynil-Octanoat. Somit wurden die Effektkonzentrationen eines Mittels gegenüber einer Art über verschiedene Zeiträume im Rahmen eines einzigen Tests gewonnen. Bei unklaren Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen wurde die Auswertung auf die höchste Konzentration ohne Sterblichkeit und höhere Konzentrationen beschränkt. Im Folgenden bezeichnet der Begriff „akut“ eine Testdauer von der Länge eines akuten Standardtests (48 – 96 h), während „verlängert“ die fünf- bis zehnfache Dauer eines akuten Standardtests bedeutet.

2.3 Analytik

2.3.1 Probenahme

Zu Beginn aller Tests wurde die Initialkonzentration aus den 1 l – Testlösungsansätzen einer jeden Konzentration bestimmt. Weiterhin wurden bei Testende die Replikate pro Konzentration gepoolt und die Konzentration bestimmt. Für die beiden in Wasser instabilen Wirkstoffe lambda-Cyhalothrin und Bromoxynil-Octanoat wurden Konzentrationsmessungen zwischen Testbeginn und Testende vorgenommen. Dies hatte zum Schutz der Testorganismen in zusätzlich mitgeführten Parallelansätzen ohne Tiere stattzufinden. Es wurde angestrebt, gleiche Testgefäße einzusetzen, wie sie für die Organismen verwendet wurden, um gleiche Verteilungsverhältnisse zu erzeugen. Die geringen Testvolumina gestatteten dies jedoch nur für die höchste Konzentration von Bromoxynil-Octanoat, für die pro Messtag fünf zusätzliche Gefäße von Beginn an mitgeführt wurden. Für die niedrigeren Konzentrationen wurden ein oder zwei 50 ml Glasschalen (Durchmesser und Höhe 5 cm) pro Messtag mitgeführt. Die sehr niedrigen Konzentrationen von lambda-Cyhalothrin machten die Mitführung von ein bis fünf 100 ml Bechergläsern pro Konzentration und Messtag nötig.

2.3.2 Analysenmethoden

2.3.2.1 Cyprodinil

Je nach Sollkonzentration wurden von den wässrigen Proben 10 – 100 ml entnommen und in 250ml-Scheidetrichter gefüllt. Bei Aliquoten < 100 ml wurde mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 15 g NaCl und internem Standard (p,p'-DDE) wurde mit 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Ausschüttelung wurde mit 30 ml Dichlormethan wiederholt. Die vereinten Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer auf ein Endvolumen < 5 ml eingeengt, in Messkolben überführt und definiert aufgefüllt (5 ml bzw. 10 ml).

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte per GC/MS-Analyse nach der Methode des internen Standards. Detektiert wurden von Cyprodinil das Target-Ion 224 amu und die Qualifier-Ionen 225 / 210 amu und von p,p'-DDE das Target-Ion 318 amu und die Qualifier-Ionen 316 / 246 amu. Die Kalibrierung erfolgte über das Gesamtverfahren mit sechs Kalibrierstandards in einem Konzentrationsbereich von 0,75 – 7,5 µg/ml. Die Geräteparameter waren:

- GC/MS-System: HP 5890 GC mit MSD HP 5970 und Autosampler HP 7673 (Fa. Hewlett Packard)
- Trennsäule: 30 m HP5-MS, 0,25 mm ID; 0,25 µm Film (Fa. Hewlett Packard)
- Injektor: split/splitless bei 280°C
- Injektionsvolumen: 1 µl für 1 min splitless
- Temperaturprogramm: 2 min 40°C -> 25°C/min auf 250°C -> 10°C/min auf 280°C für 5,6 min.
- Trägergas: Helium strömungsgeregelt mit 1,0 ml/min (36,3 cm/sec)
- Transferline: 280°C
- MSD: Messung im SIM-Mode (Selected Ion Monitoring)
- RT Cyprodinil: 11,20 min
- RT p,p'-DDE: 11,80 min

2.3.2.2 *lambda-Cyhalothrin*

Je nach Sollkonzentration wurden von den wässrigen Proben 50 – 200 ml entnommen und in Scheidetrichter gefüllt. Bei Aliquoten < 100 ml wurde mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von NaCl (15g bei 100 ml Wasser bis 30 g bei 200 ml Wasser) und internem Standard (p,p'-DDE) wurde mit 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Ausschüttelung wurde mit 30 ml Dichlormethan wiederholt. Die vereinten Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer auf ein Endvolumen < 5 ml eingengt. Anschließend wurde im Stickstoffstrom auf < 1 ml ankonzentriert, portionsweise in Microvials überführt, zur Trockne eingedunstet und mit 100 µl bzw. 250 µl Toluol aufgenommen (je nach zu erwartender Konzentration).

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte per GC-Analyse mit ECD-Detektion nach der Methode des internen Standards. Die Kalibrierung erfolgte über das Gesamtverfahren mit acht Kalibrierstandards in einem Konzentrationsbereich von 7 – 200 ng/ml.

Cyhalothrin lagert sich vermutlich im Wasser teilweise zu einem Strukturisomer um, was daran erkennbar ist, dass im organischen Extrakt von wässrigen Lösungen neben der Originalsubstanz ein zweiter Peak mit identischem Massenspektrum auftaucht. Bei der Gehaltsbestimmung wurde deshalb die Summe beider Peaks zur Konzentrationsberechnung verwendet. Die Geräteparameter waren:

- GC-System:	HP 5890 GC mit ECD und Autosampler HP 7673 (Fa. Hewlett Packard)
- Trennsäule:	30 m BPX-5, 0,32 mm ID; 0,25 µm Film (Fa. SGE)
- Injektor:	split/splitless bei 290°C
- Injektionsvolumen:	1 µl für 1 min splitless
- Temperaturprogramm:	2 min 80°C -> 30°C/min auf 230°C für 3 min -> 5°C/min auf 250°C--> 25°C/min auf 300°C für 8 min
- Trägergas:	Helium strömungsgeregelt mit 1,2 ml/min (24,1 cm/sec)
- ECD-Temperatur:	300°C
- Makeup-Gas:	Argon/Methan 95:5
- RT p,p'-DDE:	10,80 min
- RT Cyhalothrin-Isomer:	16,20 min
- RT Cyhalothrin:	16,70 min

2.3.2.3 *Bromoxynil-Octanoat*

Je nach Sollkonzentration wurden von den wässrigen Proben 10 – 100 ml entnommen und in 250ml-Scheidetrichter gefüllt. Bei Aliquoten < 100 ml wurde mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 15 g NaCl und internem Standard (p,p'-DDE) wurde mit 50 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Ausschüttelung wurde mit 30 ml Dichlormethan wiederholt. Die vereinten Extrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer auf ein Endvolumen < 5 ml eingengt. Anschließend wurde im Stickstoffstrom das restliche Dichlormethan entfernt, mit ca. 5 ml Toluol aufgenommen, in Messkolben überführt und auf 10 ml aufgefüllt.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte per GC-Analyse mit ECD-Detektion nach der Methode des internen Standards. Die Kalibrierung erfolgte über das Gesamtverfahren mit sechs

Kalibrierstandards in einem Konzentrationsbereich von 11 – 180 ng/ml. Die Geräteparameter waren:

- GC-System: HP 5890 GC mit ECD und Autosampler HP 7673 (Fa. Hewlett Packard)
- Trennsäule: 30 m BPX-5, 0,32 mm ID; 0,25 µm Film (Fa. SGE)
- Injektor: split/splitless bei 290°C
- Injektionsvolumen: 1 µl für 1 min splitless
- Temperaturprogramm: 2 min 80°C -> 30°C/min auf 230°C für 3 min -> 5°C/min auf 250°C--> 25°C/min auf 300°C für 6 min
- Trägergas: Helium strömungsgeregelt mit 1,2 ml/min (24,1 cm/sec)
- ECD-Temperatur: 300°C
- Makeup-Gas: Argon/Methan 95:5
- RT p,p'-DDE: 10,80 min
- RT Bromoxynil-Octanoat: 12,60 min

2.4 Auswerteverfahren

Für die Ermittlung der NOEC und LOEC galt als Kriterium eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Sterblichkeit (in jedem Fall > 20 %). Es wurde versucht, mindestens zehn Tiere pro Konzentrationsstufe einzusetzen. Dies war nicht immer möglich (vgl. Anhang).

Für alle Zeitpunkte mit einer Änderung der beobachteten Sterblichkeiten wurde eine Probit-Analyse durchgeführt. Die Verteilung der Empfindlichkeiten gegenüber lambda-Cyhalothrin und der daraus ableitbare HC5-Wert wurden nach der Methode von Aldenberg und Slob (1993) und nach der Methode von Solomon et al. (1996) berechnet.

3 Ergebnisse

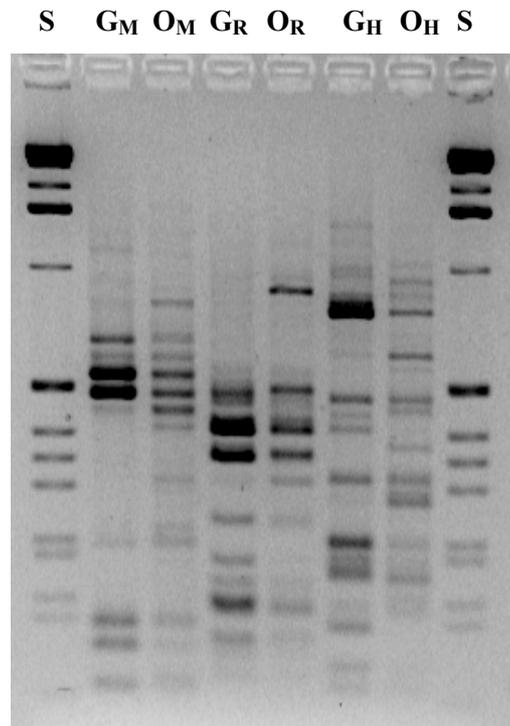
3.1 Vergleich der Struktur mikrobieller Lebensgemeinschaften in Grund- und Oberflächenwasser

3.1.1 Restriktionsfragment Längenpolymorphismus (RFLP)

Bei der RFLP-Methode (Sehr 2000) wird die zu untersuchende DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten und die entstandenen DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, wodurch charakteristische Bandenmuster entstehen. Hierbei zeigt ein Organismus in der Regel 3-5 starke typische Banden auf. Unterschiede im Bandenmuster weisen darauf hin, dass sich die Zusammensetzung der untersuchten Lebensgemeinschaft unterscheidet. In Abbildung 1 sind die Bandenmuster der RFLP-Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften des Grund- und Oberflächenwassers direkt nach der Probenahme zu sehen. Die verwendeten Restriktionsenzyme MspI, RsaI und HaeIII erzeugten jeweils unterschiedliche Bandenmuster, wobei Unterschiede zwischen den Grund- und Oberflächenwasserproben feststellbar waren.

Abbildung 1:
RFLP-Analyse der Mikroorganismen des be-
probten Grund- und Oberflächenwassers.

(S = 1 kb DNA Längenstandard; G = Grund-
wasser, O = Oberflächenwasser). Restrikti-
onsenzyme MspI (M), RsaI (R) und HaeIII (H)



3.1.2 Sequenzanalyse Klonbibliothek

Zur phylogenetischen Analyse der Diversität des Grund- und Oberflächenwassers wurden 16S rDNA-Klonbibliotheken erstellt. Für die Klonbibliothek wurden je 48 Klone vom Nährmedium abgenommen und beim Grundwasser 30 Klone und beim Oberflächenwasser 20 Klone zufällig ausgewählt und sequenziert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Ribosomal Database (Project II) verrechnet (WWW.CME.MSU.EDU/RDP).

Von den 30 sequenzierten Klonen des Grundwassers wurden bei einem δ -*Proteobacterium* 19 β -*Proteobacteria* gefunden. Bei 10 Organismen hatte die Sequenzierung nicht funktioniert. In Tabelle 2 sind die sequenzierten Klone des Grundwassers dargestellt.

Tabelle 2: Phylogenetische Zuordnung der sequenzierten Klone (Grundwasser)

Klon	Phylogenetische Zuordnung	Klon	Phylogenetische Zuordnung
6	β - <i>Proteobacteria</i>	23	β - <i>Proteobacteria</i>
9	β - <i>Proteobacteria</i>	24	β - <i>Proteobacteria</i>
10	β - <i>Proteobacteria</i>	27	β - <i>Proteobacteria</i>
13	β - <i>Proteobacteria</i>	28	β - <i>Proteobacteria</i>
15	β - <i>Proteobacteria</i>	29	β - <i>Proteobacteria</i>
17	β - <i>Proteobacteria</i>	30	β - <i>Proteobacteria</i>
19	β - <i>Proteobacteria</i>	31	δ - <i>Proteobacteria</i>
20	β - <i>Proteobacteria</i>	32	β - <i>Proteobacteria</i>
21	β - <i>Proteobacteria</i>	33	β - <i>Proteobacteria</i>
22	β - <i>Proteobacteria</i>	34	β - <i>Proteobacteria</i>

Bei den sequenzierten Klonen im Oberflächenwasser konnten sowohl drei α -, zwei β - und drei γ -*Proteobacteria* als auch ein Angehöriger des CFB-Phylums und zwei Grampositive Bakterien gefunden werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Phylogenetische Zuordnung der sequenzierten Klone (Oberflächenwasser)

Klon	Phylogenetische Zuordnung
1	α - <i>Proteobacteria</i>
4	α - <i>Proteobacteria</i>
10	γ - <i>Proteobacteria</i>
11	γ - <i>Proteobacteria</i>
13	β - <i>Proteobacteria</i>
14	CFB-Phylum
15	Grampositives Bakterium
16	Grampositives Bakterium
17	α - <i>Proteobacteria</i>
18	γ - <i>Proteobacteria</i>
20	β - <i>Proteobacteria</i>

3.1.3 Sequenzanalyse kultivierter Organismen

Neben der Erstellung der Klonbibliotheken wurden zur Beschreibung der bakteriellen Diversität des Grund- und Oberflächenwassers Reinkulturen auf LB-Medium isoliert. Von den auf LB-Medium gewachsenen Kolonien wurden jeweils 10 Kolonien aus den Grundwasser- bzw. Oberflächenwasser-Proben abgenommen und sequenziert.

Von den Isolaten des Grundwassers wurden 9 Proben sequenziert, wobei zwei Sequenzen nicht verrechnet werden konnten (

Tabelle 4). Die sequenzierten Organismen im Grundwasser gehören in die Klassen der β - und γ -*Proteobacteria* sowie der CFB-Phylum.

Tabelle 4: Phylogenetische Zuordnung der auf LB-Medium isolierten Grundwasserorganismen

Isolat	Phylogenetische Zuordnung	Nächster Verwandter	Ähnlichkeit [%]	Basen
1	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas borealis</i>	91,2	1000
2	β -Proteobacteria	<i>Pseudomonas mephitica</i>	96,4	1000
3	γ -Proteobacteria	<i>Aeromonas salmonicida</i>	100	400
4	β -Proteobacteria	<i>Zoogloea OCS7</i>	84,4	1000
7	CFB-Phylum	<i>Sphingobacterium OM-E81</i>	91,0	1000
8	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas veronii</i>	98,8	400
9	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas borealis</i>	93,0	800

Beim Oberflächenwasser wurden 10 Isolate sequenziert, bei drei Proben funktionierte die Sequenzierung nicht (Tabelle 5). Die im Oberflächenwasser aufgefundenen Organismen können bis auf eine Ausnahme in die Klasse der γ -Proteobacteria eingeordnet werden.

Tabelle 5: Phylogenetische Zuordnung der auf LB-Medium isolierten Oberflächenwasserorganismen

Isolat	Phylogenetische Zuordnung	Nächster Verwandter	Ähnlichkeit [%]	Basen
1	γ -Proteobacteria	<i>Aeromonas sp.</i>	98,6	1000
2	γ -Proteobacteria	<i>Aeromonas sp.</i>	100	800
3	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	800
5	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas sp.</i>	94,5	1000
7	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas sp.</i>	97,6	1000
9	γ -Proteobacteria	<i>Aeromonas salmonicida</i>	100	400
10	CFB-Phylum	<i>Flexibacter sp.</i>	85,4	800

In allen Lebewesen finden sich ribosomale RNA-Moleküle (rRNA) und ein Vergleich der Nukleotidsequenzen von rRNAs verschiedener Organismen ermöglicht eine Aussage über die Nähe der Verwandtschaft. Dies geschieht in Form eines phylogenetischen Stammbaums, bei dem die Gesamtlänge der horizontalen Linie, die zwei Organismen miteinander verbindet, proportional zur Anzahl der Unterschiede in der Nukleotidsequenz ist. Das bedeutet, je mehr Unterschiede, umso länger ist die Verbindungslinie und um so weniger sind die beiden Organismen miteinander verwandt (Alberts et al., 1999). Abbildung 2 und Abbildung 3 zeigen die Stammbäume der Klone und Isolate des Grund- und Oberflächenwassers.

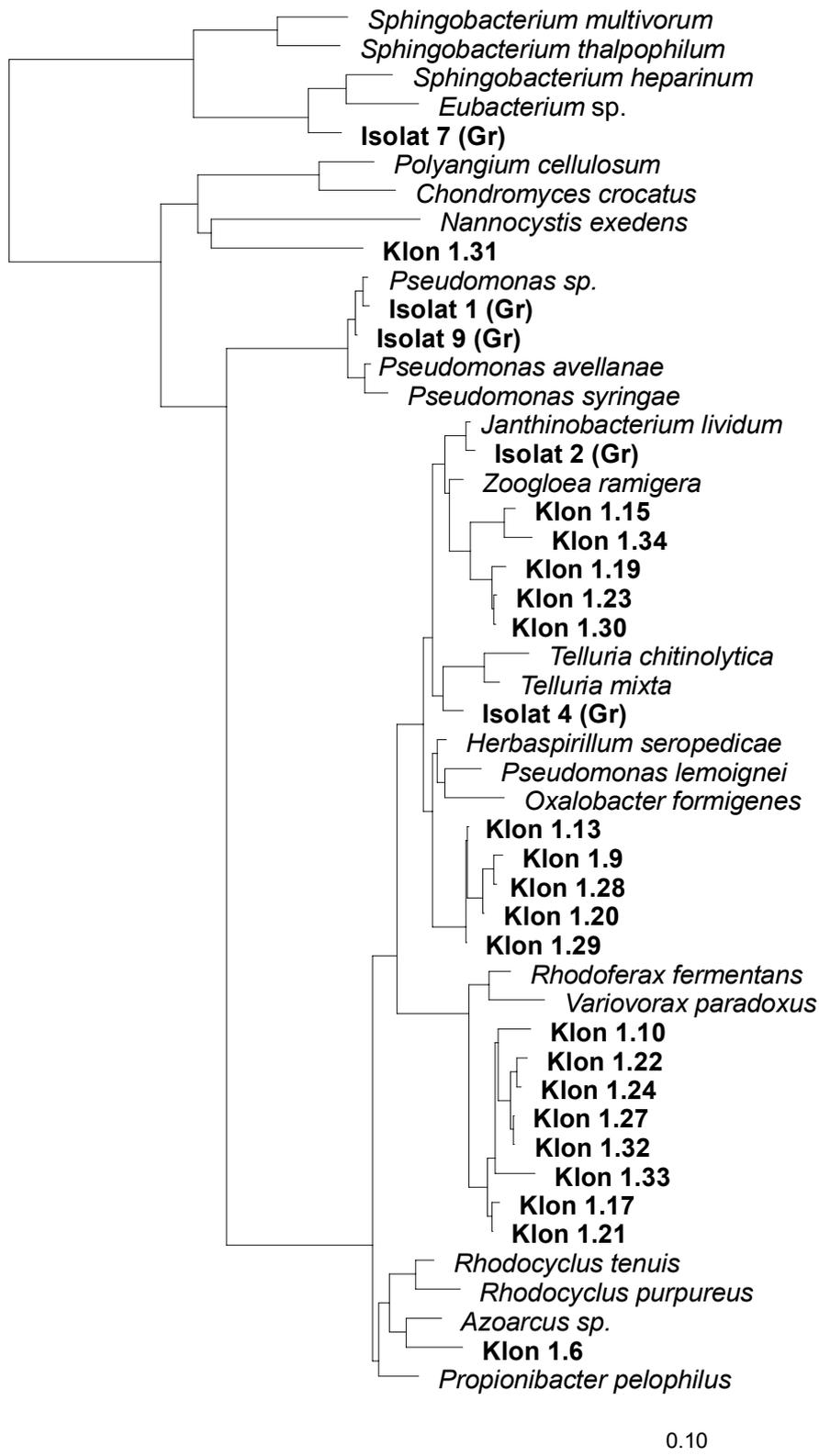


Abbildung 2: Phylogenetische Einordnung von Umweltklonen und Isolaten des unbelasteten Grundwassers.

Das Dendrogramm basiert auf einer „Distance-Matrix“-Analyse und wurde nach dem „Neighbor-Joining“-Algorithmus berechnet. Der Entfernungsmaßstab beträgt 10 kalkulierte Basenaustausche pro 100 Nukleotidsequenzpositionen

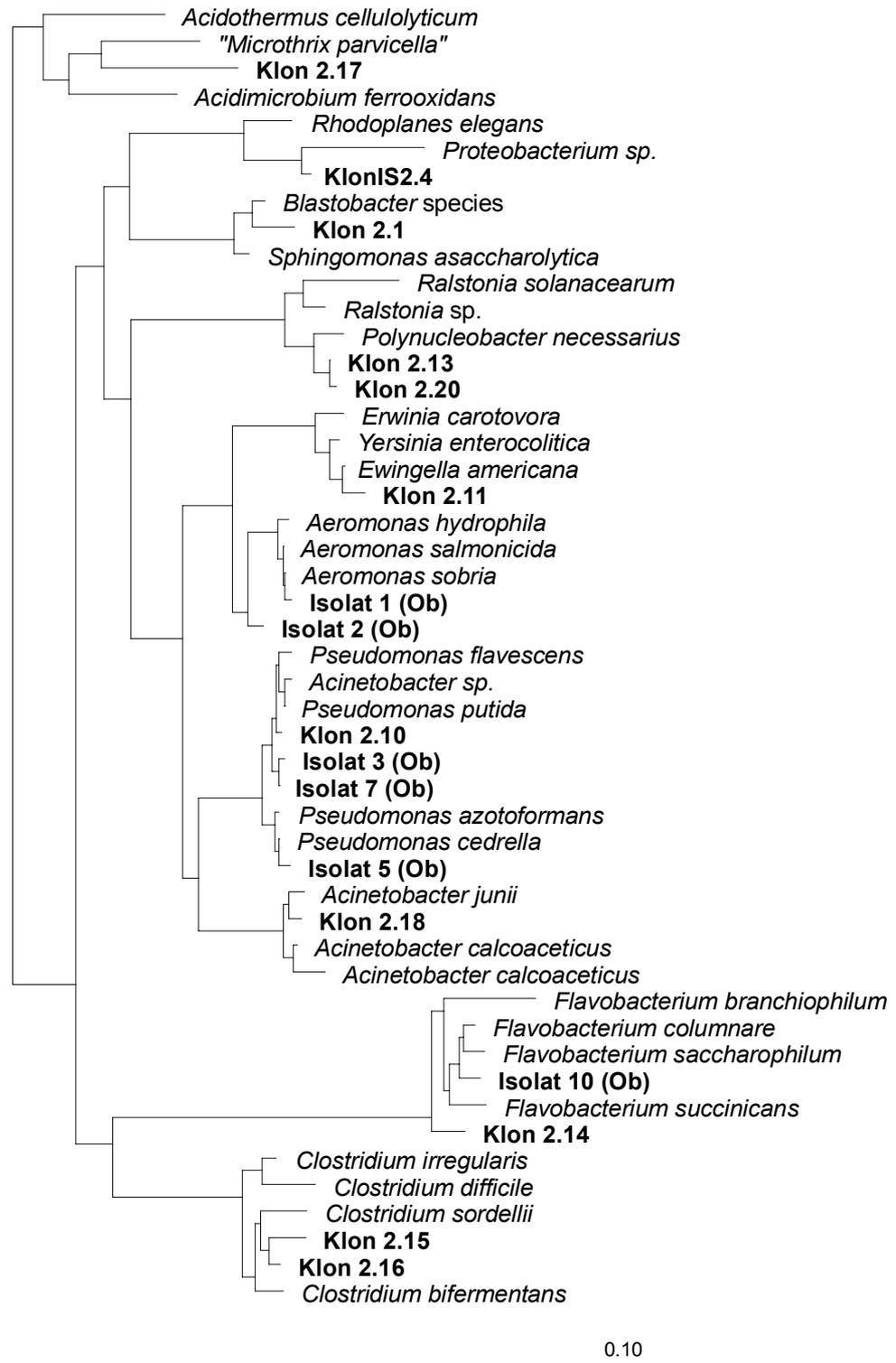


Abbildung 3: Phylogenetische Einordnung von Umweltklonen und Isolaten des unbelasteten Oberflächenwassers.

Das Dendrogramm basiert auf einer „Distance-Matrix“-Analyse und wurde nach dem „Neighbor-Joining“-Algorithmus berechnet. Der Entfernungsmaßstab beträgt 10 kalkulierte Basenaustausche pro 100 Nukleotidsequenzpositionen.

3.2 Wirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf die Struktur und Leistungen mikrobieller Lebensgemeinschaften

Auf mikrobiologische Untersuchungen mit lambda-Cyhalothrin wurden wegen der Spezifität des Wirkmechanismus auf Strukturen und Leistungen, die in Mikroorganismen nicht entwickelt sind, verzichtet.

Die Untersuchung der Wirkung des Fungizids Cyprodinil und des Herbizids Bromoxynil-Octanoat auf Bakterien wurden zuerst mit Hilfe des Standard-Testorganismus *Pseudomonas putida* in Laborkulturen untersucht. Cyprodinil wurde bis zu 6,5 mg/l, der praktischen Grenze der Wasserlöslichkeit, in abgestuften Konzentrationen eingesetzt und bis zu 6 Tagen inkubiert. Bromoxynil-Octanoat wurde bis in den Bereich der Wasserlöslichkeitsgrenze von 0,08 mg/L und einer Inkubationsdauer von 3 Tagen untersucht. In keiner Variante der Testansätze wurden Effekte auf das Elektronen-Transport-System, die Esterase- und die Phosphatase-Aktivität von *P. putida* festgestellt (Tabelle 6). Längere Inkubationszeiten waren in dem verwendeten Testansatz nicht möglich, da die Bakterienkultur die stationäre Wachstumsphase erreicht hatte und Schädigungen durch Nährstoffmangel eintreten konnten.

Tabelle 6: Wirkung von Cyprodinil und Bromoxynil-octanoat auf Summenparameter für mikrobielle Stoffumsetzungen bei *Pseudomonas putida*

Inkubationszeit	Cyprodinil	Bromoxynil-Octanoat	
	6 d	2 d	3 d
	<u>0-6,5 mg/L</u>	<u>0 – 0,08 mg/L</u>	
Elektronen Transport System	kein Effekt	kein Effekt	
Esterase-Aktivität	kein Effekt	kein Effekt	
Phosphatase-Aktivität	kein Effekt	kein Effekt	

So blieb nur die Vergleichsmöglichkeit von potentiellen Wirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf mikrobielle Lebensgemeinschaften in Grund- und Oberflächenwasser. Hier zeigte sich – wie nachfolgend belegt – , dass Stoffumsetzungen der mikrobiellen Lebensgemeinschaften konzentrationsabhängig durch die Testsubstanzen gehemmt werden können.

3.2.1 Cyprodinil

3.2.1.1 Funktionsparameter

In Gegenwart des Fungizids Cyprodinil war eine Reduzierung der ETS- und Esterase-Aktivität bei den Mikroorganismen aus der Oberflächenwasser-Probe nach 6 Tagen feststellbar, die bis zum Ende der Inkubationsdauer von 10 Tagen bestehen blieb. Die Phosphatase-Aktivität in diesen Proben war nicht beeinträchtigt.

In den Grundwasserproben trat eine Hemmung des ETS nach 14 Tagen auf. Eine Hemmung der Phosphatase-Aktivität konnte nach 21-tägiger Inkubation und der Esterase-Aktivität erst nach 28-tägiger Inkubation beobachtet werden.

Die aus den Konzentrations-Wirkungskurven berechneten EC_{50} -Werte sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die chemischen Analysen zeigten, dass die Cyprodinil-Konzentrationen während der Inkubationsversuche stabil blieben. Für die Berechnung der Effekt-Daten wurden die gemessenen Konzentrationen verwendet.

Tabelle 7: Effekt Konzentrationen (EC_{50} -Werte) von Cyprodinil auf Summenparameter für mikrobielle Stoffumsetzungen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften aus Grund- und Oberflächenwasser

Fungizid Cyprodinil		Effekt-Konzentrationen EC_{50} mg/l				
		Grundwasser			Oberflächenwasser	
<i>Inkubationszeit (d)</i>	5	7	14	3	6	10
ETS	kein Effekt	kein Effekt	0,89	kein Effekt	0,27	1,0
<i>Inkubationszeit (d)</i>	14	21	28	3	6	10
Esterase	kein Effekt	kein Effekt	0,4	kein Effekt	1,98	1,2
Phosphatase	kein Effekt.	0,29	0,27	kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt

3.2.1.2 Strukturparameter

Während der dreiwöchigen Inkubation der Grundwasserproben mit Cyprodinil traten nach der RFLP-Analyse (Sehr 2000, Abbildung 4) keine sichtbaren Veränderungen in den mikrobiellen Lebensgemeinschaften auf. Unterschiede in der Stärke der Banden einer Säule resultieren aus unterschiedlichen Mengen an DNA, die auf das Gel aufgetragen wurden. Die DNA-Menge pro Säule lässt sich nur mit großem Aufwand und Probenverbrauch vereinheitlichen. Wichtig für die Interpretation ist das relative Verhältnis der Banden zueinander.

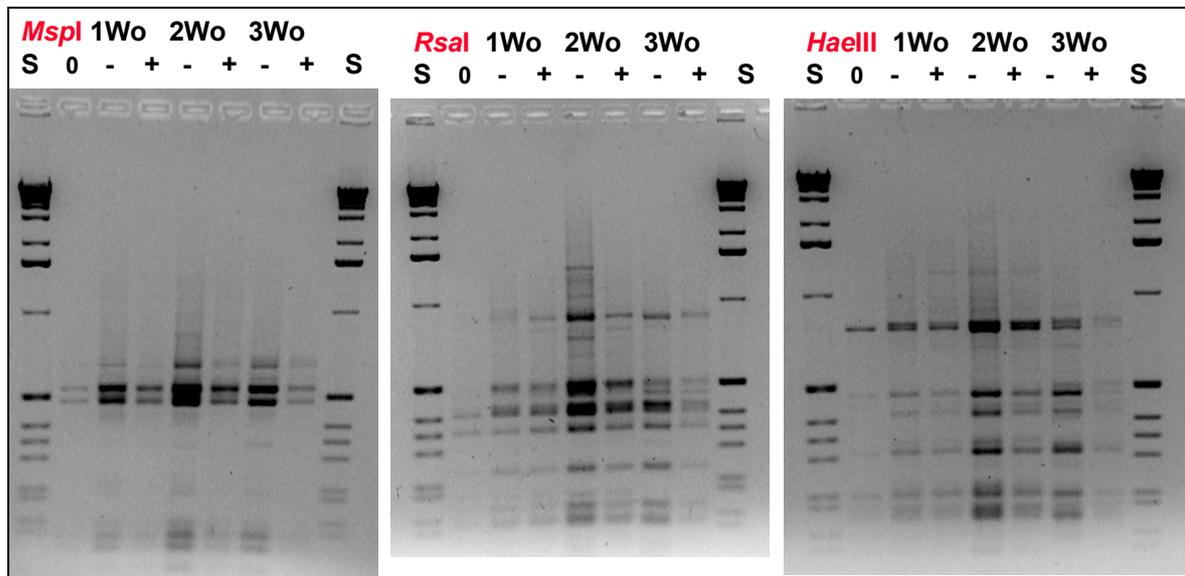


Abbildung 4: RFLP-Analyse der Mikroorganismen im Grundwasser während 3-wöchiger Inkubation mit Cyprodinil (17 mg/L nominal). (S = 1 kb DNA Längenstandard; 0 = nach Probenahme, - = ohne Cyprodinil, + = mit Cyprodinil). Restriktionsenzyme MspI, RsaI und HaeIII)

Auch die 3-wöchige Inkubation der Oberflächenwasserproben mit Cyprodinil bewirkte keine feststellbaren Veränderungen in den RFLP-Mustern (Abbildung 5). Somit konnte mit der RFLP-Methode kein Einfluss des Fungizidwirkstoffes Cyprodinil auf die bakterielle Diversität des Grund- bzw. Oberflächenwassers festgestellt werden.

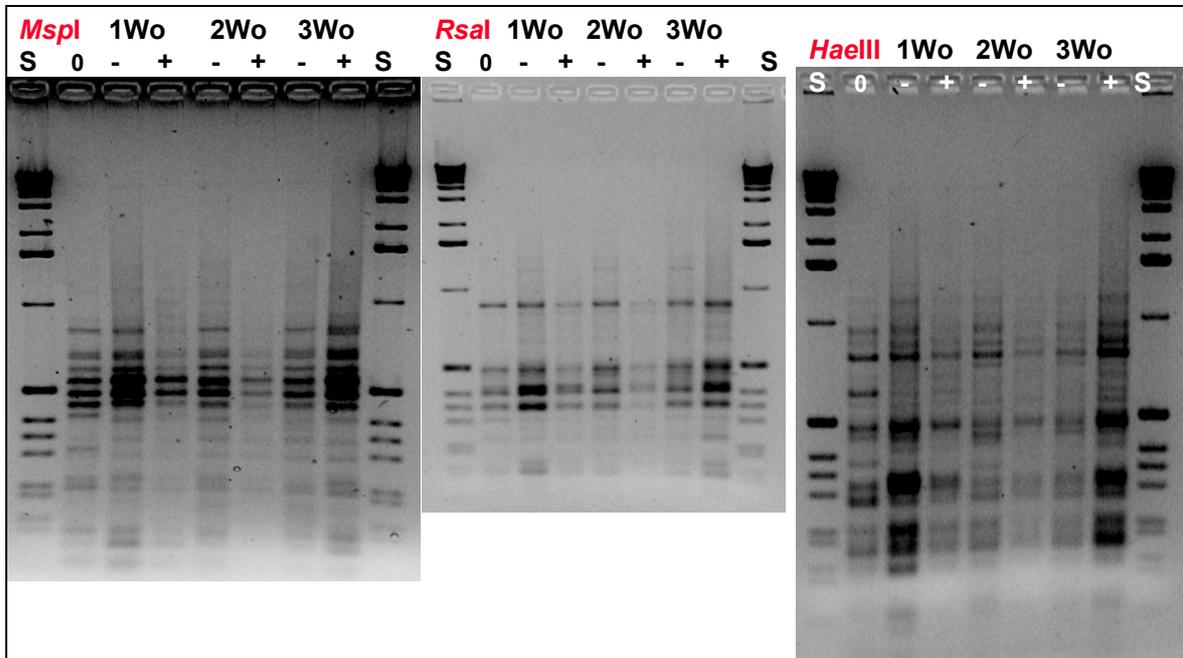


Abbildung 5: RFLP-Analyse der Mikroorganismen im Oberflächenwasser während 3-wöchiger Inkubation mit Cyprodinil (17 mg/L nominal). (S = 1 kb DNA Längenstandard; 0 = nach Probenahme, - = ohne Cyprodinil, + = mit Cyprodinil). Restriktionsenzyme MspI, RsaI und HaeIII)

3.2.2 Bromoxynil-Octanoat

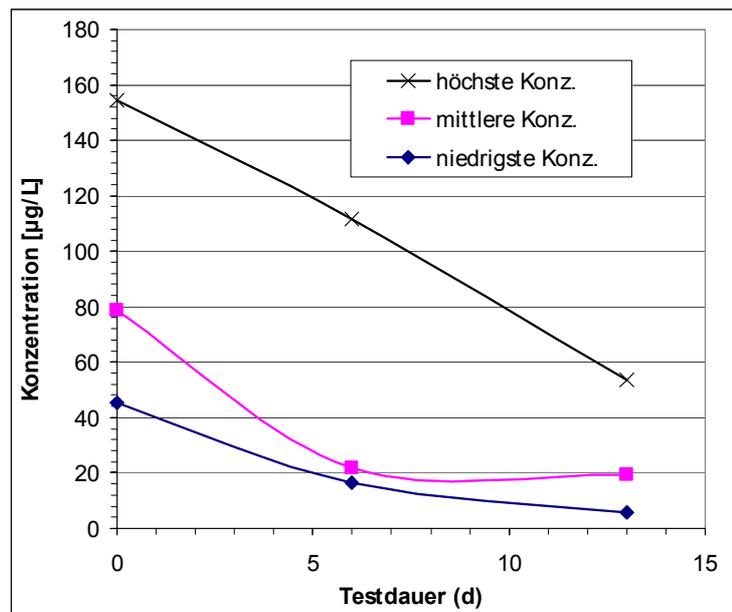
3.2.2.1 Funktionsparameter

Der Herbizidwirkstoff Bromoxynil-Octanoat hatte nur geringfügige Auswirkungen auf die Enzymaktivitäten der untersuchten mikrobiellen Lebensgemeinschaften. In den Proben aus Oberflächenwasser traten bis zu einer Inkubationsdauer von 21 Tagen keine Effekte auf. Die Esterase- und Phosphatase-Aktivität der Mikroorganismen aus Grundwasser wurde bis zum Inkubationsende von 13 Tagen nicht beeinträchtigt. Das Elektronen-Transport-System wurde geringfügig um maximal 30-40 % bei der höchsten Testkonzentration gehemmt, so dass keine EC_{50} -Berechnung möglich war. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 8 zusammengestellt. Im Gegensatz zu Cyprodinil ist Bromoxynil-Octanoat nicht stabil in wässriger Lösung und es war eine Abnahme der Expositionskonzentrationen während der Inkubationsdauer zu beobachten (Abbildung 6). Die angegebenen Effektkonzentrationen beziehen sich auf die gemessenen Ausgangskonzentrationen im Test.

Tabelle 8: Effekt Konzentrationen (EC_{50} -Werte) von Bromoxynil-octanoat auf Summenparameter für Stoffumsetzungen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften aus Grund- und Oberflächenwasser

Herbizid Bromoxynil-octanoat	Effekt Konzentrationen EC ₅₀ mg/l					
		Grundwasser			Oberflächenwasser	
<i>Inkubationszeit (d)</i>	5	7	13	3	6	21
ETS	kein Effekt	>133	>104			keine Effekte
<i>Inkubationszeit (d)</i>	14	21	28	3	6	10
Esterase		keine Effekte			keine Effekte	
Phosphatase		keine Effekte			keine Effekte	

Abbildung 6:
Typischer Verlauf der Bromoxynil-Octanoat Konzentrationen während eines Inkubationsversuches



3.2.2.2 Strukturparameter

Da die RFLP-Methode bei Cyprodinil sich als wenig aussagekräftig erwiesen hatte, wurde zur Ermittlung potentieller struktureller Wirkungen von Bromoxynil-Octanoat die quantitativ aussagende T-RFLP-Methode angewandt.

Bei der T-RFLP wird bei der Behandlung der rDNA mit Restriktionsenzymen nur das terminale Restriktionsfragment mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, so dass für jeden Organismus bzw. Organismengruppe nur 1 Fragment typischer Länge entsteht. Die Fluoreszenz-markierten Fragmente werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und diese anhand der in jeder Probe mitlaufenden Größenstandards berechnet. Durch die Reduzierung der Fragmente und die hohe Trennschärfe können im Gegensatz zu der RFLP charakteristische Banden leichter identifiziert werden.

Reproduzierbarkeit

Zur Überprüfung der Eignung dieser Methode für Untersuchungen von Mikroorganismenpopulationen aus Gewässern wurde durch mehrmaliges Aufarbeiten einer Probe (Mikrokosmos-Wasser) die Reproduzierbarkeit der DNA-Isolierung, des Restriktionsverdau und der Messung überprüft. Abbildung 7 zeigt als typisches Beispiel die Fragment-Muster nach MSPI Verdau der unabhängig aufgearbeiteten Gewässerproben, die gut übereinstimmen.

Inkubationsversuche

In Inkubationsversuchen wurde der Einfluss von Bromoxynil-Octanoat auf die Diversität der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in einer Grundwasserprobe untersucht. Die Wasserproben wurden bei Inkubationsstart mit 40 oder 80 µg/l Testsubstanz versetzt und nach 7 und 14 Tagen untersucht. Pro Testsubstanzkonzentration wurden 2 Parallelen angesetzt. Für jeden Zeitpunkt wurden separate Kolben angesetzt.

Während der Inkubation scheinen sich die Lebensgemeinschaften in den separaten Kolben teilweise unterschiedlich zu entwickeln, wobei der Unterschied nach Verdau mit dem Restriktionsenzym HAE-I zwischen den Parallelansätzen nach 7 Tagen stärker ausgeprägt war (Abbildung 8) als nach 14 Tagen. Nach insgesamt 14 Tagen Inkubation glichen sich die Muster wieder stärker an, besonders gut bei den Kontrollen (Abbildung 9, 29B und 30B) und den 80 µg/l Proben zu beobachten (Abbildung 9, 31B und 33B), dagegen blieben bei den 40 µg/l Proben die Probenzusammensetzung unterschiedlich. Ein Vergleich der mit 80 µg/l Bromoxynil behandelten Proben mit den Kontrollkulturen deutet auf relativ geringfügige Veränderungen hin, so ist nur die Bande bei ca. 310 kb in den behandelten Proben fast verschwunden.

Deutlichere Auswirkungen auf die mikrobiellen Lebensgemeinschaften der Grundwasserproben waren nach Verdau mit dem Restriktionsenzym RSA-I in den Bromoxynil-behandelten Proben zu beobachten (Abbildung 10). In diesen Proben nahm im Vergleich zu den Kontrollkulturen der relative Anteil des Fragmentes 470 kb stark und des Fragmentes mit ca. 300 kb etwas zu. Allerdings sind auch hier Unterschiede in den Parallelansätzen zu beobachten, wodurch weitere Untersuchungen zur Absicherung dieser Aussage notwendig wären.

Eine Zuordnung von einzelnen terminalen Restriktionsfragmenten zu phylogenetischen Informationen ist zur Zeit nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich. Hierfür müssten mehr Informationen über die charakteristischen terminalen Restriktionsfragmente von umweltrelevanten Mikroorganismen vorliegen, die durch Klonbibliotheken erstellt werden könnten.

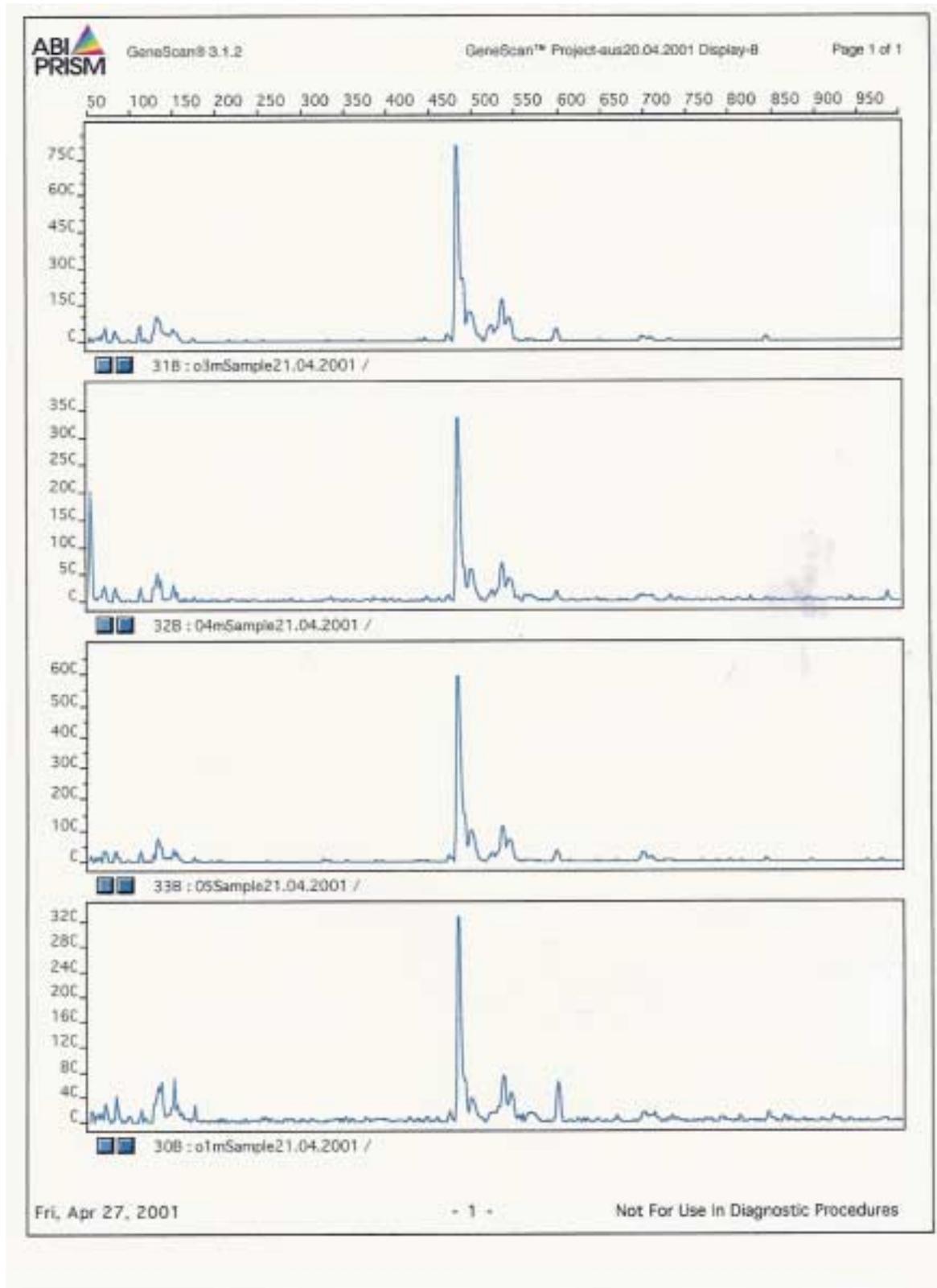


Abbildung 7: T-RFLP Fragment-Muster nach MSPI Verdau von 4 unabhängigen Aufarbeitungen einer Gewässerprobe.
 X-Achse: Größe in Basenpaaren (bp), Y-Achse: Fluoreszenzstärke.

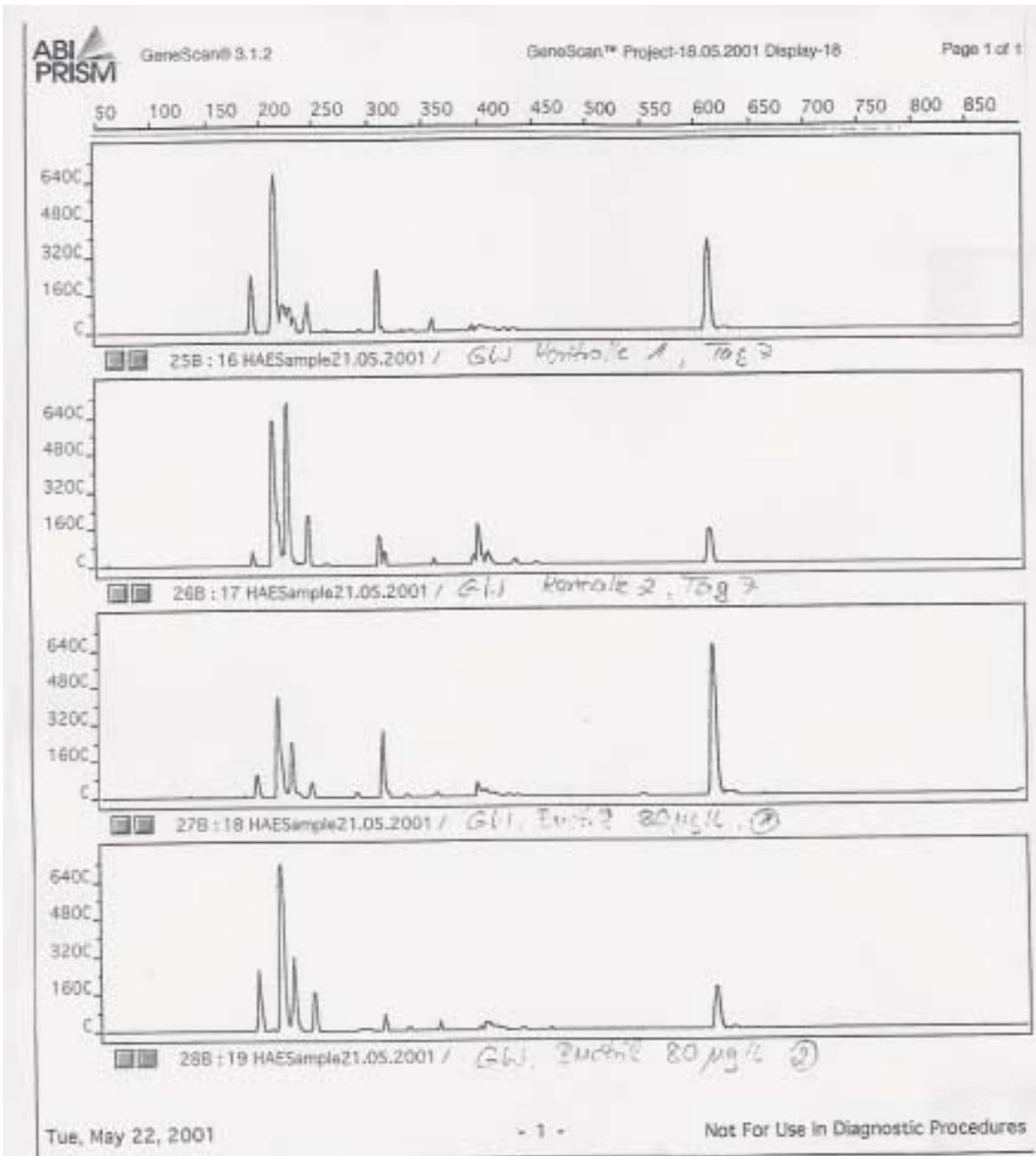


Abbildung 8: T-RFLP Fragment-Muster nach HAE III Verdau von Grundwasserproben (GW) nach 7tägiger Inkubation mit 80 µg/L Bromoxynil-Octanoat (Buctril).

X-Achse: Größe in Basenpaaren (bp), Y-Achse: Fluoreszenzstärke.

25B – GW, Kontrolle 1, Tag 7

26B - GW, Kontrolle 2, Tag 7

27B - GW, 80 µg/L Buctril 1, Tag 7

28B - GW, 80 µg/L Buctril 2, Tag 7

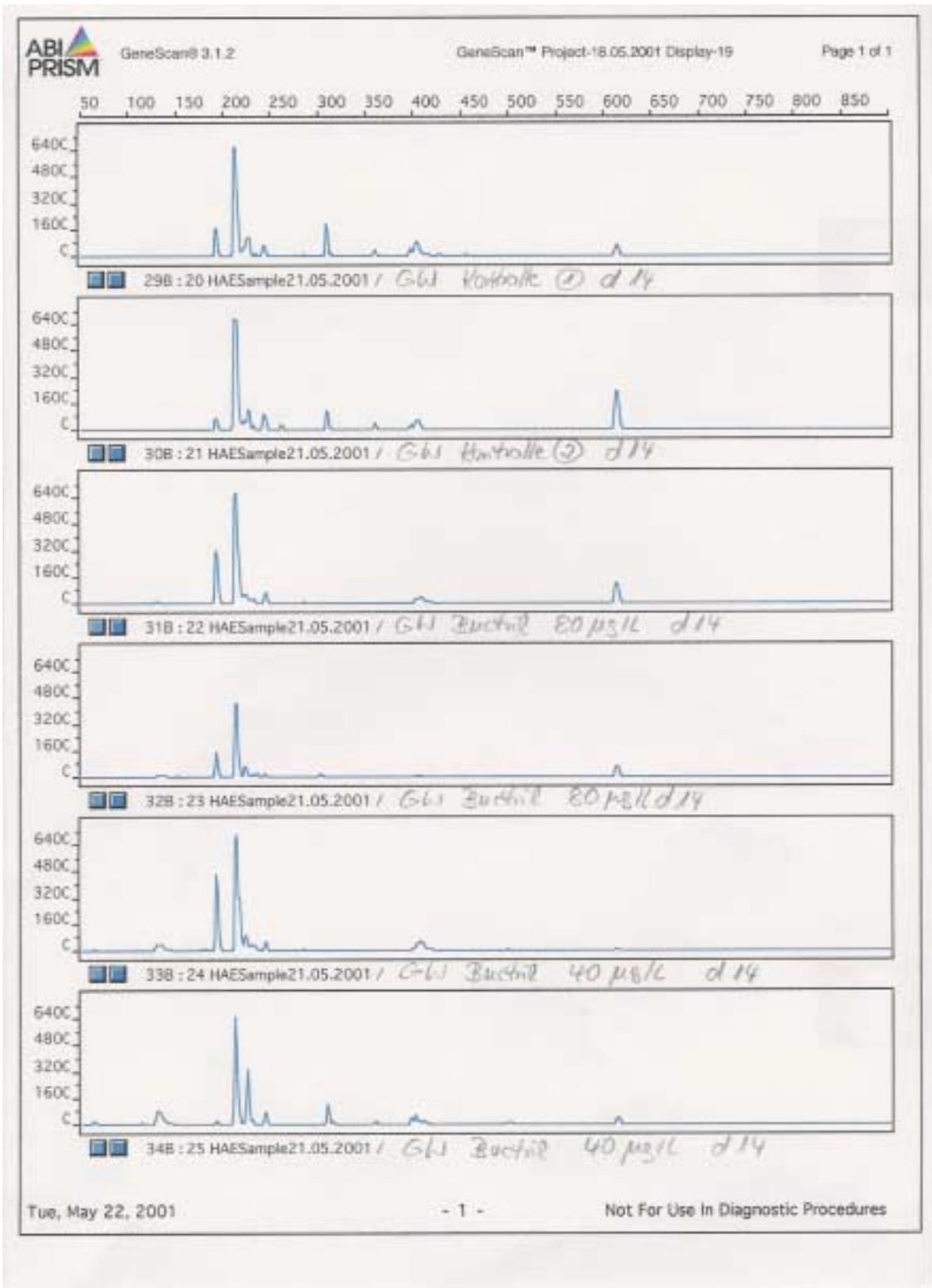


Abbildung 9: T-RFLP Fragment-Muster nach HAE III Verdau von Grundwasserproben (GW) nach 14-tägiger Inkubation mit 40 bzw. 80 µg/L Bromoxynil-Octanoat (Buctril).

X-Achse: Größe in Basenpaaren (bp), Y-Achse: Fluoreszenzstärke.

29B – GW, Kontrolle 1, Tag 14

30B - GW, Kontrolle 2, Tag 14

31B - GW, 80 µg/L Buctril 1, Tag 14

32B - GW, 80 µg/L Buctril 2, Tag 14

33B - GW, 40 µg/L Buctril 1, Tag 14

34B - GW, 40 µg/L Buctril 2, Tag 14

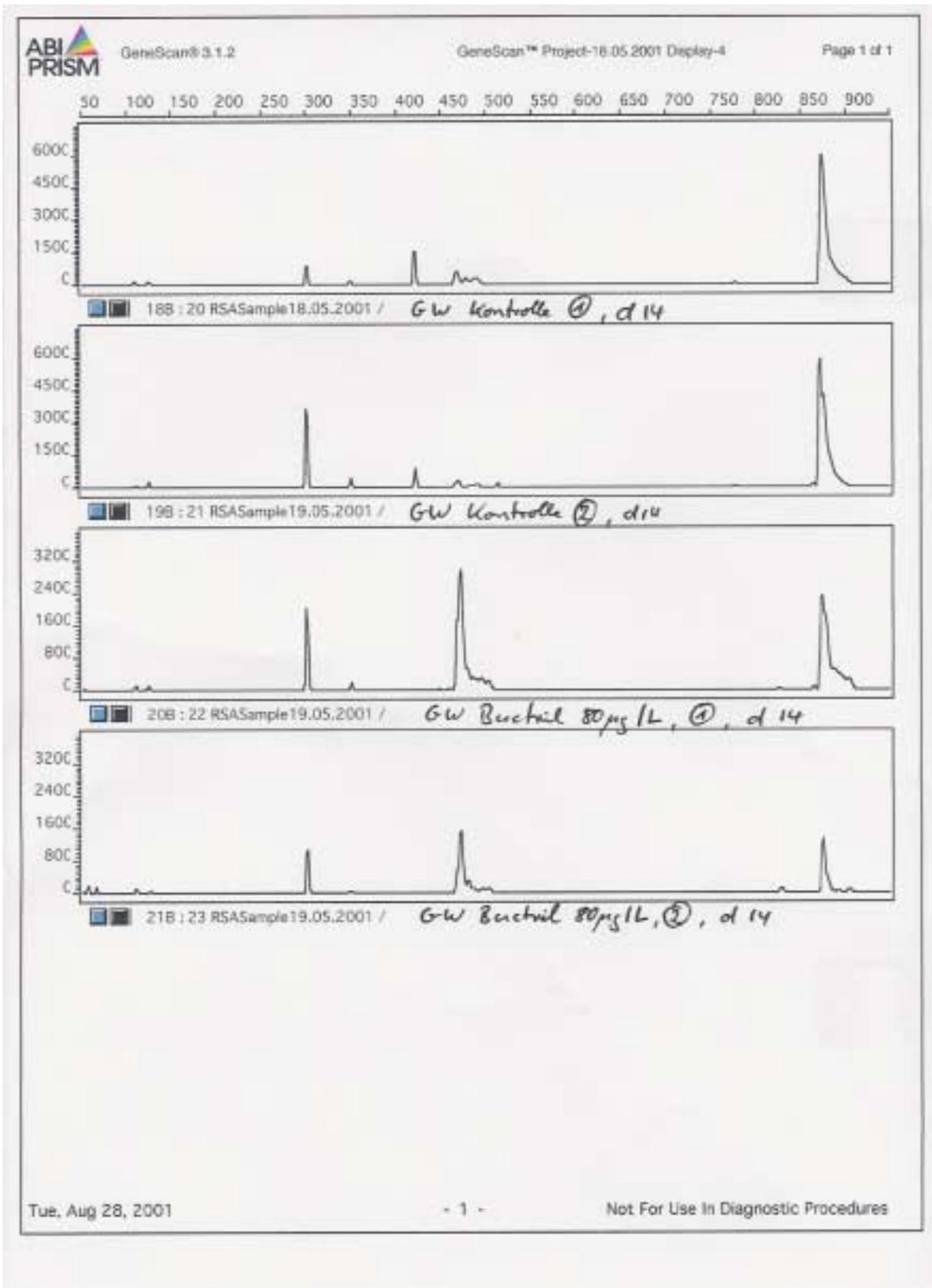


Abbildung 10: T-RFLP Fragment-Muster nach RSA I Verdau von Grundwasserproben (GW) nach 14-tägiger Inkubation mit 80 µg/L Bromoxynil-Octanoat (Buctril). X-Achse: Größe in Basenpaaren (bp), Y-Achse: Fluoreszenzstärke

3.3 Wirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Grundwasser-Arthropoden

3.3.1 Cyprodinil

Die Testkonzentrationen von Cyprodinil waren über den gesamten Versuchszeitraum konstant; in einigen Versuchsgefäßen, bei denen die Abdeckung nicht ausreichend dichtete, war sie, offensichtlich in Folge von Verdunstung des Verdünnungswassers, bei Versuchsende sogar höher als die Nominalkonzentration. Der vorgenommene Bezug auf Nominalkonzentrationen stellt daher bei verlängerten Versuchsdauern tendenziell eine worst case – Betrachtung im Sinne des Vorsorgeprinzips dar.

Versuchsdauern von der Länge akuter Standardtests mit Krebsen aus einer grob vergleichbaren taxonomischen Großgruppierung führten zu LC50-Werten, die um eine (Niederer Krebs) bzw. mehr als zwei (Höherer Krebs) Größenordnungen höher lagen, als die für die entsprechenden Standardarten (Tabelle 9). Nach zehnfach längerer Exposition wurde der Vergleichswert der Arten aus Oberflächengewässern noch immer nicht erreicht. Für den Harpacticoiden *Chappuisius inopinus* lag er sehr ähnlich, während er für den Amphipoden *Niphargus fontanus* noch immer um zwei Größenordnungen höher bestimmt wurde. Der Verlauf der Effektkonzentrationen über die Zeit der Exposition (Abbildung 11, Abbildung 12) zeigte für beide Arten schlüssige Ergebnisse, die auf eine mehr oder weniger konstante Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung hin deuten. In beiden Fällen lag selbst die LC10 nach verlängerter Versuchsdauer noch über dem akuten LC50- bzw. EC50-Wert des zum Vergleich herangezogenen Oberflächenwasserorganismus. Die Ausprägung der letalen Wirkung vollzog sich im Wesentlichen innerhalb von 14 Tagen (*Niphargus fontanus*) bzw. 6 Tagen (*Chappuisius inopinus*) und damit innerhalb eines Zeitraums von der drei- bis vierfachen Dauer eines Standardtests.

Da von den anderen Grundwasserarten nur begrenzte Individuenzahlen zur Verfügung standen, wurde auf Grund der sich andeutenden vergleichsweise geringeren Toxizität auf die Testung weiterer Arten mit Cyprodinil zugunsten zusätzlicher Tests mit den anderen Substanzen verzichtet.

Tabelle 9: LC50-Werte von Cyprodinil gegenüber Krebsen aus Grundwasser und Oberflächengewässern.

	<i>Niphargus fontanus</i> (Höherer Krebs)	<i>Chappuisius inopinus</i> (Niederer Krebs)
LC50 akut	2430 µg/l	1320 µg/l
LC50 verlängert	940 µg/l	170 µg/l
Standardorganismus LC50, EC50 akut	8,1 µg/l*	100 µg/l**

* LC50 nach 96 h gegenüber *Mysidopsis bahia* (Boeri et al. 1995); ** EC50 nach 48 h gegenüber *Daphnia magna* (The Pesticide Manual, 10th edition)

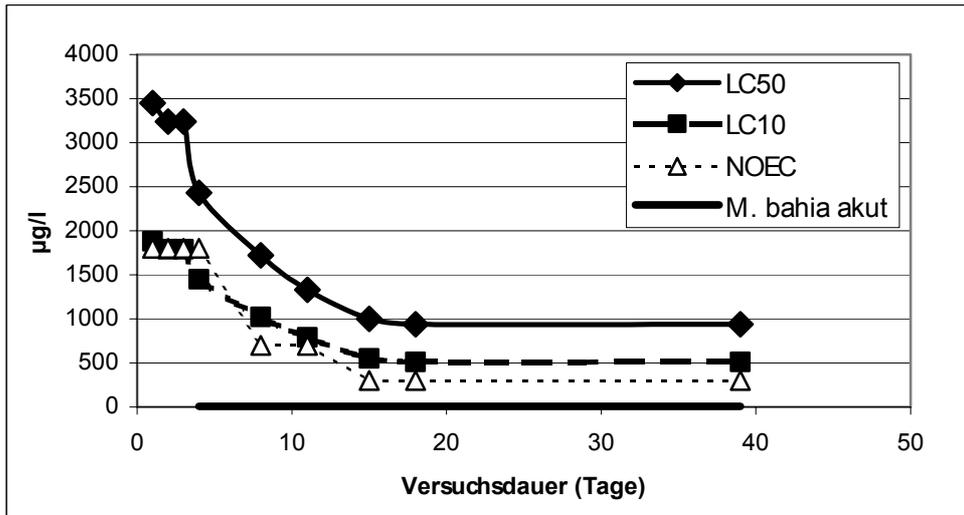


Abbildung 11: Effektkonzentrationen von Cyprodinil gegenüber *Niphargus fontanus*. Die LC50 nach 96 h im Standardtest mit *Mysidopsis bahia* ist als fette durchgängige Linie eingezeichnet.

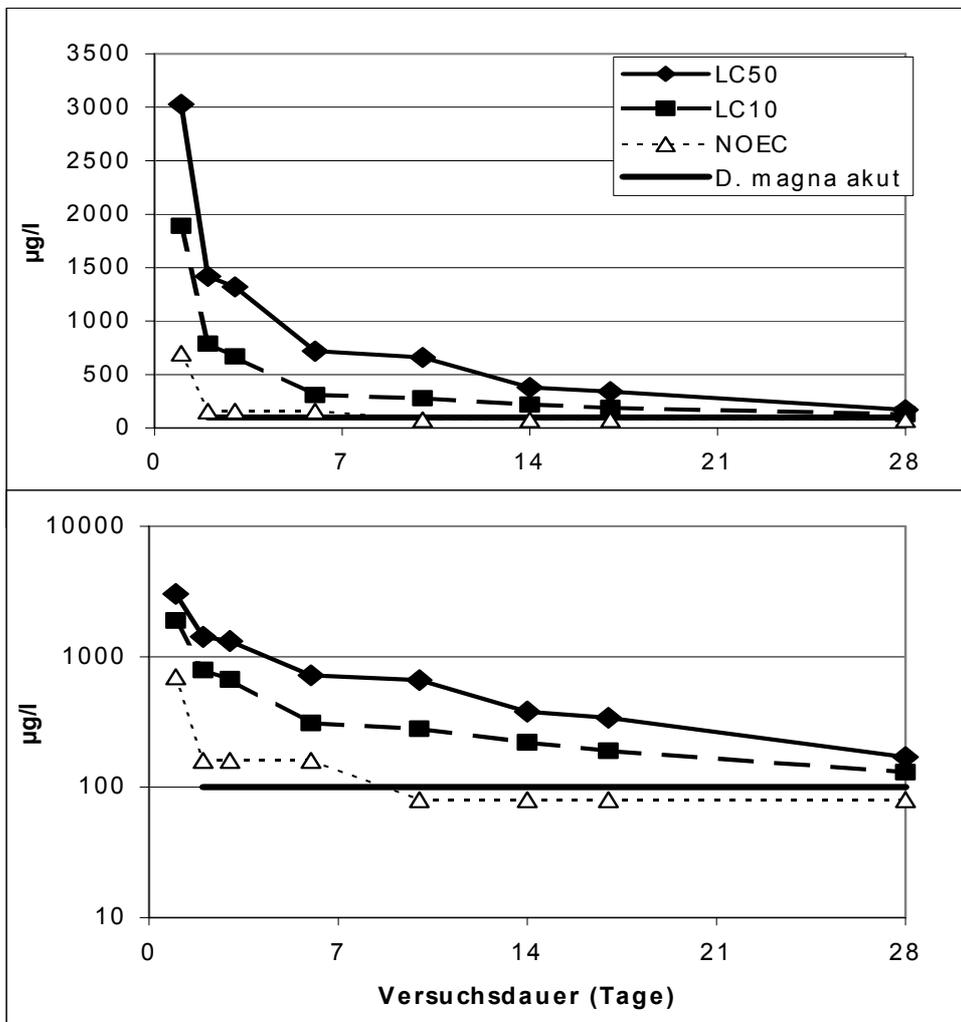


Abbildung 12: Effektkonzentrationen von Cyprodinil gegenüber *Chappuisius inopinus*. Die LC50 nach 48 h im Standardtest mit *Daphnia magna* ist als fette durchgängige Linie eingezeichnet. Oben: Linear Skala; unten: Logarithmische Skala.

3.3.2 *Lambda-Cyhalothrin*

Für lambda-Cyhalothrin lag eine große Vergleichsdatenbasis zu Invertebraten aus Oberflächengewässern vor (Maud et al. 1998). Deshalb wurde für diesen Wirkstoff die größtmögliche Anzahl von Grundwasserarten getestet. Mit sechs Arthropodenarten wurden auswertbare Toxizitätswerte nach akuter und verlängerter Exposition gewonnen (Tabelle).

Die Konzentrationsmessungen ergaben teilweise stark variierende Ergebnisse. Die Mittelwerte pro Konzentration und Vergleiche zwischen den Konzentrationen ergaben jedoch für die ausgewerteten Versuche konsistente Ergebnisse. Wenn sich Konzentrationen der Testlösung verringerten, geschah dies offensichtlich vor allem innerhalb des ersten Tages des Versuchs aufgrund der adsorptiven Eigenschaften der Testsubstanz. Außerdem bildete sich zu etwa 50 % das andere Enantiomer. Beide Enantiomere wurden zur Ermittlung der Effektkonzentrationen addiert. Im späteren Versuchsverlauf blieben diese Konzentrationen weitgehend konstant, was wohl auf die geringen Temperaturen zurückzuführen ist. Versuche mit Höheren Krebsen in größeren Volumina der Testkonzentration fanden bei mittleren gemessenen Konzentrationen statt, die zwischen 63 und 83 % der Initialkonzentrationen betragen. Für *Niphargus fontanus* lagen die beiden höheren Konzentrationen um etwa 70 % der Nominalkonzentrationen, während die niedrigen Konzentrationen mit über 80 % der Nominalkonzentrationen gemessen wurden. Für *Antrobathynella stammeri* lagen alle mittleren gemessenen Konzentrationen zwischen 80 und 100 % der Nominalwerte, da diese initial um 20 - 30% überschritten wurden.

Die Versuche mit den anderen Arthropoden fanden in kleineren Gefäßen mit größeren Verhältnissen zwischen Oberfläche und Testsubstanzvolumen statt. Die mittleren gemessenen Konzentrationen lagen sämtlich zwischen 32 und 37 % der Nominalwerte. Im Mittel lagen alle Konzentrationen am ersten Versuchstag bei 36 % und bei Versuchsauflösung bei 35 % der Nominalkonzentrationen.

Die Beobachtung der Mortalität erwies sich für einige der getesteten Organismen als sehr problematisch. So enzystierten sich Rotatorien und Planarien zogen sich derart zusammen, dass ihre Identifizierung und Zählung sich als unmöglich darstellte. Ostracoden schlossen ihre Schalen, um sich vor dem Einfluss der Testsubstanz zu schützen. Erst nach einigen Tagen öffneten sie die Schalen wieder. Organismen aller Crustaceenarten zeigten häufig substanzbedingte Verlangsamungen des Verhaltens, die jedoch graduell und damit schwierig zu quantifizieren waren. Im Versuchsverlauf starben derart beeinträchtigte Organismen zumeist; einige erholten sich jedoch zu nicht mehr von Kontrolltieren zu unterscheidender Aktivität. Deshalb wurde ausschließlich der Bezug zur letalen Wirkung hergestellt. Aufgrund der schwierigen Expositionsverhältnisse und sehr unklarer Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen oder zu hoher Kontrollsterblichkeiten mussten einige Tests mehrmals wiederholt werden. Dies hatte eine Reduktion verfügbarer Organismen einiger Arten zur Folge, die sich in geringen Zahlen in späteren Tests niederschlug. Der Grundwasser-Cyclopid *Diacyclops languidoides* konnte beispielsweise nicht weiter getestet werden. Tabelle zeigt den vergleichenden Überblick über die LC50 Werte aus den auswertbaren Versuchen nach Versuchsdauern von der Länge akuter Standardtests, sowie

5-10fach verlängerter Expositionsdauern. Diesen Daten sind die akuten LC50-Werte von Arthropoden aus jeweils grob vergleichbaren taxonomischen Großgruppierungen gegenübergestellt.

Tabelle 10: LC50-Werte von lambda-Cyhalothrin gegenüber Arthropoden aus Grundwasser (Daten im Rahmen des Vorhabens erhoben) und Oberflächengewässern (Maund et al. 1998).

Einheit: ng/l	Höhere Krebse		Niedere Krebse		
	<i>Niphargus fontanus</i> (Amphipoda)	<i>Antrobathynella stammeri</i> (Syncarida)	Copepoda, Harpacticoida <i>Chappuisius inopinus</i> ¹	<i>Phyllognathopus vigueri</i> ²	<i>Pseudocandona zschokkei</i> (Ostracoda)
LC50 akut	595	300	622-1050	1230	1811; 4245 ³
LC50 verlängert	124	42	287-548	85	15
Vergleichsorganismus	<i>Hyaella</i> (Amphipoda)	<i>Asellus</i> (Isopoda)	<i>Daphnia</i> (Phyllopoda)	<i>Cyclops</i> (Copepoda)	Ostracoda
LC50 akut	2,3	26	360	300	3300

- Fortsetzung -

¹ verschiedene Bezugskonzentrationen; ² Copepodite; ³ Tag 2; 6

Einheit: ng/l	Acari
LC50 akut	277 ng/l
LC50 verlängert	106 ng/l
Vergleichsorganismus	Hydracarina
LC50 akut	47 ng/l

Niphargus fontanus (Abbildung 13, Abbildung 14) erwies sich in den Tests mit vergleichbarer Expositionsdauer um den Faktor 40-250 unempfindlicher als Amphipoden aus Oberflächengewässern. Zu *Asellus*, einem weiteren Höheren Krebs aus Oberflächengewässern, betrug der Abstand noch das 20fache (Tabelle). Nach neunfach längerer Exposition war die Grundwasserart immer noch um den Faktor 5-50 unempfindlicher als die verglichenen Höheren Krebse aus Oberflächengewässern.

Der zweite getestete Höhere Krebs aus dem Grundwasser, der Brunnenkreb *Antrobathynella stammeri*, erwies sich nach vergleichbarer Expositionsdauer um eine Größenordnung unempfindlicher als der Isopode *Asellus*, der unempfindlichste Höhere Krebs aus Oberflächengewässern (Abbildung 15, Abbildung 16). Nach fünffach längerer Exposition betrug der Abstand noch Faktor 2.

Beide Höheren Krebse benötigen etwa 9-10 Tage zur vollen Ausprägung der toxischen Wirkung (Abbildung 13, Abbildung 15); bei längerer Exposition scheint die Empfindlichkeit nicht weiter zuzunehmen.

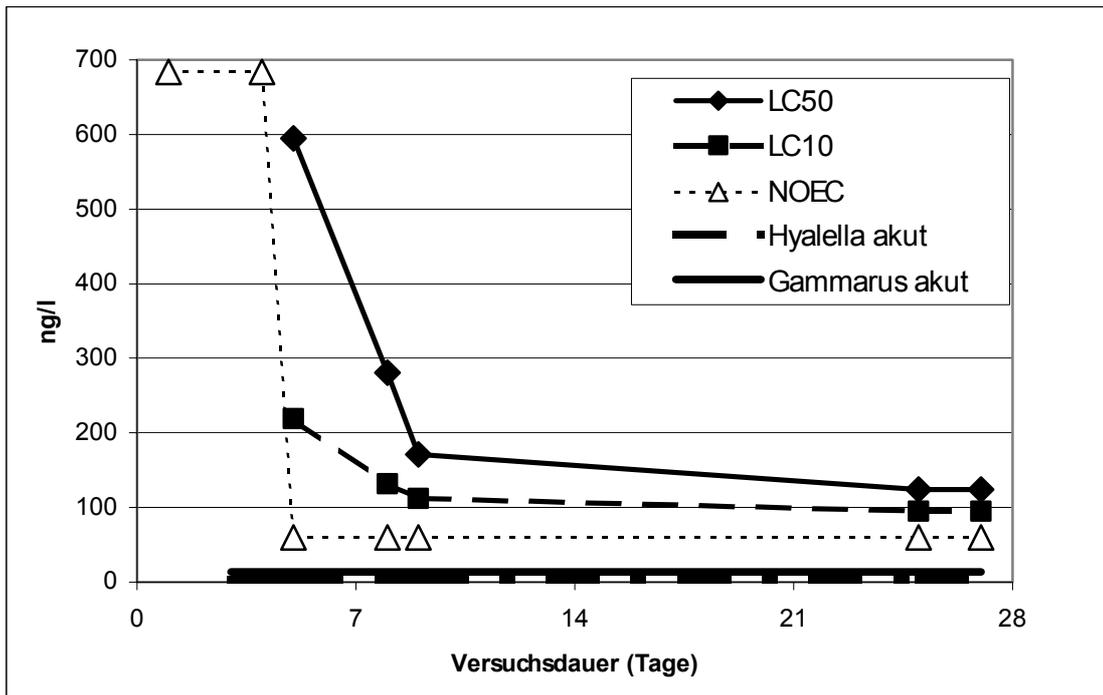


Abbildung 13: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber *Niphargus fontanus* (Amphipoda).

Die akute LC50 in Studien mit *Hyalella azteca* und *Gammarus pulex* sind zum Vergleich als durchgängige Linien eingezeichnet..

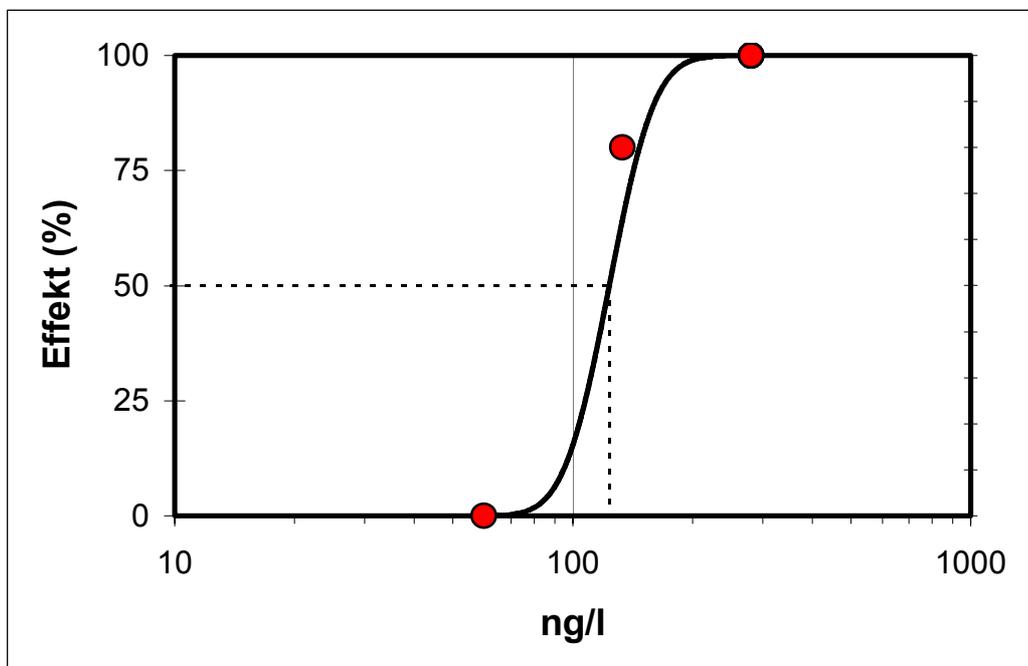


Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber *Niphargus fontanus* (Amphipoda) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 27 Tagen

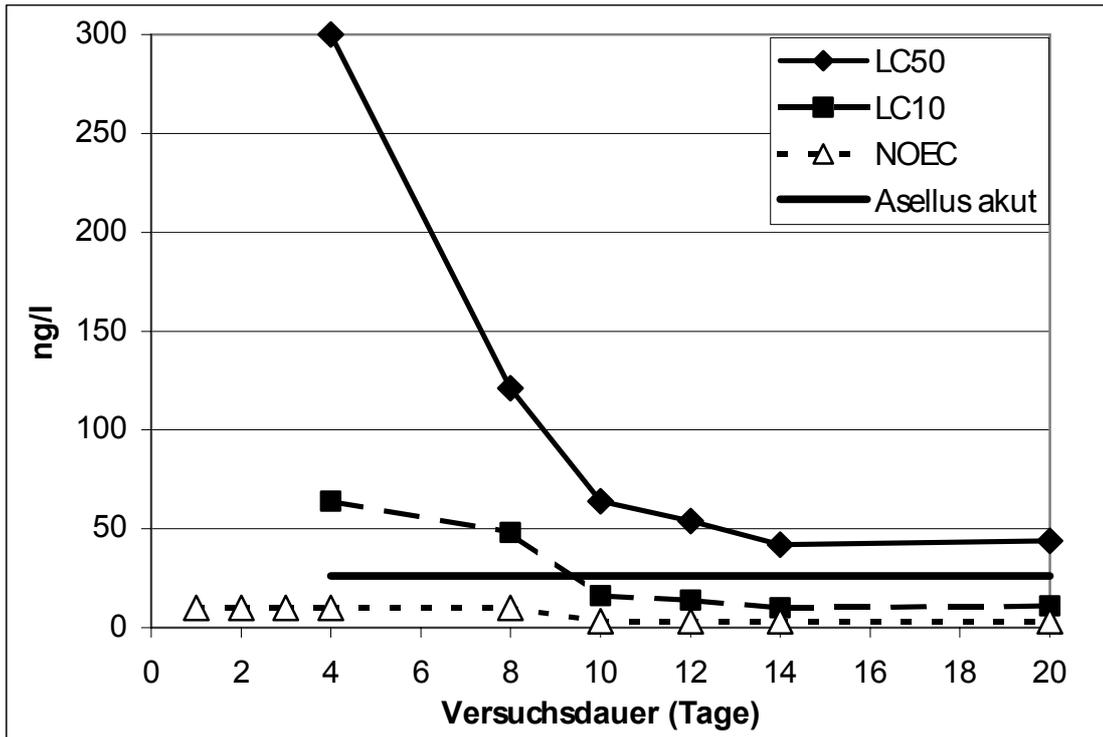


Abbildung 15: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber *Antrobathynella stammeri* (Syncarida). Die akute LC50 in Studien mit *Asellus* (Isopoda) ist zum Vergleich als durchgängige Linie eingezeichnet.

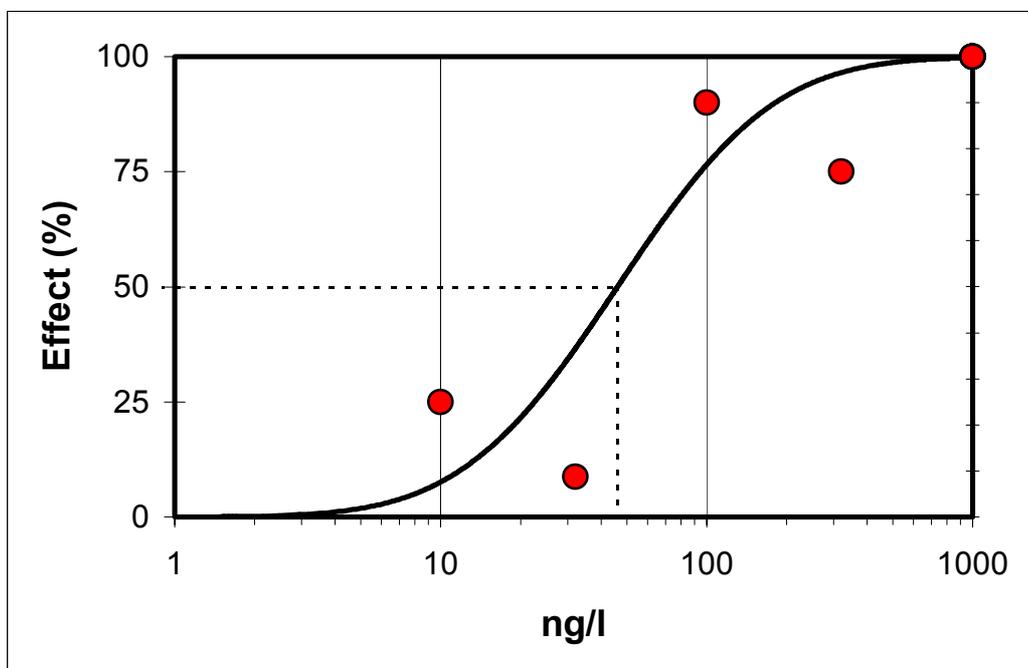


Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber *Antrobathynella stammeri* (Syncarida) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 20 Tagen.

Die Grundwasser-Copepoden *Chappuisius inopinus* (Abbildung 17, Abbildung 18) und *Phyllognathopus vigueri* (Abbildung 19, Abbildung 20) zeigen im Vergleich zu den Höheren Krebsen andere Reaktionsmuster auf lambda-Cyhalothrin: Bei vergleichbarer Expositionsdauer waren sie nur um den Faktor 2-4 unempfindlicher als die zum Vergleich herangezogenen Niederen Krebse aus Oberflächengewässern, die sehr ähnlich empfindlichen *Daphnia* als Phyllopoide und *Cyclops* als Copepode (Tabelle). Bis zum Versuchsende nahm bei beiden Grundwasser-Copepoden die Empfindlichkeit ständig zu und erreichte nach etwa 14 Tagen (7fache Expositionsdauer) den Wert der Akutstudien mit den verglichenen Oberflächengewässerorganismen (Abbildung 17, Abbildung 19). Bei Versuchsabbruch wegen zu hoher Kontrollsterblichkeiten nach 17 Tagen (8-9fache Expositionsdauer) lag die Empfindlichkeit für *Chappuisius inopinus* bei Annahme der höheren Empfindlichkeit² noch im Bereich der Empfindlichkeit der Oberflächengewässerorganismen. *Phyllognathopus vigueri* hingegen zeigte bei Versuchsabbruch wegen zu hoher Kontrollsterblichkeiten nach 20 Tagen (10fache Expositionsdauer) eine um den Faktor 3-4 höhere Empfindlichkeit als die beiden verglichenen Oberflächengewässerorganismen. Allerdings wurden in diesem Versuch Copepodite getestet, die nach Mösslacher & Notenboom (1998) empfindlicher sein können als Adultstadien.

Der Ostracode *Pseudocandona zschokkei* weist wiederum ein anderes charakteristisches Antwortmuster auf (Abbildung 21, Abbildung 22): Während der Kurzzeit-Exposition ist er der unempfindlichste Vertreter der getesteten Grundwasser-Organismen und liegt sehr gut vergleichbar mit dem Vertreter der Ostracoda aus Oberflächengewässern, der innerhalb der verglichenen Artengruppe dort ebenfalls der unempfindlichste Organismus ist (Tabelle). Ostracoda reagieren auf Stressoren mit dem schnellen Schluss der Körperschalen und einer Herabsetzung der Stoffwechselaktivitäten, was sie vor einer Erhöhung der körperinternen Exposition schützt. Nach spätestens einer Woche jedoch öffneten die Testorganismen die Schalen wieder und kompensierten vermutlich die durch die erzwungene Ruhephase hervorgerufenen metabolischen Engpässe durch erhöhte Atmungs- und Stoffwechselaktivität: Die Empfindlichkeit nahm dramatisch zu (Faktor 200). Da die akute Expositionsdauer für die Oberflächengewässer-Ostracoden wahrscheinlich zu kurz war, um einen vergleichbaren Effekt feststellen zu können, ist eine Gegenüberstellung mit verlängerten Toxizitätswerten im Grundwasser in diesem Falle möglicherweise wenig sinnvoll.

² Im von den Kontrollkriterien betrachtet validen Test mit *Chappuisius inopinus* wurde außer der Bestimmung der Initialkonzentrationen keine weitere Konzentrationsüberprüfung mehr vorgenommen, da durch die gleichzeitige Prüfung von *Niphargus fontanus* die Zahl der Testgefäße und die räumliche Kapazität der Kühleinrichtung begrenzt war. So wurde zum Einen die Konzentration analog zu den für *N. fontanus* bestimmten Konzentrationen in den mitgeführten zusätzlichen Testgefäßen angenommen (LC50b in Abbildung 17). Da die für *C. inopinus* verwendeten Testgefäße aber über ein anderes Oberflächen/ Volumen-Verhältnis verfügen als die größeren Testgefäße für *N. fontanus*, wurde zum Anderen Bezug auf abschließende Messungen in kleineren Gefäßen bei späteren Versuchen mit weiteren Spezies genommen, die zu untereinander sehr ähnlichen Ergebnissen führten (LC50a in Abbildung 17).

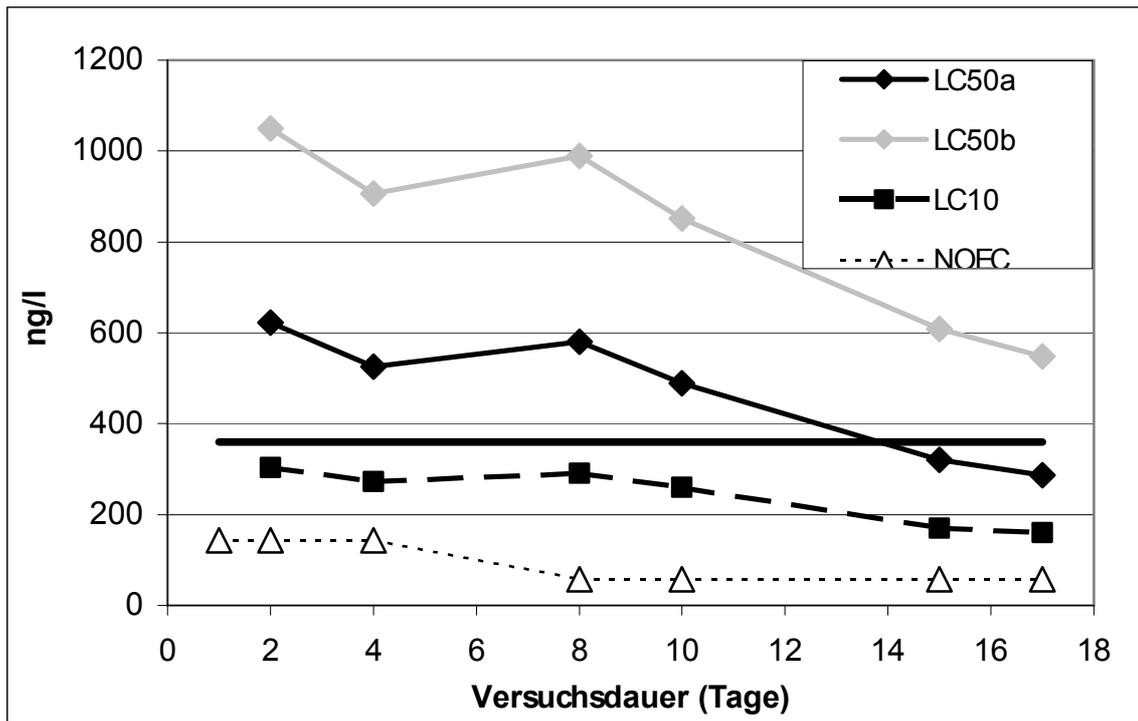


Abbildung 17: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber *Chappuisius inopinus* (Copepoda).
 Grau: basierend auf gleichzeitigen Konzentrationsmessungen für *Niphargus*, schwarz: basierend auf den späteren Messungen für die anderen Organismen in kleinen Gefäßen. Die akute LC50 in Studien mit *Daphnia magna* (Phyllopora) ist zum Vergleich als durchgängige Linie eingezeichnet.

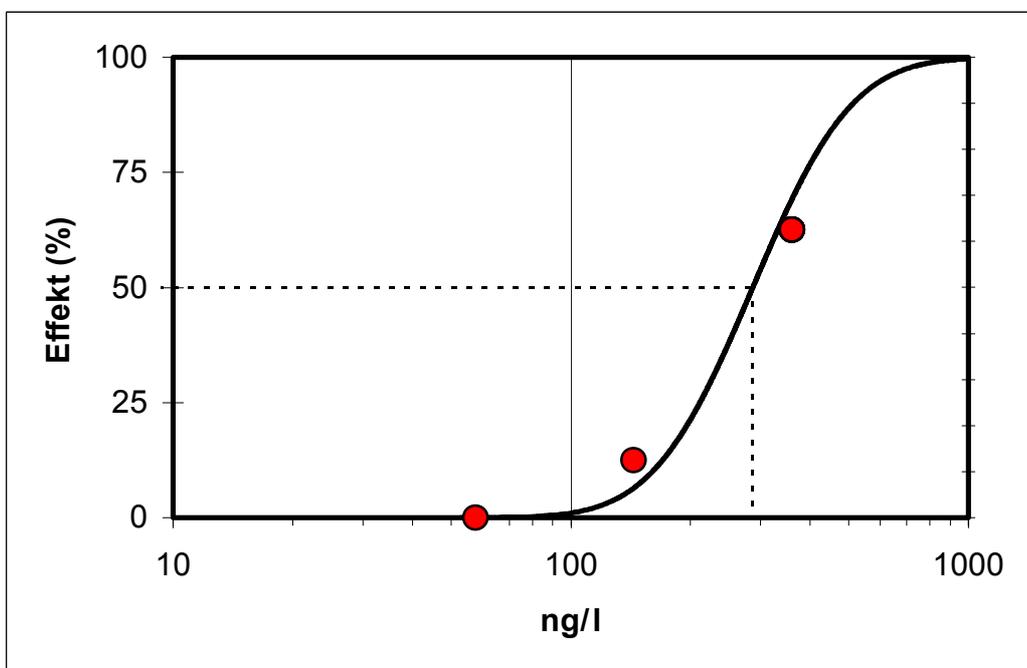


Abbildung 18: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber *Chappuisius inopinusus* (Copepoda) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 17 Tagen

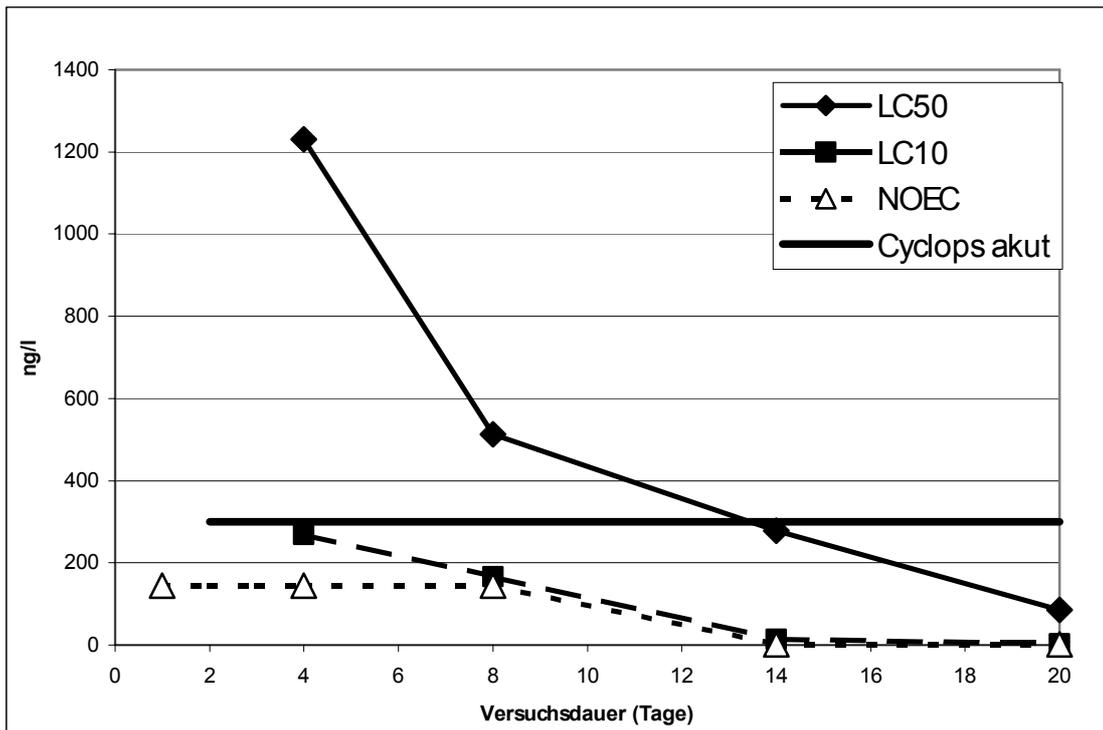


Abbildung 19: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber Copepoditen von *Phyllognathopus vigueri* (Copepoda). Die akute LC50 in Studien mit *Cyclops* (Copepoda) ist zum Vergleich als durchgängige Linie eingezeichnet.

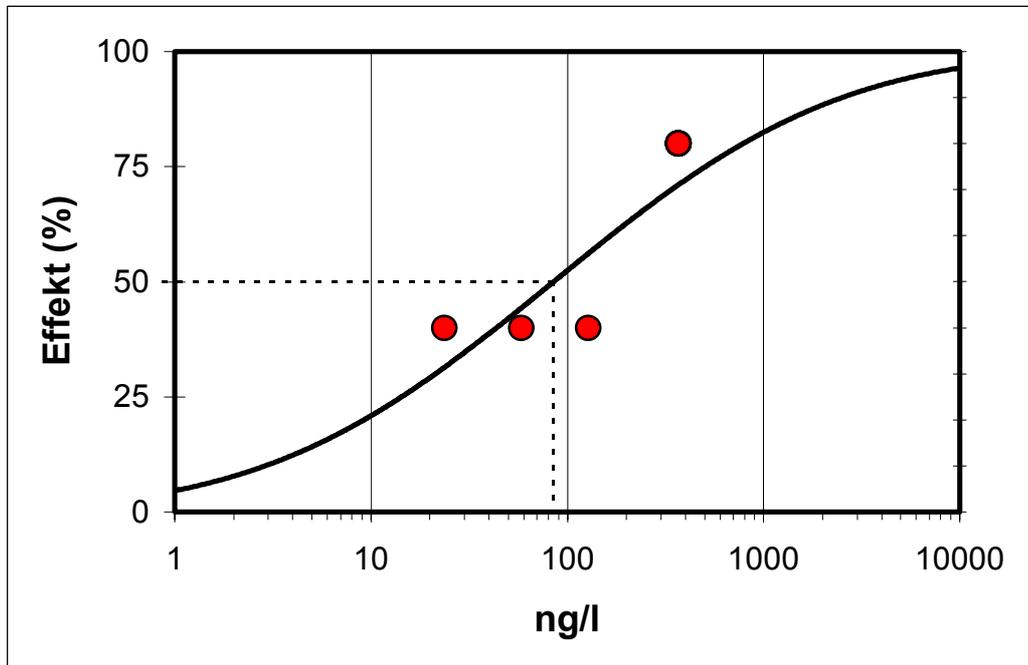


Abbildung 20: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber Copepoditen von *Phyllognathopus vigueri* (Copepoda) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 20 Tagen

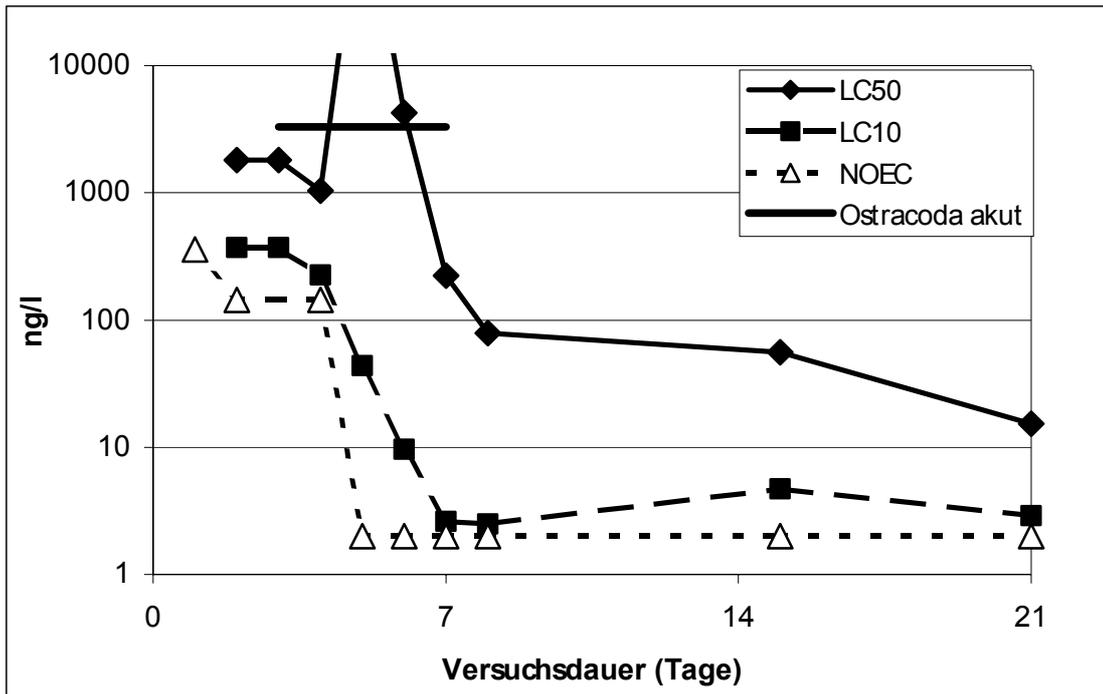


Abbildung 21: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber *Pseudocandona zschokkei* (Ostracoda)
Die akute LC50 in Studien mit Ostracoden ist zum Vergleich als Linie eingezeichnet.

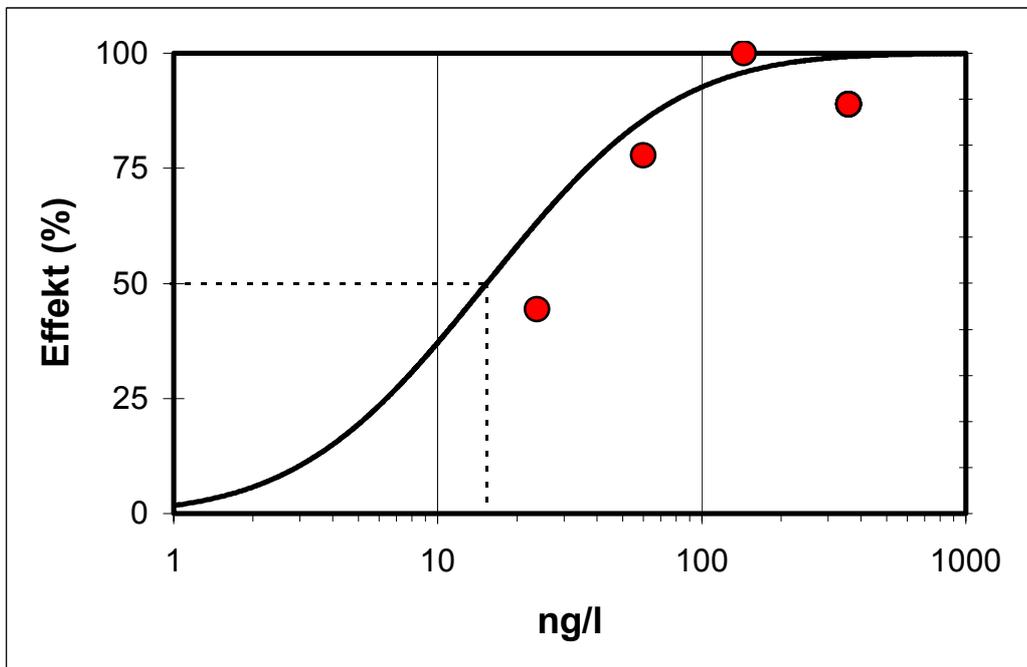


Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber *Pseudocandona zschokkei* (Ostracoda) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 21 Tagen.

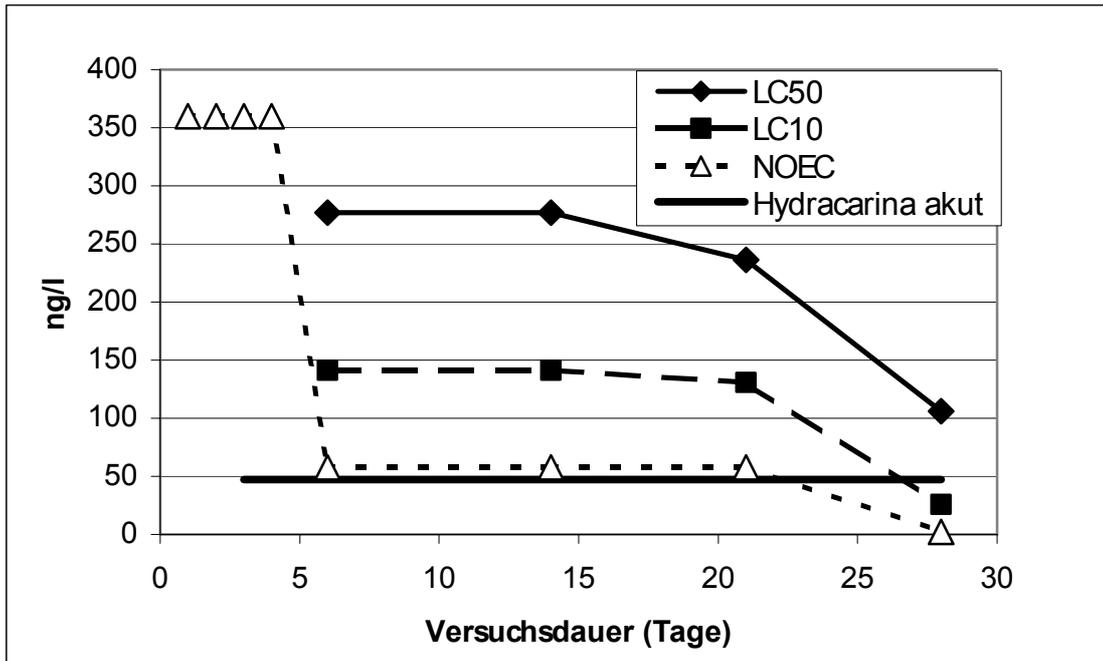


Abbildung 23: Effektkonzentrationen von Lambda-Cyhalothrin gegenüber *Lobohalacarus weberi* (Acari). Die akute LC50 in Studien mit Hydracarina aus Oberflächengewässern ist zum Vergleich als durchgängige Linie eingezeichnet.

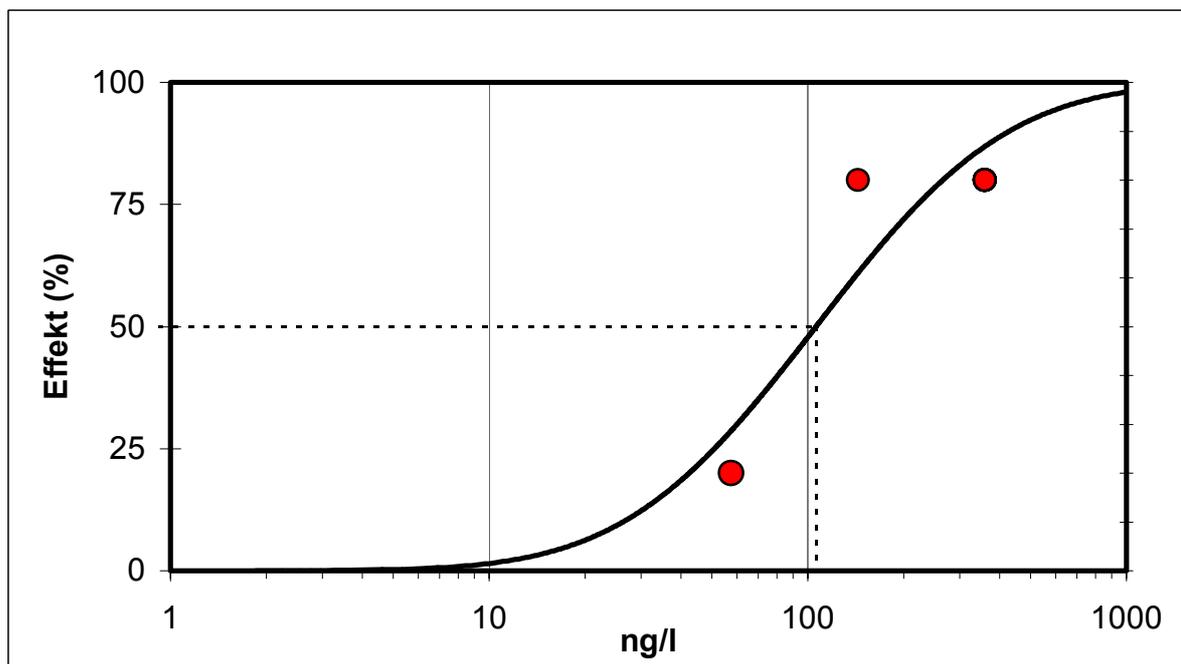


Abbildung 24: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von lambda-Cyhalothrin gegenüber *Lobohalacarus weberi* (Acari) zum Ende des ausgewerteten Zeitraums nach 28 Tagen

Die Grundwassermilbe *Lobohalacarus weberi* (Abbildung 23, Abbildung 24) ist wohl ebenfalls aufgrund ihrer geringeren Aktivität bei vergleichbarer Expositionsdauer um mehr als eine Größenordnung, nach Ausprägung der Toxizität nach 6 Tagen um Faktor 5-6 und nach fast

10facher Expositionsdauer noch um Faktor 2-3 unempfindlicher als die verglichene Milbe aus Oberflächengewässern.

Ein Vergleich der Empfindlichkeitsverteilungen mehr oder weniger verwandter Arten aus Grund- und Oberflächenwasser nach verschiedenen Methoden (Solomon et al. [1996], Abbildung 25; Aldenberg und Slob [1993], Abbildung 26) führt zu folgenden Ergebnissen:

- Die drei Verteilungen der LC50-Werte (akute Werte der Oberflächengewässerorganismen, Werte der Grundwasserorganismen nach Kurzzeit- und Langzeit-Exposition) sind hochsignifikant normalverteilt.
- Die Verteilung der LC50-Werte der Grundwasserorganismen nach verlängerter Exposition ist im Vergleich zu Werten nach Kurzzeit-Exposition um etwas mehr als eine Größenordnung zu höherer Empfindlichkeit verschoben. Sie weist jedoch noch eine ähnliche Charakteristik der Varianz auf.
- Die Verteilung der akuten LC50-Werte der Oberflächengewässerorganismen ist deutlich breiter und umfasst die Extremwerte der Grundwasserorganismen sowohl nach Kurzzeit- als auch nach Langzeit-Exposition. Der für die Oberflächengewässerorganismen errechnete HC5-Wert, der die aus der an die Versuchsergebnisse angepasste Verteilungsfunktion abgeleitete Konzentration bezeichnet, bei der für 5 % aller Arten die LC50 erreicht oder überschritten wäre, liegt je nach Methode um etwas mehr oder etwas weniger als eine Größenordnung unterhalb des HC5-Wertes für die langzeitexponierten Grundwasserorganismen.

Die Tatsache, dass die LC50-Werte der Grundwasserorganismen deutlich enger beieinander liegen als die der Oberflächengewässerorganismen, hat ihre Ursachen in folgenden Zusammenhängen:

- Die Reaktionsnorm der Grundwasserorganismen ist wegen der Konstanz der Bedingungen schmaler
- Die Bedingungen der Tests weichen für verschiedene Grundwasserorganismen vergleichsweise weniger von den realen Bedingungen ab, als für die verschiedenere Nischen bewohnenden Oberflächengewässerorganismen
- Die Tests mit Grundwasserorganismen wurden in einem Labor von den gleichen Personen durchgeführt

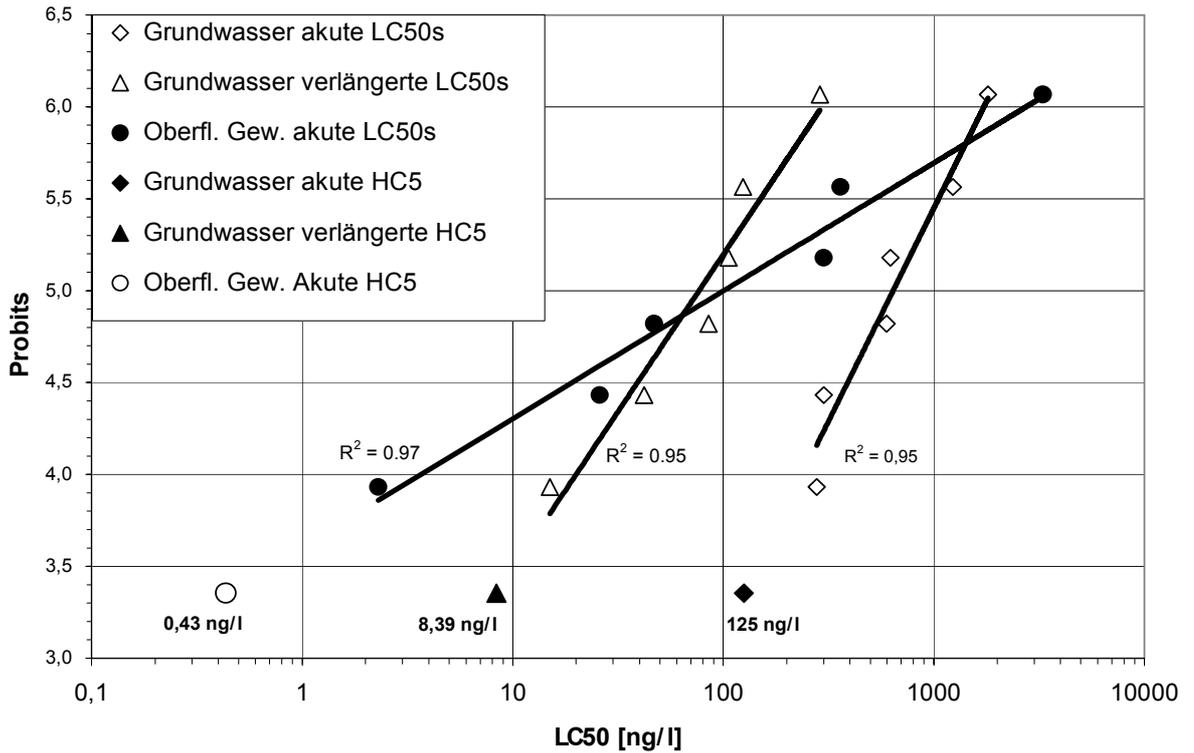


Abbildung 25: Empfindlichkeitsverteilung miteinander verglichener Taxa in Grund- und Oberflächenwasser nach Solomon et al. (1996).

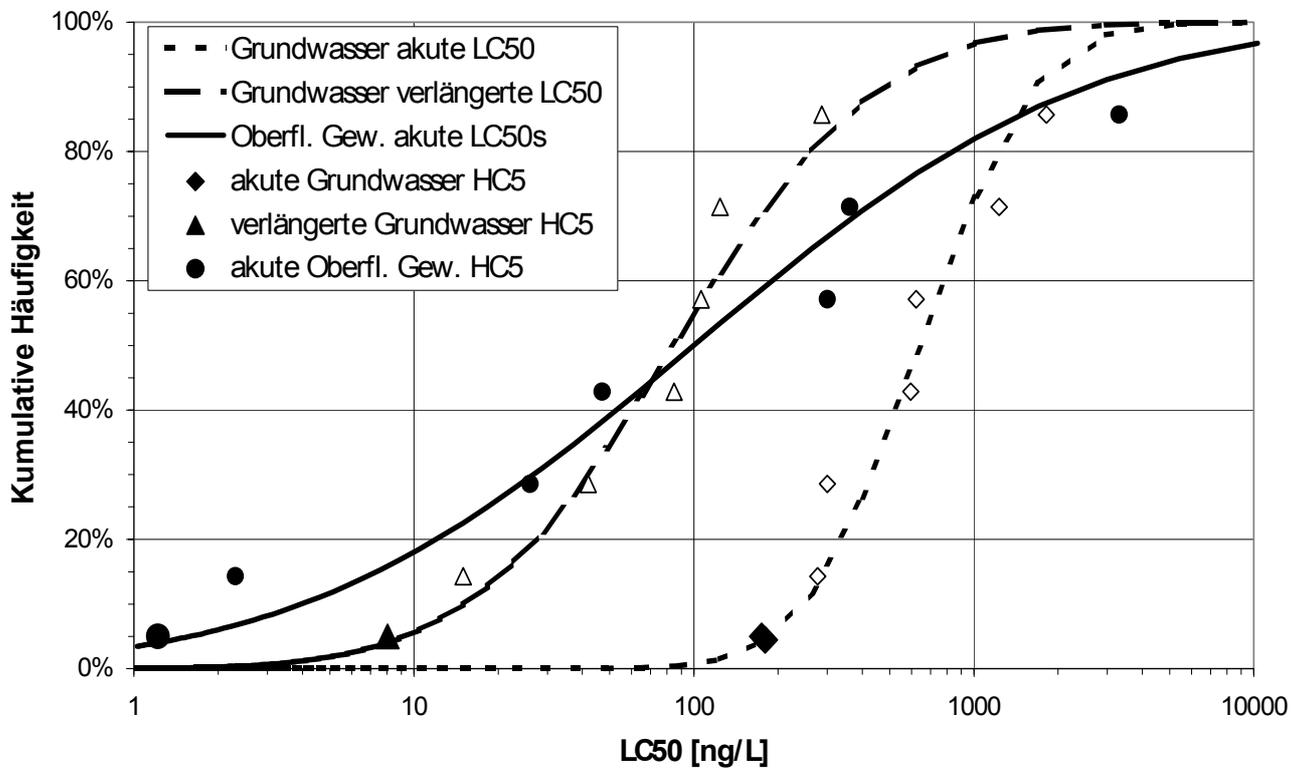


Abbildung 26: Empfindlichkeitsverteilung miteinander verglichener Taxa in Grund- und Oberflächenwasser nach Aldenberg und Slob (1993).

3.3.3 Bromoxynil-Octanoat

Für Bromoxynil-Octanoat waren nur die Ergebnisse aus Standardtests mit je einem Vertreter der Niederen Krebse (*Daphnia magna*) und Höheren Krebse (*Mysidopsis bahia*) vor. Diesen wurden je zwei Vertreter der Grundwasserfauna aus unterschiedlichen Ordnungen gegenüber gestellt (Tabelle).

Die Testkonzentrationen von Bromoxynil-Octanoat waren auch innerhalb der Testzeiträume für akute Standardtests nicht konstant zu halten, da das Octanoat schnell zur phenolischen Form hydrolysierte. Da diese sich nach vorliegenden Testergebnissen mit Standard-Testorganismen als deutlich weniger toxisch erwies als das Octanoat, wurde für den Vergleich zwischen Niederen Krebsen aus Grund- und Oberflächenwasser als effektive Spitzenbelastung die (nominale) initiale Konzentration herangezogen. Durch die längere Stabilität der Ausgangssubstanz bei den deutlich niedrigeren Temperaturen der Tests mit den Grundwasserorganismen stellt ein solcher Vergleich eine konservative Abschätzung des Risikos für Grundwasserorganismen im Sinne des Vorsorgeprinzips dar. Exakte Messungen zu Testbeginn und bei Testende nach 7 Tagen lagen nur für die Testansätze in größeren Testgefäßen mit den Höheren Krebsen *Antrobathynella stammeri* (Syncarida) und *Niphargus fontanus* (Amphipoda) vor. Da nur im Falle der Syncariden LC50-Werte zu berechnen waren, wurde an die gemessenen Werte für die Anfangs- und Endkonzentrationen einer jeden nominalen Konzentration e-Funktionen erster Ordnung angelegt. Aus diesen wurden die geschätzten Konzentrationen an den Tagen 1 – 6 abgeleitet. Die LC50-Werte wurden auf Basis der zeitlich gestaffelten Durchschnittskonzentrationen für jeden Tag berechnet und mit den übermittelten Werten des Standardorganismus *Mysidopsis bahia* verglichen (Abbildung 27).

Im Unterschied zu den zwei anderen Testsubstanzen erwies sich Bromoxynil-Octanoat für Grund- oder Oberflächengewässerorganismen bei gleich langer Expositionsdauer als nahezu identisch toxisch. Für die Niederen Krebse wurden nach 48 Stunden auf nominalen Initialkonzentrationen beruhende LC/EC50-Werte zwischen 109 und 160 µg/l ermittelt (Tabelle). Die auf Realkonzentrationen beruhenden Werte für die Höheren Krebse *Antrobathynella stammeri* (Syncarida) und *Mysidopsis bahia* liegen nach 48 Stunden innerhalb der selben Spanne³ und sind über die gesamte Versuchsdauer nahezu identisch (Abbildung 27).

Niphargus fontanus erwies sich erneut als der unempfindlichste Vertreter; innerhalb des Bereichs der an der guten Löslichkeit der Testsubstanz orientierten Testkonzentrationen konnte keine auswertbare Mortalität festgestellt werden. Allerdings ist der Unterschied der NOEC zu den LC50-Werten für die Vergleichsorganismen gering (Faktor 2).

³ Daraus folgt eine etwas höhere Empfindlichkeit der Niederen Krebse, da die Realkonzentrationen für diese niedriger liegen. Die wahren Unterschiede zwischen allen berechenbaren EC/LC50-Werten dürften sich jedoch innerhalb eines Faktors von 3 bewegen.

Tabelle 11: LC50-Werte von Bromoxynil-Octanoat gegenüber Crustaceen aus Grundwasser (Daten im Rahmen des Vorhabens erhoben) und Oberflächengewässern.

Einheit : µg/l	Höhere Krebse (gemessene Konzentrationen)		Niedere Krebse (nominale, initiale Konzentrationen)	
	<i>N. fontanus</i> (Amphipoda)	<i>A. stammeri</i> (Syncarida)	<i>P. vigueri</i> (Copepoda)	<i>P. zschokkei</i> (Ostracoda)
LC50 akut 48 h	> 160	130	109	160
LC50 akut 96 h	> 160	93	-	113
Vergleichsorganismen*	<i>Mysidopsis bahia</i> (96 h)		<i>Daphnia magna</i> (48 h)	
LC50 akut 48 h	150 real		110	
LC50 akut 96 h	87 real		-	

* Pflanzenschutzmittel-Datenbank des Umweltbundesamtes

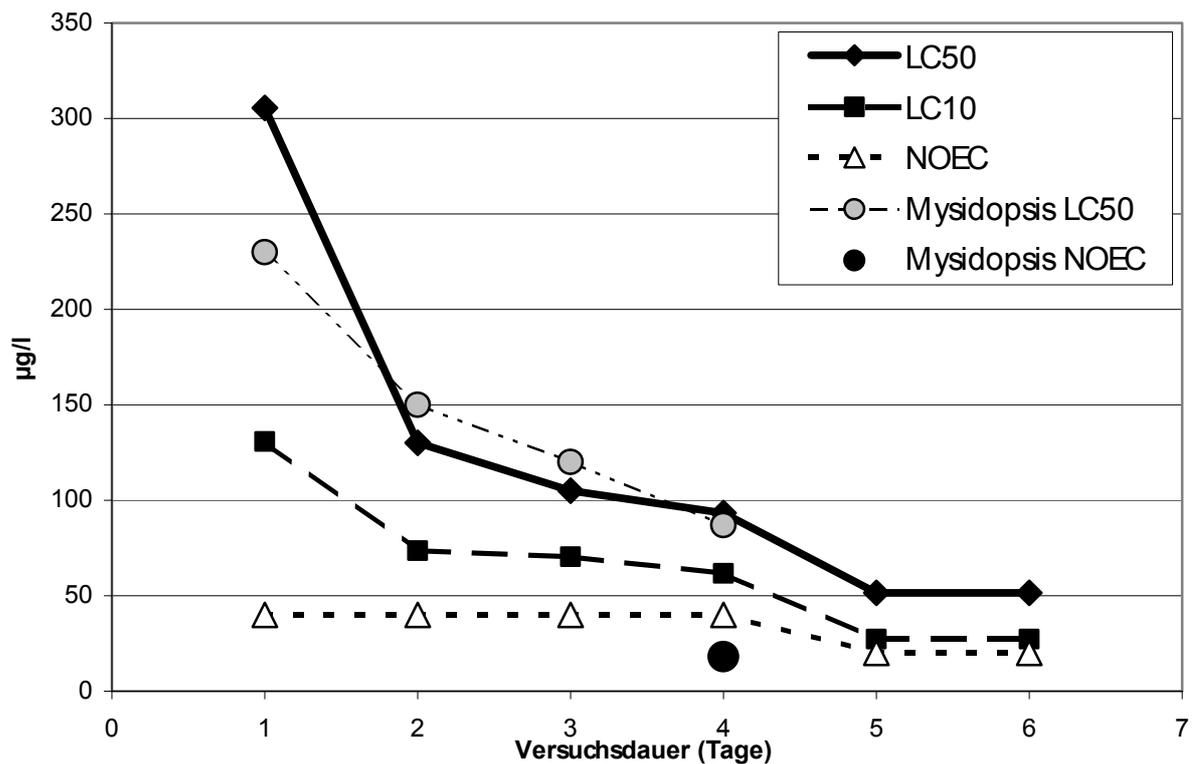


Abbildung 27: Effektkonzentrationen von Bromoxynil-Octanoat gegenüber *Antrobathynella stammeri* (Syncarida) im Vergleich zu *Mysidopsis bahia*.

4 Diskussion

4.1 Cyprodinil

4.1.1 Mikroorganismen

Das Fungizid Cyprodinil, ein Inhibitor der Methionin-Biosynthese, verursachte Störungen der mikrobiellen Stoffumsätze von mikrobiellen Lebensgemeinschaften aus Grund- und Oberflächengewässern mit EC_{50} -Werten im Bereich zwischen 0,3 und 2 mg/l. In den Mikroorganismen aus Oberflächengewässern waren die Effekte bei zwei Parametern, Esterase-Aktivität und ETS, deutlich früher feststellbar als in den Grundwasser-Mikroorganismen (nach 6 Tagen gegenüber 28 bzw. 14 Tagen). Durch die Anpassung der Grundwassermikroorganismen an die niedrigeren Umgebungstemperaturen und Nährstoffkonzentrationen und die dadurch bedingten verlangsamten Stoffwechselprozesse und Vermehrungszyklen im Vergleich zu den Oberflächenwasser-Mikroorganismen können diese Unterschiede in der Ansprechzeit möglicherweise erklärt werden. Die Effektkonzentrationen lagen bei beiden Lebensgemeinschaften in einer vergleichbaren Größenordnung. Allerdings muss bei den Endpunkten berücksichtigt werden, dass die gemessenen Aktivitäten sich auch für die unbelasteten Kontrollen in sehr niedrigen Wertebereichen bewegten, so dass (zufällige) Selektion durch längere Inkubationszeiten sich leicht in Unterschieden äußern konnte, die als Effekt interpretiert wurden. Strukturelle Auswirkungen von Cyprodinil konnten mittels RFLP nicht festgestellt werden.

Die sich schnell vermehrende Bakterienart *P. putida* als Standard-Testorganismus wurde in der Laborkultur durch den Methioninsynthesehemmer Cyprodinil nicht beeinträchtigt, da wahrscheinlich die Mediumkomponenten den Aminosäuremangel kompensieren konnten.

4.1.2 Crustaceen

Der getestete Repräsentant der Grundwasser-Harpacticoiden *Chappuisius inopinus* erwies sich nach mehr als zehnfach längerer Exposition ähnlich empfindlich (ca. Faktor 2) wie der zum Vergleich herangezogene Niedere Krebs aus Oberflächengewässern, der Phyllopoide *Daphnia magna*. Die wesentliche Wirkung trat innerhalb der ersten 14 Tage auf, was einer 7fach längeren Exposition als im Test mit dem Standardorganismus entspricht. Dieser Wert stimmt gut mit dem Hinweis überein, dass Grundwasser-Organismen über eine 5-7fach verlangsamte Stoffwechsellistung verfügen. Bei Inhibitoren von Stoffwechselvorgängen führt dies zum Einen zu einem späteren Erreichen wirksamer Konzentrationen am Wirkort, zum Anderen aber vor allem zu einer entsprechend späteren Ausprägung der Schädigung.

Der als Repräsentant der Höheren Krebse getestete Amphipode *Niphargus fontanus* erwies sich hingegen auch nach 10fach längerer Expositionsdauer als der verglichene Standardorganismus *Mysidopsis bahia* als deutlich unempfindlicher (Faktor >100). Zwar ist *M. bahia* nicht sonderlich nahe mit *N. fontanus* verwandt, dazu ein Salzwasserorganismus und vor allem bei hohen Temperaturen getestet, was seine hohe Empfindlichkeit erklären könnte. Allerdings zeigt sich *N. fontanus* auch unempfindlicher als der getestete Harpacticoiden. Durch die Lebensweise der getesteten Population im Kontaktbereich zu Oberflächenwasser (Langsamsandfilter der Gelsen-Wasser AG, Echthausen, Ruhr) mag sie eine im Vergleich zu anderen echten Grundwasserbewohnern vergleichsweise breite

Reaktionsnorm bezüglich Anforderungen an die Stoffwechselaktivität verfügen. Somit würde eine möglicherweise vorhandene Elastizität eine Herabregulierung des Stoffwechsels erlauben, die zu einer größeren Toleranz gegenüber Stoffwechselgiften führte. Die bisher durchgeführten Arbeiten zur Elastizität der Stoffwechselaktivität von *N. fontanus* (Rumm 2000) weisen auf geringe Elastizität hin, doch sind keine vergleichbaren Untersuchungen an anderen typischen Grundwasserorganismen bekannt.

Insgesamt scheint Cyprodinil als Inhibitor des Aufbaustoffwechsels deutlich langsamer und teilweise weniger stark auf Grundwasserorganismen als auf Standardorganismen zu wirken. Diese wurden ja nicht nur bei 10 – 14 °C niedrigeren Temperaturen getestet, als dies bei Standardtests der Fall ist, sondern stellen gleichzeitig Repräsentanten einer Lebensgemeinschaft dar, die über evolutionäre Zeiträume an diese niedrigen Temperaturen und Nahrungsknappheit adaptiert ist, und die damit über eine signifikant niedrigere Stoffwechselaktivität verfügen. Aus diesen Gründen wurden die erzielten Ergebnisse für Cyprodinil als ausreichend aussagesicher betrachtet und keine weiteren Grundwasserarten getestet. So konnten die vorhandenen Organismen für Tests mit den beiden anderen Substanzen verwendet werden.

4.2 Lambda-Cyhalothrin

4.2.1 Höhere Krebse

Der getestete Repräsentant der grundwassertypischen Syncarida ist nach fünffacher Expositionsdauer ähnlich empfindlich wie die zum Vergleich herangezogenen Höheren Krebse aus Oberflächengewässern (Faktor 1,6-15). Die wesentliche Wirkung trat innerhalb der ersten 10 Tage auf; dies entspricht einer 2,5fachen Expositionsdauer der Akuttests mit den Oberflächengewässerarten.

Auch bei den Amphipoden tritt die Wirkung von lambda-Cyhalothrin bei der Grundwasserform innerhalb der ersten 10 Tage auf, jedoch ist *Niphargus fontanus* auch nach zehnfacher Expositionsdauer noch deutlich unempfindlicher als die verglichenen Amphipoden aus Oberflächengewässern (Faktor 10 - >100).

4.2.2 Niedere Krebse

Die getesteten Repräsentanten der Grundwasser-Copepoden erwiesen sich bereits nach ähnlich langer Expositionsdauer ähnlich empfindlich (Faktor 0,6 bis 2,9) wie die zum Vergleich herangezogenen Niederen Krebse (Copepoden und Phyllopoden) aus Oberflächengewässern. Eine klare Wirkcharakteristik wie bei den Höheren Krebsen wurde jedoch nicht festgestellt; die Empfindlichkeit nahm mehr oder weniger über den gesamten Versuchszeitraum zu. Es ist zu diskutieren, ob eine Fortsetzung des Versuchs über länger als 14 Tage ohne Fütterung einen Stressor darstellt, der die Empfindlichkeit der Tiere steigert. Auch nach zehnfacher Expositionsdauer liegt die Empfindlichkeit jedoch noch im Bereich eines Faktors von 0,3 derer der verglichenen Oberflächengewässerarten.

Auch der getestete Repräsentant der Grundwasser-Ostracoden zeigte bereits nach Kurzzeit-Exposition eine mit dem Vertreter aus Oberflächengewässern vergleichbare Empfindlichkeit. Die erheblich höhere Empfindlichkeit bei verlängerter Exposition wurde bereits unter 3.5.2 diskutiert. Der

empfindliche Wert ist in jedem Fall durch die empfindlichsten Arten aus Oberflächengewässern (Höhere Krebse) abgedeckt.

4.2.3 *Acari*

Die Grundwassermilben reagierten zunächst innerhalb der ersten sechs Tage. Anschließend lag die bestimmte LC50 über 10 Tage mehr oder weniger konstant deutlich über der verglichenen Milbe aus Oberflächengewässern. Zum Versuchsende (bis zehnfache Expositionsdauer) nahm die LC50 ab und näherte sich der des Oberflächengewässerorganismus. Hier ist wie bei den Copepoden zu diskutieren, ob die Fortsetzung des Versuchs über 17-28 Tage ohne Fütterung die Tiere so beeinträchtigt, dass besondere Empfindlichkeiten entstehen, die einen klaren worst case der Betrachtung darstellen.

Lambda-Cyhalothrin ist als axonisches Nervengift in seiner akuten Wirkung im Wesentlichen abhängig von der Struktur und Physiologie der Nerven und dem Aktivitätsmuster der betroffenen Organismen. Es betrifft die niederen Krebse in Grund- und Oberflächenwasser ähnlich stark. Höhere Krebse sind auf Grund ihrer Nervalstruktur und ihrer besonders hohen Aktivität in Oberflächengewässern besonders stark betroffen. *Niphargus* scheint über eine derartige Flexibilität der Aktivität zu verfügen, dass mögliche Ruhephasen zu einer deutlichen Herabsetzung der Empfindlichkeit führen könnten. Die maximal an die Grundwasserlebensweise adaptierten Syncariden verfügen dem gegenüber nicht über entsprechende Elastizität und reagieren ähnlich wie die Höheren Krebse aus Oberflächengewässern, allerdings mit deutlicher Verlangsamung. Acari sind im Grundwasser durch geringere Aktivität etwas unempfindlicher als in Oberflächengewässern.

Die Empfindlichkeitsverteilungen legen nahe, dass die erzielten Ergebnisse für lambda-Cyhalothrin als ausreichend aussagesicher betrachtet werden können: Die LC50-Werte für Grundwasserorganismen nach längstmöglicher Exposition liegen auch für die empfindlichsten Organismen deutlich über den empfindlichsten Werten von Akuttests mit mehr oder weniger verwandten Oberflächengewässerorganismen. Auch im Falle des Nervengifts scheint die durch Temperatur und Nahrungsknappheit evolutionär verringerte Aktivität im Grundwasser die Empfindlichkeit im Vergleich zu systematisch vergleichbaren Organismen aus Oberflächengewässern zu vermindern; dies gilt insbesondere für die Amphipoden, die an der Oberfläche besonders hohe Aktivitäten aufweisen.

4.3 Bromoxynil-Octanoat

4.3.1 Mikroorganismen

Die untersuchten Enzymaktivitäten der Mikroorganismen aus Grund- und Oberflächenwasser wurden nicht bzw. nur geringfügig durch diese Substanz beeinträchtigt. Eine eindeutige Beeinflussung der Struktur der Lebensgemeinschaften konnte mittels T-RFLP nicht festgestellt werden.

4.3.2 Crustaceen

Bezüglich der Wirkung von Bromoxynil-Octanoat bestehen geringe Empfindlichkeitsunterschiede zwischen den systematischen Einheiten. Da auf Grund der Hydrolyse der Testsubstanz im statischen Test vor allem die Initialkonzentration entscheidend ist, kommt der Expositionsdauer nicht die gleiche Bedeutung zu wie dies für die beiden anderen Substanzen der Fall ist. Drei der vier getesteten Grundwasserarten sind nach ähnlichen Expositionszeiträumen ähnlich empfindlich wie die verglichenen Oberflächengewässer-Organismen (Faktor 1-2). Wieder tendiert *Niphargus* dazu, unempfindlicher zu sein.

Die über QSARs anhand des log Pow exakt vorausgesagte Toxizität legt nahe, dass der Wirkmechanismus der eines unpolaren Narkotikums ist. Diese durch Einlagerung in Zellmembranen und unspezifische Interaktionen mit den Stoffübertragungsmechanismen auftretende Schädigung scheint im Bereich der Beobachtungszeiten unabhängig von der Temperatur, der Stoffwechselrate und der Aktivität zu sein: Das Akutfenster der Standardtests reicht aus, um die Störung basaler Lebensvorgänge auch bei Grundwasserorganismen abzubilden.

In diesem Fall zeigen Grundwasserorganismen zwar keine geringere Empfindlichkeit, doch lässt die Universalität des unspezifischen Wirkmechanismus auf eine ausreichende Repräsentativität der Standardtests auch für Grundwasserorganismen schließen.

4.4 Allgemeine ableitbare Tendenzen

Die Aufbaustoffwechsellinhibition scheint bei Grundwasserorganismen 5-7fach verlangsamt zu sein. Während Amphipoden in Oberflächengewässern durch besonders hohen Umsatz besonders stark betroffen sind, zeigen sich Niphargen für Grundwasserorganismen vergleichsweise umsatzflexibel, da im Grundwasser extreme Ruhephasen möglich sind. Nervengifte wirken auch in Abhängigkeit von der Aktivität. Die Konsequenz ist ähnlich wie bei Stoffwechsellinhibitoren. Die Wirkung stellt sich bei Grundwasserorganismen tendenziell später und nicht so empfindlich ein, wenn die verglichenen Oberflächenorganismen sich durch starke Aktivitätsmuster auszeichnen. Fasst man beide Wirktypen zusammen, zeigt sich bei einem Vergleich von Grund- und Oberflächengewässerorganismen, dass bei gleich langer Expositionsdauer Grundwasserorganismen sich in der Regel als unempfindlicher erwiesen, während bei >5fach verlängerter Exposition eine Angleichung im Bereich von Faktor 2-3 zu beobachten ist. Ausnahmen sind zum Einen die verglichenen Vertreter der Amphipoden, welche möglicherweise aus den o.g. Gründen im Grundwasser um Größenordnungen unempfindlicher sind, und zum Anderen die Ostracoden, welche vermutlich aus prüftechnischen Gründen nicht unter vergleichbaren Bedingungen getestet wurden (s. 3.3.2). In jedem Fall sind die Grundwasserarthropoden durch die empfindlichsten Vertreter der Standardorganismen bezüglich des Risikos der Empfindlichkeit abgedeckt.

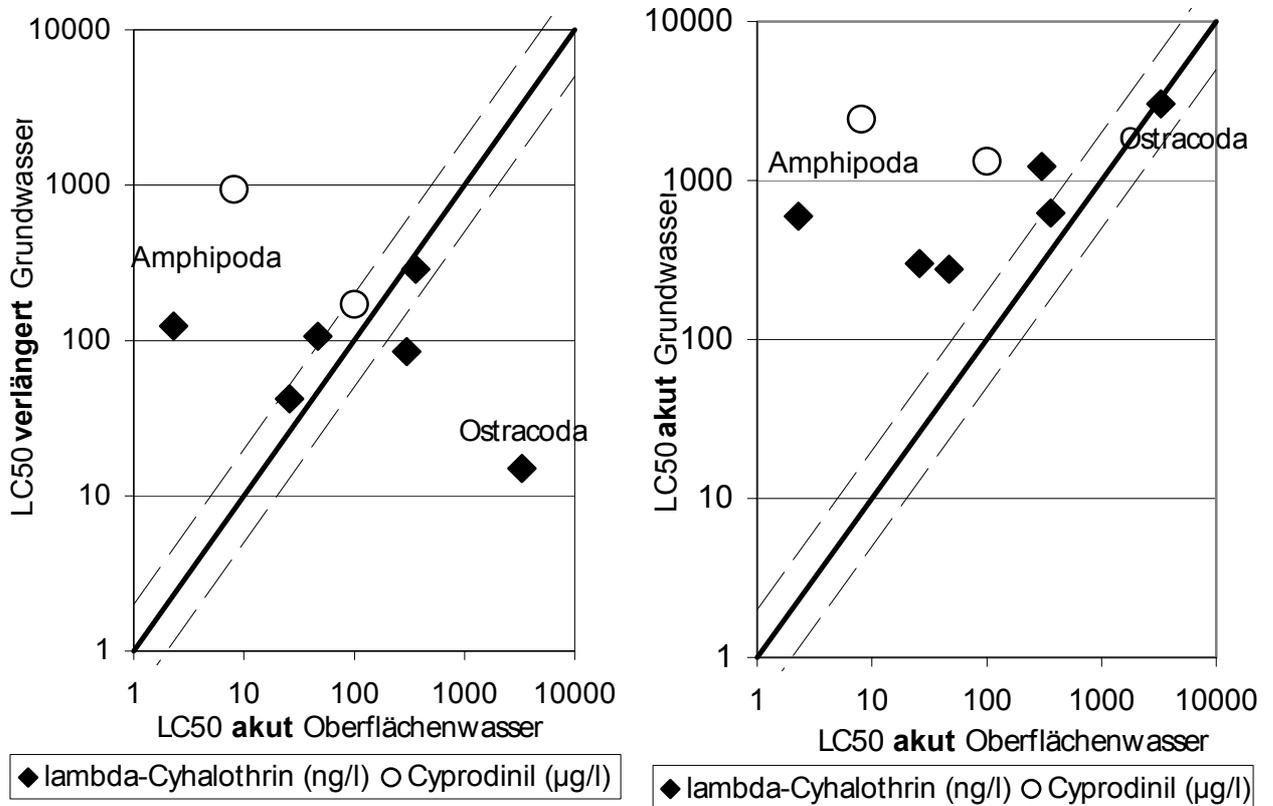


Abbildung 28: Vergleich akuter Toxizitäten für Organismen aus Oberflächengewässern mit Toxizitäten für Grundwasserorganismen nach gleich langer (li) und verlängerter (re) Exposition. Gestrichelt: Faktor 2.

Die unspezifische unpolar narkotische Wirkung ist unabhängig von der Lebensweise nach vergleichbaren Zeiträumen gleich stark.

Insgesamt scheinen sich Grund- und Oberflächenwasserorganismen weniger durch die Spezifität des Wirkmechanismus zu unterscheiden, sondern vielmehr durch die auf kinetische Prozesse und metabolische Geschwindigkeit zurückzuführende interne Exposition am Wirkort.

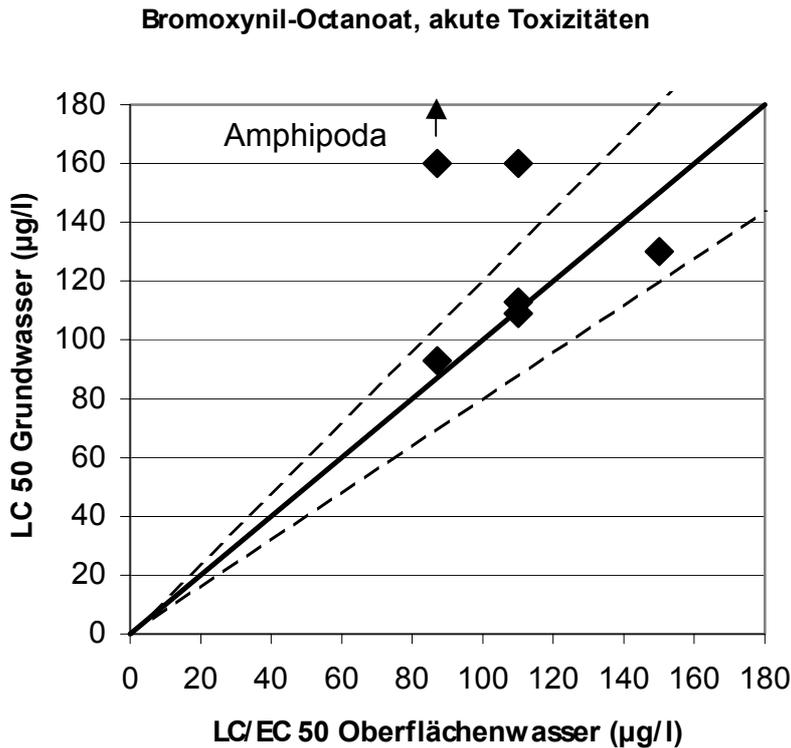


Abbildung 29: Vergleich akuter Toxizitäten eines unpolaren Narkotikums für Organismen aus Oberflächengewässern mit denen für Grundwasserorganismen. Gestrichelt: $\pm 20\%$.

4.5 Vergleich von Literaturdaten

Zwecks Einbindung der vorgestellten Versuchsergebnisse in einen weiteren Rahmen publizierter Ergebnisse und Unterstützung oder Widerlegung aufgezeigter Trends wurden publizierte Ergebnisse zur Toxizität beliebiger Substanzen mit Grundwasserorganismen gesammelt (Mösslacher & Notenboom, 1998). Dann wurden Ergebnisse mit den selben Substanzen in Tests mit Standardorganismen recherchiert und nach grober taxonomischer Verwandtschaft – analog zum oben beschriebenen Vorgehen – gegenüber gestellt. Zunächst war auffällig, dass nur Tests mit Grundwasserorganismen verfügbar waren, die bezüglich der Expositionsdauer den Akuttests mit Standardorganismen entsprachen. Die meisten toxischen Substanzen, zu denen entsprechende Paarungen aus Grund- und Oberflächenwasserorganismen gefunden wurden, gehören zu den Gruppen der (Schwer-)Metalle und Pflanzenschutzmittel (Abbildung 30). Nur im Fall von Pentachlorphenol ist ein Grundwasserorganismus deutlich (Faktor 2) empfindlicher als der verglichene Standardorganismus. Vergleicht man allerdings die in diesem Falle vorhandenen taxonomisch vergleichbareren Copepoden, so sind beide Werte innerhalb eines Faktors von 2. Die meisten Stoffe – darunter vor allem die essentiellen und regulierten Metalle wie Kupfer und Zink, aber auch die Wirkstoffe Aldicarb und Thiram – liegen innerhalb eines Bereichs von Faktor 2-3 der LC50, was der gängigen Variabilität von Ergebnissen entspricht. Die Schwermetalle Chrom und Cadmium hingegen sind für die verglichenen Standardorganismen deutlich toxischer. Gleiches gilt in besonderem Maße für das Pyrethroid Permethrin: Wie im berichteten Fall des lambda-Cyhalothrin ist auch hier

Niphargus um Größenordnungen unempfindlicher als die Höheren Krebse aus Oberflächengewässern. Der Vergleich von Literaturdaten stützt somit die abgeleiteten Tendenzen.

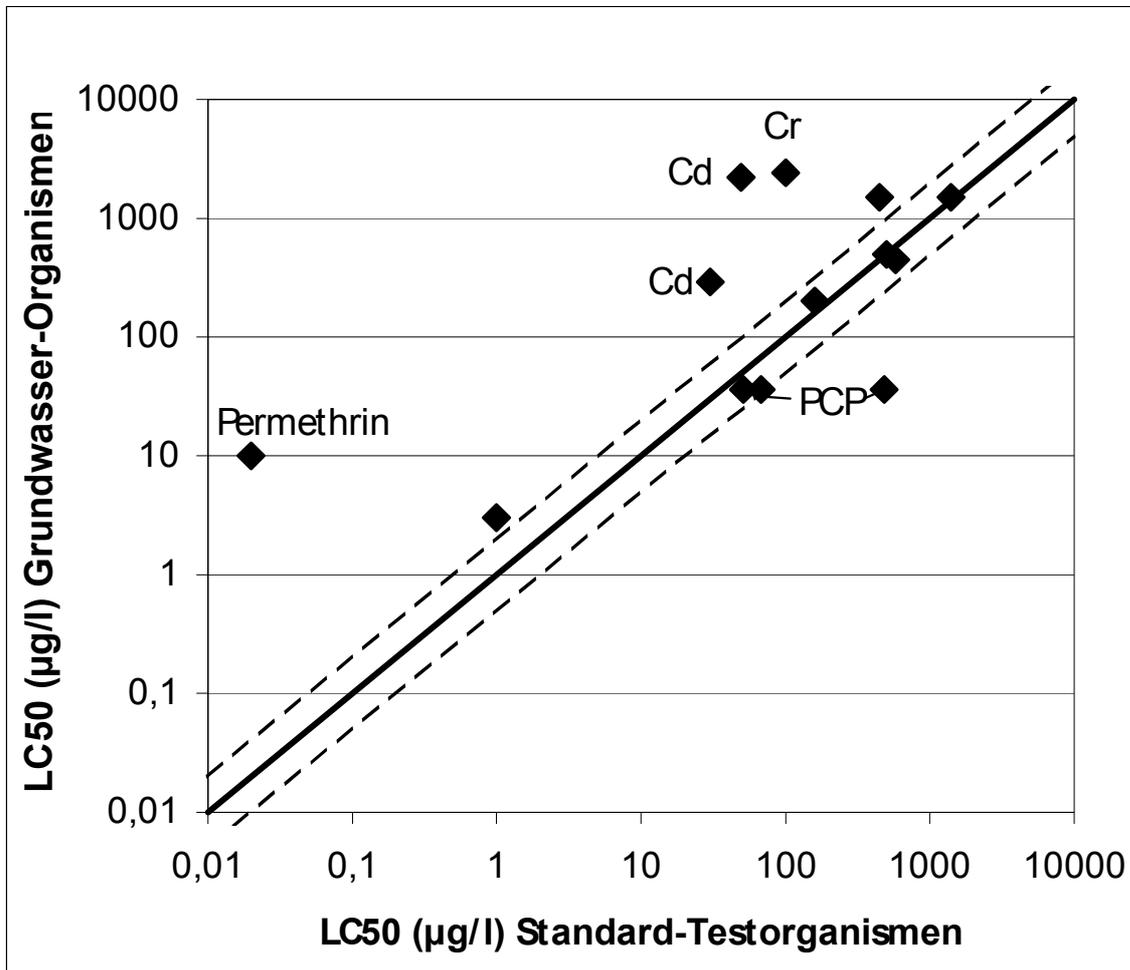


Abbildung 30: Vergleich der LC50-Werte von Metallen und Pflanzenschutzmitteln gegenüber Organismen aus Grundwasser und Oberflächengewässern (zumeist Standardtests).
 Grundwasser: Mösslacher & Notenboom, 1998
 Standardorganismen: Aquire-Datenbank (Aldicarb), Munkittrick et al. (1991), Slooff et al. (1983), Shedd et al. (1999), Biesinger et al. (1972), Miller et al. (1985), Toussaint et al. (1995), Cripe (1994), Pflanzenschutzmittel-Datenbank des Umweltbundesamtes (PCP).

4.6 Durchführbarkeit ökotoxikologischer Untersuchungen an Grundwasserorganismen

Die vorgenommenen Untersuchungen an Grundwasserorganismen ermöglichen eine Einschätzung über die Durchführbarkeit von Studien im Rahmen ökotoxikologischer Prüfungen, was ebenfalls als Ergebnis des Vorhabens zu werten ist. Im Rahmen dieser Einschätzung sind die Möglichkeiten der Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit von zentraler Bedeutung. Dies betrifft vor allem die Aspekte der Hälterung und Kultivierung bzw. Beschaffung, sowie die eigentliche Testdurchführung.

4.6.1 Hälterung / Kultivierung

Die Hälterung der verwendeten Grundwasserorganismen ist mit geringem Aufwand verbunden. Bei Einlagerung der Hälterungsgefäße in einen Kühlschrank bei 10 °C im Dunkeln und gelegentlicher (z.B. 14tägiger) moderater Fütterung mit Laubresten und Hackfleischpartikeln (Amphipoden) sind die Individuen über lange Zeiträume zu hältern, wenn sichergestellt ist, dass ein Lückensystem zur Verfügung steht (z.B. Glasperlen) und die Dichte starker Predatoren (Amphipoden) nicht zu hoch ist. Alle Monate sollte ein Wasserwechsel vorgenommen werden; das neue Wasser kann einer Rückstellprobe der Grundwasserbeprobung entstammen.

Eine geregelte Zucht ist indes mit dem zur Zeit vorhandenen Wissen nicht möglich. Selbst wenn die genauen Bedingungen bekannt und herstellbar wären, würde die lange Generationsdauer, die geringe Zahl an Nachkommen und die damit verbunden notwendige Synchronisation der Nachzucht einen erheblichen zeitlichen und logistischen Aufwand bedeuten. Die damit notwendige ständige Neubeschaffung von Testorganismen aus Grundwasserbeprobungen steht einer Standardisierbarkeit und einer problemlosen Verfügbarkeit entgegen.

4.6.2 Beschaffung

Zur Beschaffung der Organismen aus Grundwasserbeprobungen sind die fachkundige Einbringung und Unterhaltung geeigneter Peilrohre oder gute Kontakte zur Wasserwirtschaft notwendig. Des weiteren bedarf es des Wissens um die – unter Umständen saisonal schwankende - Wahrscheinlichkeit des Auftretens der gewünschten Arten an der jeweiligen Probenahmestelle. Voraussetzung sind solide taxonomische Kenntnisse.

4.6.3 Testung

Die Handhabbarkeit der Organismen im Test ist aufgrund ihrer Anspruchslosigkeit grundsätzlich nicht schwierig. Probleme treten mit großen räuberischen Formen auf (Einzelhälterung im Test empfohlen!), sowie mit den kleinen Formen aufgrund der Anpassung des Testdesigns an die Objektgröße: Kleine Ganzglas-Testgefäße, ein Binokular mit kühlbarem Objektisch und geringe Testvolumina (schwierige Analytik während des Tests) sind von der normalen Testpraxis abweichende Bedingungen. Schwerwiegender ist allerdings die Langsamkeit des Stoffwechsels: Um

bei Wirkstoffen, die Stoffwechselleistungen oder Aktivitätsmuster beeinträchtigen, wie es bei Pflanzenschutzmitteln häufig der Fall ist, für eine wirkrelevante interne Exposition zu sorgen, bedarf es einer deutlich längeren Expositionsdauer als bei Standardorganismen. Damit ist ein akuter Test nicht mehr innerhalb einer Arbeitswoche durchzuführen. Eine deutliche Erhöhung der Temperatur und der Nahrungsmenge werden wegen der fehlenden Adaptation auf diese Bedingungen als Stressoren empfunden, und sind wahrscheinlich nicht ausreichend, die im Vergleich zu Oberflächenwasserorganismen geringere Stoffwechselaktivität zu kompensieren. Die wissenschaftlich sauberste Methode einer Kurzzeittestung, die unabhängig von der Aktivität der verwendeten Organismen wäre, umfasste den Bezug zur Körperdosis. Dies ist aber mit der implementierten Methodik der Risikobewertung nicht vereinbar. Ein solches Vorgehen bedeutete zwar einen Fortschritt in Bezug auf die Aufklärung von Wirkweisen, aber einen Rückschritt in der betrachteten Integriationsebene und ist zudem bei der geringen Körpergröße der Grundwasserorganismen methodisch problematisch.

Eine chronische Testung unter Einbeziehung eines relevanten Lebensabschnitts, etwa ein Early Life Stage oder gar Life Cycle Test, ist schon wegen der Generationsdauer schwierig, wegen der schwachen Statistik aufgrund der geringen Reproduktionsraten zusätzlich problematisch und wegen mangelnden Züchtbarkeit zur Zeit gänzlich unmöglich. Die notwendige Aufrechterhaltung der Testkonzentrationen unter Kühlbedingungen in geringen Testvolumina über Zeiträume von mehreren Monaten sorgt für weitere Schwierigkeiten.

Tabelle 10: Vor- und Nachteile der Prüfung von Grundwasserorganismen in ökotoxikologischen Tests

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> ▪ lange Testdauer möglich ▪ keine Nahrungszufuhr nötig ▪ geringer Sauerstoffbedarf ▪ geringe Bewegungsneigung läßt kleine Gefäße zu ▪ breite Toleranz an die Wasserqualität ▪ thigmotaktisches* Verhalten ist günstig für Untersuchungen der Sedimenttoxizität ▪ fehlender Lichtbedarf erübrigt eine Beleuchtung ▪ gleichmäßig niedrige Temperaturansprüche bedingen eine gleichmäßige Aufnahme wirksamer Substanzen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ thigmotaktisches* Verhalten mindert Eignung für Freiwassertests, besonders unter Strömung ▪ niedrige Stoffwechselraten bedingen niedrige Aufnahmeraten wirksamer Substanzen, dies verlängert die Testdauer ▪ omnivore Tendenz verhindert die Umsetzung des Modells der diskreten Trophieebenen ▪ extrem lange Generationsdauer, geringe Reproduktionsrate, lange Larvenphasen erschweren oder verhindern Life-Cycle-Tests ▪ Beschaffung der Organismen schwierig, da bis jetzt nur wenige Fundorte bekannt sind

* Thigmotaxis: Suche nach Berührungsreizen

4.6.4 Vergleich mikrobieller Lebensgemeinschaften

Die Charakterisierung mikrobieller Populationen anhand ihrer 16S rDNA durch die RFLP- bzw. T-RFLP Technik eröffnet die Möglichkeit, neben funktionellen auch strukturelle Veränderungen in Mikroorganismen zu verfolgen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass kultivierungsunabhängig (die Mikroorganismen werden direkt der Probe entnommen) gearbeitet und somit eine größere

Diversität erfasst werden kann. Man geht heute davon aus, dass mit kultivierungsabhängigen Methoden nur ca. maximal 1 % der bakteriellen Diversität erfasst werden kann.

Ein Nachteil der RFLP gegenüber der T-RFLP ist die beim Restriktionsverdau entstehende große Vielzahl von Banden, wobei sich charakteristische Banden verschiedener Bakterien überlagern können und dadurch Veränderungen relativ schwer erkennbar sind. Durch die Markierung eines terminalen Restriktionsfragmentes werden mit der T-RFLP übersichtlichere Muster erhalten, die aufgrund der verwendeten Technik scharf voneinander getrennt werden, wodurch eine deutlich weitere Auftrennung der Banden als bei der RFLP erreicht wird. Für Untersuchungen der mikrobiellen Diversität ist die T-RFLP der RFLP vorzuziehen.

Die Probenaufarbeitung und die Messungen der T-RFLP mit den beschriebenen Methoden zeigten eine gute Reproduzierbarkeit. Unterschiede in den Bandenmustern wurden dagegen teilweise zwischen den über verschiedene Zeitspannen kultivierten Parallelansätzen gefunden. Dies deutet darauf hin, dass sich während der Inkubation der Gewässerproben in den Parallelansätzen die mikrobiellen Lebensgemeinschaften unterschiedlich entwickelten und es zu Verschiebungen in den dominanten Arten kam. Deshalb war eine endgültige Auswertung der Ergebnisse am Ende der Inkubationsversuche schwierig und bedarf noch weiterer Absicherungen.

Für vergleichende Untersuchungen von Umweltproben ist die beschriebene Methodik gut geeignet. Für die Untersuchung der Auswirkungen von Einzelstoffen auf die Diversität der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Inkubationsversuchen sind noch intensivere Studien zur Optimierung der Kultur- bzw. Inkubationsbedingungen notwendig, als sie im Rahmen dieses Vorhabens möglich waren.

Eine weitere kultivierungsunabhängige Methode, die zur Identifizierung der Organismen herangezogen werden kann, ist die Erstellung einer Klonbibliothek mit anschließender Sequenzierung. Allerdings ist mit ihr auch ein im Vergleich zur T-RFLP-Methode hoher Arbeits- und Zeitaufwand verbunden. Die Erstellung der Klonbibliothek konnte in diesem Vorhaben ohne größere Schwierigkeiten durchgeführt werden. Bei den aus der Klonbibliothek untersuchten 30 Proben wurden im Grundwasser fast ausschließlich *β-Proteobacteria* identifiziert. Hierbei ist anzunehmen, dass *β-Proteobacteria* an das Habitat speziell angepasst sind und deshalb hier gefunden wurden. Im Gegensatz dazu fand sich in den 20 Proben des Oberflächenwassers eine größere Vielzahl an Organismen. Dies waren sowohl drei *α*-, zwei *β*- und drei *γ-Proteobacteria* als auch ein Angehöriger des CFB-Phylums und zwei grampositive Bakterien. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Erkenntnis, dass Grundwasser artenärmer als Oberflächenwasser ist.

Mit kultivierungsabhängigen Methoden wird nur ein geringer Anteil der Lebensgemeinschaft der untersuchten Probe erfasst, da durch die Wahl des Mediums oder auch der Inkubationsbedingungen bestimmte Organismen selektiert werden. Bei der RFLP-Analyse der isolierten Reinkulturen wiesen die auf den LB-Medien erhaltenen Isolate zwar unterschiedliche Banden auf, aber es zeigte sich, dass eine deutliche Unterscheidung nur bei Verwendung mehrerer Restriktionsenzyme möglich war. Oft waren die erhaltenen Muster ähnlich.

Nach der Sequenzierung der sieben Grundwasser-Isolate konnten zwei *β*- und vier *γ-Proteobacteria* sowie ein Angehöriger des CFB-Phylums identifiziert werden. Im Oberflächenwasser hingegen wurde

hier eine geringere Diversität beobachtet: unter den sieben sequenzierten Isolaten wurde nur ein Angehöriger des CFB-Phylums und sechs γ -*Proteobacteria* gefunden.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Sequenzanalysen der Klonbibliotheken wurde bei der Untersuchung der Grundwasser-Reinkulturen eine größere Vielfalt an Mikroorganismen gefunden. Dies liegt vermutlich an dem erhöhten Nährstoffangebot im Kulturmedium, wodurch auch nicht-dominante Arten angezogen werden. Anscheinend sind die überwiegend nur in der Klonbibliothek gefundenen β -*Proteobacteria* nicht an die hohen Nährstoffkonzentrationen des Kulturmediums adaptiert.

Als Isolate aus der Oberflächenwasser-Probe wurden nur zwei Mikroorganismengruppen erhalten, im Gegensatz zu fünf Gruppen bei Untersuchung der Klonbibliothek. Wie bei der Grundwasserprobe fehlen die β -*Proteobacteria*, aber auch für die α -*Proteobacteria* und die grampositiven Bacteria waren die Kultivierungsbedingungen nicht optimal.

5 Schlussfolgerungen

5.1 Potential von Pflanzenschutzmitteln zur Grundwassergefährdung

Die Schlussfolgerungen verstehen sich als auf der Basis wissenschaftlicher Erkenntnisse gewonnene Aussagen im Hinblick auf eine pragmatische Risikobewertung. Sie sind nicht mit dem Anspruch auf absolute Wahrheit formuliert und sind unter streng wissenschaftlichen Erkenntniskriterien lediglich als begründete Hinweise zu lesen, die wegen der Begrenztheit der Auswahl an Organismen und Pflanzenschutzmitteln entsprechend zu relativieren sind. Folgende Thesen sind aus den vorliegenden Forschungsergebnissen abzuleiten:

Mikrobiologie

- 1) Gemessene Enzymaktivitäten der mikrobiellen Grundwasser-Lebensgemeinschaft werden durch Pflanzenschutzmittel ähnlich betroffen wie die in Oberflächengewässern, es dauert jedoch deutlich länger, bis ein Effekt eintritt.
- 2) Die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft des Grundwassers scheint durch Pflanzenschutzmittel kaum (z.Zt.) messbar verändert zu werden.

Makrobiologie

- 3) Das Empfindlichkeitsspektrum der akuten Toxizität ist in systematisch/physiologisch vergleichbaren Organismen aus Grund- und Oberflächengewässern grundsätzlich ähnlich.
- 4) Werden Leistungen des Aufbaustoffwechsels oder der Aktivität betroffen, reagieren Grundwasserorganismen deutlich (um ca. Faktor 5-7) später oder/und sind unempfindlicher.
- 5) Es gibt keine Hinweise auf physiologisch bedingte höhere Empfindlichkeiten von Grundwasserorganismen.
- 6) Die Lebensgemeinschaft des Grundwassers ist durch das Empfindlichkeitsspektrum der Organismen aus Oberflächengewässern ausreichend repräsentiert.

Die Praxis der Risikobewertung anhand der bestehenden Standard-Testverfahren bietet genügend Sicherheit auch für die Grundwasser-Lebensgemeinschaften, wenn folgende Aspekte beachtet werden:

- 1) Wenn eine Exposition von Grundwasser abzusehen ist, sollte besonders auf die Toxizität gegenüber Crustaceen geachtet werden. Bei Hinweisen auf Auswirkungen auf Crustaceen sollte neben *Daphnia magna* ein höherer Krebs (z.B. *Gammarus*, *Mysidopsis*, *Asellus*, *Hyalella*) getestet werden, um die begrenzte Reaktionsnorm der Syncariden abzubilden.
- 2) Die Prüfung von Lysimeter-Sickerwässern ist durch den Einsatz von *Daphnia magna* in der Regel repräsentativ. Im Einzelfall gilt (1).
- 3) Die Populationsdynamik der Grundwasserorganismen ermöglicht nur sehr langsame und geringe Wiedererholung, sowohl intrinsisch (Reproduktionraten sehr gering), als auch durch Wiederbesiedlung (Migrationsraten gering).

5.2 Methodik zum Vergleich von mikrobiellen Lebensgemeinschaften

Mit der RFLP-Methode / T-RFLP-Methode können Strukturen von mikrobiellen Lebensgemeinschaften miteinander verglichen werden. Mit der T-RFLP-Methode werden der RFLP überlegene Identifizierungen von Banden und eine Erfassung der relativen Bandenstärken je Probe ermöglicht, die bei Bedarf eine statistische Auswertungen zulässt.

Zu den weiteren Vorteilen der T-RFLP Methodik zählen die einfache Handhabbarkeit, hohe Reproduzierbarkeit, die exakte Bestimmung der Fragmentlänge und Signalstärke, die Möglichkeit eines hohen Probendurchsatz sowie die Anwendbarkeit auch bei komplexen Lebensgemeinschaften.

Es ist allerdings zur Zeit keine direkte Korrelation einzelner terminaler Restriktionsfragmente zu phylogenetischen Informationen möglich, da für die Identifizierung von Organismen bzw. Organismengruppen die T-RFLP-Muster bekannt sein müssen. Zur Zeit liegen für Grund- und Oberflächengewässer Mikroorganismen nur wenige Daten vor, so dass in qualitativen Studien (z. B. Erstellung von Klonbibliotheken) erst Datenbanken aufgebaut werden müssen

Die T-RFLP-Methodik scheint für Monitoring-Zwecke großes Potenzial zu besitzen. Dem gegenüber scheint das Anwendungsfeld der Toxizitätsstudien wenig erfolgversprechend; für Untersuchungen in Inkubationsversuchen bedarf es noch weiterer Überprüfungen.

6 Ausblick

Die intrinsische Toxizität der Grundwasserorganismen scheint durch Standardtestorganismen gut abgebildet zu sein. Über das Risiko können jedoch bislang kaum Abschätzungen vorgenommen werden: Es fehlen zum Einen valide Expositionsabschätzungen für die sehr heterogene Situation innerhalb der Grundwasserleiter. Zum Anderen kann über die populationsdynamischen Zusammenhänge der Lebensgemeinschaften im Grundwasser zwar spekuliert, jedoch wenig belegt werden: *Eine Wiederbesiedlung des Lebensraumes durch Stygobionten nach Ausrottung wird sehr viel Zeit beanspruchen. Dies liegt an der niedrigen Reproduktionsrate der Grundwasserorganismen. Eine Zuwanderung von Außen ist ebenso langsam oder wird ganz behindert wenn keine hydrologischen Verbindungen mit benachbarten Grundwassersystemen bestehen* (Mösslacher et. al. 1998).

So kann folgender Forschungsbedarf abgeleitet werden:

- Die systematische Erforschung Hydrodynamik und der davon abhängigen Ökologie der Grundwassersysteme in Deutschland ist von zentraler Bedeutung, gerade weil wir es hier mit regional sehr unterschiedlichen Aquiferen zu tun haben.
- Eine realistische Expositionsabschätzung muss neben den zur Zeit sehr generischen und groben Abschätzungen der Grundwasserneubildung Fluss- und Austauschraten in verschiedenen Horizonten und die milieuspezifischen Abbauraten in den Grundwasserleitern einbeziehen.
- Konzepte für flächendeckendes und regelmäßiges Monitoring der Grundwasser-Lebensgemeinschaft müssen erarbeitet und erprobt werden. Dies ist am sinnvollsten im Rahmen wasserwirtschaftlicher Überwachung. Neben der räumlichen Verteilung von Arten sollte eine Abschätzung von Lebensdaten vorgenommen werden. Populationsgenetische Untersuchungen können die Durchgängigkeit von Aquiferen und Besiedlungsraten aufklären helfen.
- Die Modellierung der Populationsdynamik ausgewählter Grundwasserorganismen ermöglicht die Abschätzung der potentiellen Elastizität gegenüber anthropogenen Einflüssen (z.B. Wirkungen von Pflanzenschutzmitteln).
- Die (zunächst aufwändige) Erstellung von T-RFLP spezifischen Klonbibliotheken ermöglicht die Ausweitung einer schnellen, umfassenden und quantifizierenden Technik um qualitative Aspekte. Eine Implementierung als Charakterisierungs- und Vergleichsinstrument beim Monitoring von mikrobiellen Lebensgemeinschaften ist anzustreben.

7 Literatur

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter (1999). Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. WILEY-VCH Verlag, Weinheim.
- Aldenberg, T. & Slob, W. (1993): Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC Toxicity Data. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 25: 48-63.
- Biesinger, K.E. et al. (1972): *J. Fish Res. Bd. Canada* 29: 1691-1700.
- Boeri, R.L., Magazu J.P., Ward T.J. (1995): Acute flow-through toxicity of CGA 219417 (100% Cyprodinil, Anm. d. Verf.) to the mysid, *mysidopsis bahia*. Syngenta-Report Nr. CGA 219417/0649.
- Botosaneanu, L. (1986): General Introduction. In: *Stygofauna Mundi – A Faunistic, Distributional, and Ecological Synthesis of the World Fauna inhabiting Subterranean Waters (including the Marin Interstitial)*. E.J.Brill, Dr. W. Backhuys, Leiden: 1-4.
- BOU, C. (1974): Les methodes de recolte dans les eaux souterraines interstitielle. *Annales of Speleology*, 29. 611 – 619.
- Camacho, I. (1992): The Natural History of Biospeleology. *Monografias del Museo Nacional de Ciencias Naturales*. Madrid. S. 680.
- Cripe, G.M. (1994): *Environ. Toxicol. Chem.* 13(11): 1867-1872.
- Culver, D.C. (1994): Species Interactions. In: *Groundwater Ecology*. Academic Press, 571 San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: 271-285.
- Danielopol, D.L. (1989): Groundwaterfauna associated with riverine aquifers. *Journal of the North American Benthological Society*, 8 (1): 18-35.
- Danielopol, D.L., Creuzé des Châtelliers, M., Moeszlacher, F., Pospisil, P. & Popa, R. (1994): Adaptation of Crustacea to Interstitial Habitats: A Practical Agenda for Ecological Studies. In: *Groundwater Ecology*. Academic Press, 571. Gibert, J., Danielopol, D. L., Stanford, J. A. [Hrsg.] (1994): San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: 217-243.
- Dole-Olivier, M.-J., Marmonier, P., Creuzé des Châtelliers, M. & Martin, D. (1994): Interstitial Fauna associated with the alluvial Floodplains of the Rhône River (France). In: *Groundwater Ecology*. Academic Press, 571. Gibert, J., Danielopol, D. L., Stanford, J. A. [Hrsg.] (1994): San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: 313-346.
- DVWK (1988): Husmann, S. Grundwasser als Lebensraum. In *DVWK Schriften* 80. Bedeutung biologischer Vorgänge für die Beschaffenheit des Grundwassers. Parey Verlag, Hamburg und Berlin. S. 322.
- Egert, E. (1998): Untersuchungen zum Artenspektrum, zur Besiedlungsdichte und zur vertikalen Verteilung von Organismen in einem Langsamsandfilter unter besonderer Berücksichtigung der Amphipoda und Nematoda. Diplomarbeit. Carl-von-Ossietsky Universität Oldenburg, 115 S.
- Gibert, J., Stanford, J. A., Dole-Olivier, M.-J. & Ward, J.V. (1994): Basic Attributes of Groundwater Ecosystems and Prospects for Research. In: *Groundwater Ecology*. Gibert, J., Danielopol, D. L. & Stanford, J. A. [Hrsg.] Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: 7-40.
- Giere, O. (1993): *Meiobenthology. The Microscopic Fauna in Aquatic Sediments*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest. 102 Figures, 20 Tables. S. 328.
- Gierig, M. (2001): Grundwasser. Der unsichtbare Schatz. *Spektrum Wasser* 2. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, München. S. 99.
- Ginet, R. (1960): Ecologie, Ethologie et Biologie de *Niphargus* (Amphipode Gammaride hypoge). *Ann. Speleol.* 15: 1-254.
- Glatzel, T., Schminke, H.K. (1996): Mating behaviour of the groundwater copepod *Parastenocaris phyllura* Kiefer, 1938 (Copepoda, Harpacticoida). *Contrib. Zool.* 66(2): 103-108.
- Glatzel, T. (1989): Comparative morphology of *Chappuisius inopinus* Kiefer and *C. singeri* Chappuis (Copepoda, Harpacticoida). *Zoologica Scripta*, 18 (3): 411-422.

- Glatzel, T. (1994): Bioindikation im Grundwasser. 255-261. In: Gunkel, G. [Hrsg.]: Bioindikation in aquatischen Ökosystemen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena. S. 540.
- Hahn, H.J. & Friederich, E. (1999): Brauchen wir ein faunistisch begründetes Grundwassermonitoring und was kann es leisten? In: Grundwasser – Zeitschrift der Fachsektion Hydrogeologie in der Deutschen Geologischen Gesellschaft (FH – DGG) 4/99: 147 -154.
- Heinrich, W., Marsteller, R. & Bärmann, R. (1991) Ökosysteme. 251. In: Ökologie, 2. Auflage. Müller, H.J. [Hrsg.]. Gustav Fischer Verlag, UTB-Reihe, Jena. S. 415.
- Husmann, S. (1956): Untersuchungen über die Grundwasserfauna zwischen Harz und Weser. Archiv für Hydrobiologie 52. 1/2. Stuttgart. S. 184.
- Illies, J. (1978): Limnofauna Europaea. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 531.
- Janetzky, W., Enderle, R., Noodt, W. (1996): Crustacea: Copepoda: Gelyelloida und Harpacticoida. Fischer Verlag, Stuttgart. S. 227.
- Kane, T.C., Culver, D.C. & Mathieu, J. (1994): Biotic Fluxes and Gene Flow. In: Gibert, J., Danielopol, D. L., Stanford, J. A. [Hrsg.] (1994). Groundwater Ecology. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. S. 571.
- Karaman, G.S. & Ruffo, S. (1986): Amphipoda: *Niphargus* – Group (Niphargidae sensu Bousfield 1982). In: Stygofauna Mundi. E.J.Brill, Dr. W. Backhuys, Leiden. S. 740.
- Klee, O. (1991): Angewandte Hydrobiologie. In Trinkwasser, Abwasser, Gewässerschutz. Thieme Verlag, Stuttgart. S. 272.
- Kunz, H., Enright, J.B. (1999): *Chappuisius singeri* CHAPPUIS, 1940 (Copepoda: Harpacticoida), ein interessanter Ruderfußkrebs aus dem Grundwasser des Saarlandes. Faunistisch-floristische Notizen aus dem Saarland. 30 (1-2): 653-658.
- Malard, F., Hervant, F. (1999): Oxygen supply and the adaptations of animals in groundwater. Freshwater Biology 41: 1-30.
- Martinez Arbizu, P. (1997): *Parastenocaris hispanica* n.sp. (Copepoda: Harpacticoida: Parastenocarididae) from hyporheic groundwaters in Spain and its phylogenetic position within the fontinalis-group of species. Contrib. Zool. 66(4): 215-226.
- Maund, S.J., Hamer, M.J., Warinton, J.S., Kedwards, T.J. (1998): Aquatic ecotoxicology of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin: Considerations for higher-tier aquatic risk assessment. Pestic Sci 54: 408-417.
- Miller, W.E. et al. (1985): J. Environ. Qual. 14(4) : 569-574.
- Mösslacher, F. & Notenboom, J. (1998): Groundwater biomonitoring. In: Biomonitoring of Polluted Water. A. Gerhardt (ed.). Trans Tech. Publications Ltd. Switzerland.
- Munkittrick, K.R. et al. (1991): Environ. Toxicol. Water Qual. 6, 35-62.
- Obst, U. & Holzapfel-Pschorn, A (1988): Enzymatische Tests in der Wasseranalytik. R. Oldenbourg Verlag München Wien.
- Quentin, K.-E. (1970): Beurteilung und Bedeutung von Rückstandswerten im Hinblick auf Gewässerbiozönose und Trinkwasserqualität. In: Gewässer und Pestizide. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene 34. F. Meinck (ed.), Berlin:19-28.
- Remane, A. (1933): Verteilung und Organisation der benthonischen Mikrofauna der Kieler Bucht. Wiss. Meeresunters., Abt. Kiel, NF 21: 1-36.
- Remane, A. (1952): Die Besiedlung des Sandbodens im Meere und die Bedeutung der Lebensformtypen für die Ökologie. Verh. Dtsch Zool. Ges. Wilhelmshaven 1951. Zool. Anz. Suppl. 16: 327-359.
- Rumm, P. (1993): Untersuchungen zum Artenspektrum, zur Besiedlungsdichte und zur vertikalen Verteilung von Organismen in einem Langsamsandfilter unter besonderer Berücksichtigung der Cyclopoida und Acari. Diplomarbeit, Carl-von-Ossietsky Universität Oldenburg, 152 S.
- Rumm, P. (2000): Untersuchungen zum Abbau partikulärer organischer Substanzen in einem Langsamsandfilter durch Metazoen am Beispiel von *Niphargus fontanus*. In: Dissertation, Carl-von-Ossietsky Universität Oldenburg, 152 S.
- Rumm, P., Schmidt, H. & Schminke, H.K.. (1997): Organismenaustrag aus Langsamsandfiltern. gwf-Wasser/Abwasser, 138(7): 355-361.

- Rumm, P., Schmidt, H. & Hollwedel, W. (1998): Temporal and spatial distribution patterns of crustaceans inhabiting a slow sand filter. In: Peters, J.H. [Ed.]: Artificial Recharge of Groundwater. 474 A.A. Balkema. Rotterdam, Brookfield: 135-139.
- Schellenberg, A. (1932 c): Bemerkungen über subterrane Amphipoden Großbritanniens. Zoologische Anzeiger 99: 49 - 59.
- Schmidt, H. (1994): Untersuchungen zum Artenspektrum, zur Besiedlungsdichte und zur vertikalen Verteilung von Organismen in einem Langsandsandfilter unter besonderer Berücksichtigung der Harpacticoida, Ostracoda und Cladocera. Diplomarbeit. Carl-von-Ossietsky Universität Oldenburg, 135 S.
- Schminke, H.K. (1986): Syncarida. In: Stygofauna Mundi. E.J.Brill, Dr. W. Backhuys, Leiden. S. 740
- Schminke, H.K. (1996): Syncarida. In: Westheide, W. & Rieger, R. [Hrsg.]: Spezielle Zoologie, Erster Teil, Einzeller und wirbellose Tiere. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York: 555-556.
- Schminke, H.K. (1997): Heinzelmännchen im Grundwasser. Biologie in unserer Zeit, 27(3): 182-188.
- Schminke, H.K. & Glatzel, T. (1998): Besonderheiten und ökologische Rolle der Grundwassertiere. Zeitschrift der deutschen geologischen Gesellschaft, 139: 383-392.
- Sehr, I. (2000): Molekularbiologische Untersuchungen zur Charakterisierung mikrobieller Lebensgemeinschaften in aquatischen Systemen. Fachhochschule Wiesbaden.
- Shedd, T.R. et al. (1999): Environ. Toxicol. Chem. 18(10) : 2258-2261.
- Slooff, W. et al. (1983): Aquatic Toxicol. 4: 113-129.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, R.P., Dixon, K.R., Klaine, S.J., La Point, T.W., Kendall, R.J., Weisskopf, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall, L.W. Jr, & Williams, W.M. (1996): Ecological risk assessment of atrazine in north american surface waters. Environ. Toxicol. Chem. 15: 31-76
- Stanford, J.A., Ward, J.V. & Ellis, B.K. (1994): Ecology of the alluvial Aquifers of the Flathead River, Montana. In: Groundwater Ecology. Academic Press, 571. Gibert, J., Danielopol, D. L., Stanford, J. A. [Hrsg.] (1994): San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: 367-390.
- Steenken, B. (1998): Die Grundwasserfauna. Ein Vergleich zweier Grundwasserlandschaften in Baden-Württemberg. ecomed, Landsberg. S. 160.
- Thienemann, A. (1925): Die Binnengewässer Mitteleuropas. In: Die Binnengewässer 1. Schweizerbart, Stuttgart. S. 255.
- Toussaint, M.W. et al. (1995): Environ. Toxicol. Chem. 14(5) : 907-915.
- Umweltbundesamt, Pflanzenschutzmittel-Datenbank, Stand: Dezember 2000.
- Ward, J.V. & Voelz, N.J. (1994): Groundwater Fauna of the South Platte River System, Colorado. In: Groundwater Ecology. Academic Press, 571. Gibert, J., Danielopol, D. L., Stanford, J. A. [Hrsg.] (1994): San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: 391-423.
- Westheide, W. (1996): Annelida. In: Westheide, W. & Rieger, R. [Hrsg.]: Spezielle Zoologie, Erster Teil, Einzeller und wirbellose Tiere. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York. S. 380.

8 Hinweis

Die Rohdaten zu den durchgeführten Laboruntersuchungen liegen beim Forschungsnehmer, dem Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie (IME), Postfach 1260, 57392 Schmallenberg, und in Kopie beim Umweltbundesamt vor.

9 Danksagung

Diese Studie wurde im Auftrag des Umweltbundesamtes im Rahmen des Umweltforschungsplanes – Förderungskennzeichen 298 28 415 erstellt und mit Bundesmitteln finanziert.

Folgende Personen haben zum Erfolg des Projektes wesentlich beigetragen:

Dr. Bernd Stein (Umweltbundesamt Berlin) initiierte und begleitete das Projekt. Er steuerte Fragestellungen, Wohlwollen und Geduld bei.

Dr. Thomas Glatzel und Prof. Dr. H.K. Schminke (Universität Oldenburg) erwiesen sich als zugängliche und hilfreiche Partner bei der Planung und der Präsentation des Projektes, insbesondere auch im Rahmen des Fachgespräches „Ökotoxikologische Prüfung von Pflanzenschutzmitteln hinsichtlich ihres Potentials zur Grundwassergefährdung“ im Umweltbundesamt, Berlin, am 23. Januar 2001.

Dr. Peter Rumm, Dipl.-Geol. James B. Enright, D. Königshoff und Saskia Brandt (Universität Oldenburg) leisteten tatkräftige Unterstützung für die ökologischen Fragen zu und die systematischen Arbeiten an Grundwasser-Makroorganismen.

Die Firma Gelsenwasser AG mit Herrn Dr. B. Westphal aus dem Zentrallabor und den Herren G. Nesch und Willi Henke aus dem Wasserwerk Echthausen/Ruhr und die Stadtwerke Aschaffenburg mit den Herren Ebert und Reuss ermöglichten die im Rahmen des Projektes notwendigen Probennahmen. Sie waren jederzeit ansprechbar und hilfsbereit.

Kerstin Hutter (Fh-IUCT) vollzog die T-RFLP-Untersuchungen.

Elisabeth Hardebusch (Fh-IUCT) leistete im Wesentlichen das Ansetzen der Testkonzentrationen, führte die enzymatischen Tests durch und bonitierte die makrozoischen Tests, auch an den Wochenenden. Bei letzterem wurde sie von Josef Greve unterstützt.

Jörg Bruckert (Fh-IUCT) leistete die teilweise anspruchsvolle chemische Analytik der Testkonzentrationen.